



## *Stevia rebaudiana* Bertoni Bitkisinin *İn vitro* Üretim Potansiyeli ve Tokat Şartlarına Adaptasyonu

Kubilay YILDIRIM<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, Tokat  
e-posta: kubilay.yildirim@gop.edu.tr

Alındığı tarih (Received): 15.08.2016

Kabul tarihi (Accepted): 21.04.2017

Online Baskı tarihi (Printed Online): 25.04.2017

Yazılı baskı tarihi (Printed): 02.05.2017

**Öz:** *Stevia rebaudiana* Bertoni ürettiği çok düşük kalorili tatlandırıcılar nedeni ile son yıllarda tüm dünyada ilgi uyandıran bir bitki türüdür. Bitkinin gördüğü ilgi son yıllarda Türkiye’de artmış ve birçok yörede adaptasyon çalışması yapılmıştır. Ancak tohumlarındaki düşük çimlenme oranı ve yabancı tozlaşma nedeni ile oluşan genetik varyasyonlar bu bitkinin ticari üretiminin önündeki en büyük engelleri oluşturmaktadır. Bu nedenle çalışma ile stevia tohumlarının çimlenmesi üzerine gibberellik asit uygulamasının etkisi test edilmiş, ayrıca ticari olarak vejetatif üretimi sağlayacak doku kültürü ile fide üretim yolları araştırılmıştır. Elde edilen fideler, sera ve tarla denemelerine alınarak, Stevia’nın Karadeniz iklim geçit kuşağında yer alan Tokat şartlarına adaptasyon yeteneği belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, çalışmada ilk defa biyoreaktörde hücre süspansiyon yöntemi ile Steviol glikozit üretim potansiyeli test edilmiştir. Sonuçlar özellikle 50mg/l gibberellik asit uygulamasının hem çimlenme hemde fide gelişimine çok olumlu katkı yaptığını göstermiştir. Yapraftan kallus indüksiyonu ve gelişiminin en iyi NAA (10.0 mg/l) ve BAP (8.0 mg/l) kombinasyonunda, maksimum sürgün ve kök gelişiminin ise sırasıyla BAP (2.0 mg/l) ve IBA (2.0 mg/l) bulunan hormonal ortamlarda meydana geldiğini göstermiştir. Hem tarla hem de sera denemesinde ekilen tüm fideler yüksek oranda gelişim göstermiş ve 150 günde çiçeklenme evresine ulaşmıştır. Geliştirilen stevia fideleri ile kurulan tarla denemesinde yaş yaprak veriminin 4.8 ton/hektar olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç stevia bitkisinin Tokat şartlarına verimli bir şekilde adapte olabileceğini göstermiştir. Çalışmada biyoreaktörde hücre süspansiyonu ile stevia hücre miktarının 15 gün içinde beş katına kadar çıkarılabileceği gösterilmiştir. Ancak biyoreaktörde üretilen hücrelerdeki Steviol glikozit miktarının (< 2mg/g kuru hücre) tarla ve sera denemesinden alınan yapraklardaki orana (>40mg/g kuru yaprak) kıyasla çok düşük değerde olduğu bulunmuştur. Hücre süspansiyonundaki verimi etkileyen Steviol glikozit azlığının ilerde denenecek hormonal ve kimyasal uygulamalar ile artırılması durumunda biyoreaktörde bitkisel tatlandırıcı üretiminin oldukça uygulanabilir ticari bir yöntem olabileceği açıktır.

**Anahtar Kelimeler:** *Stevia rebaudiana*, Doku kültürü, Adaptasyon, Biyoreaktör, Steviol glikozit

### *In Vitro* Production Potential of *Stevia rebaudiana* Bertoni and Its Adaptation to Tokat Province

**Abstract:** *Stevia rebaudiana* Bertoni is a compelling plant in the world due to its natural and zero-calorie sweetener. Low germination rate and higher genetic variation in the seeds of this species limited its commercial production. Therefore, contribution of gibberellic acid on the germination of stevia seeds and indirect organogenesis protocols for vegetative propagation of stevia seedlings were tested in the current study. Production of Steviol glucosides with cell suspension culture in bioreactor conditions were also tested within the study. The entire seedlings provided from the seeds and callus cultures were used to test the adaptation ability of stevia to Tokat province, which is found on climatic transitional zone of Black Sea region. The results of the study indicated that gibberellic acid application with 50 mg/l has important contribution to seed germination and development of the stevia seedlings. The best callus induction and growth from stevia leaves took place under NAA (10.0 mg/l) and BAP (8.0 mg/l) hormonal concentrations. BAP with 2mg/l and IAA with 2mg/l hormones were more effective for shoot and root regenerations from callus culture, respectively. Stevia was grown well in both greenhouse and field trials and reached its flowering time in 150 days in Tokat conditions. Fresh weight of the leaves harvested in the field was 4.8 ton/hectare in the study. This result indicated that stevia is highly adaptive to Tokat climatic conditions and could be produced in commercial scale in the region. Cell suspension culture of stevia in bioreactor

indicated fivefold increase in cell content in 15 days. Unfortunately, Steviol glucoside content of cell suspension culture (< 2 mg/g dry cell weight) was quite smaller than its content in the leaves (>40mg/g dry leaf) grown under field and greenhouse conditions. If the low Steviol glucoside content of cell suspension culture is increased with further hormonal and chemical trials, commercial stevia based sweetener production via bioreactor could be quite possible.

**Keywords:** *Stevia rebaudiana*, tissue culture, adaptation, bioreactor, steviol glucoside

### 1.Giriş

Obezite ve kilo artışı, dünyada sağlık açısından en önemli risk oluşturan etmenlerin başında gelmektedir. Bu nedenle insanların zayıflama programlarında ya da günlük yaşamlarında kalorisi düşük ancak tadı yüksek besin ve gıda arayışları çok hızlı bir şekilde artmaktadır. *Stevia rebaudiana* Bertoni bitkisi bu kapsamda üzerinde en çok çalışılan bitkilerden birisi olup, halen birçok ülkede bu bitki kaynaklı tatlandırıcı üretimi ve kullanımı devam etmektedir. *Stevia*, yapraklarında birden çok Steviol glikozit bileşiği (5–10%) ihtiva etmekte olup bunlar; Rebaudioside A (2–4%), Rebaudioside C (1–2%), Dulcoside A (0.5–1%), Rebaudioside B (< %1), Rebaudioside D (< %1), Rebaudioside E (<%1) olarak bilinmektedir. Bu Steviol glikozitler arasında, en değerlisi normal şekere göre 400-500 kat daha tatlı olan Rebaudioside A (Reb A) bileşiğidir. *Stevia* yaprakları içerdikleri bu bileşikler sayesinde yaş halde normal şekerden 10-15 kat, kurutma işlemi görmüş yapraklarda ise 200-300 kat daha fazla tatlandırıcı özelliğe sahiptir (Lemus-Mondaca ve ark.,2012). Steviol glikozitlerin bağırsaklarda normal sindirime uğrayarak Steviol glucuronide olarak vücuttan atıldığı bilinmektedir. Bazı çalışmalar Steviol glikozitlerin kristalize edilmiş şeker ve suni tatlandırıcıların aksine, hazmedildiği esnada insülin salgılanmasına gerek duymadığı böylece diyabet tedavisinde kullanılabileceğini göstermiştir (Lemus-Mondaca ve ark., 2012). Ayrıca bu tatlandırıcının 100 °C'nin üzerinde yapısal bozukluğa uğramadığı dolayısı ile pasta, bisküvi ve yemek endüstrisinde kullanıma uygun olduğu vurgulanmaktadır. Bakteriyostatik olmasından ve fermente olmamasından dolayı içinde kullanıldığı gıdaların raf ömrünü uzattığı da belirlenmiştir (Swithers, 2013).

Ülkemizde balotu olarak bilinen *Stevia rebaudiana* Bertoni aslen Güney Amerika kökenli Asteraceae ailesine ait bir bitkidir. Paraguay yerlilerinin binlerce yıldır tükettiği *stevia*, dünyada ticari anlamda en büyük ilgiyi uzak doğu ülkelerinde görmüştür. Uzun yıllardır tatlandırıcı olarak kullanılan bu bitkinin ticari üretimi birçok ülkede artmış olup Steviol glikozitlerin gıda maddesi olarak kullanımına ABD'de 2008, Avrupa'da 2011, Türkiye'de ise 2013 yılından itibaren izin verilmiştir. Halen meyve suları, gazlı içecekler, her türlü tatlılar, çikolata, bisküvi, pasta ve kekler, tatlandırılan konserve ürünleri gibi birçok gıda ürününde *stevia* kökenli tatlandırıcılar kullanılmaktadır (İnanç ve Çınar, 2009). Ekonomik değeri yüksek tıbbi-aromatik bitki grubunda yer alan *stevia* bitkisinin dünyada gördüğü ilgi üzerine Türkiye'de üretiminin artırılması ve gerekli adaptasyon testlerinin yapılması için çalışmalar başlatılmıştır (Yücesan ve ark., 2016a., Yücesan ve ark., 2016b., Turgut ve ark.,2015). Elde edilen veriler özellikle Akdeniz bölgesinin bu bitkinin üretimi için son derece uygun olduğunu göstermiştir (Turgut ve ark.,2015). Ancak özellikle Karadeniz bölgesinin iklimsel koşullarının uygunluğu ve çay endüstrisi ile *Stevia*'nın birlikte kullanım potansiyeli, bu bitkinin adaptif özelliklerinin bu bölge içinde test edilme gereksinimini ortaya çıkarmıştır.

*Stevia* bitkisinin üretiminin önündeki en önemli problemin bitkilerin yeteri düzeyde tohum bağlamaması ve oluşan tohumların çimlenme oranının çok düşük olmasıdır (Yücesan ve ark., 2016a). Bu bitkinin ülkemizde doğal yetişen bir bitki olmaması nedeni ile tohumları yurt dışından getirilmekte, getirilen tohumların ise fide verme kapasitesinin (10%) çok düşük olduğu bu nedenle ticari boyutta bir fide üretiminin ve ekiminin yapılamadığı bilinmektedir (Turgut ve ark., 2015). Son yıllarda *stevia* üretiminin ülkemizde de

artması tohum üretimini bir nebze rahatlatırsa da tohumlardaki düşük çimlenme oranı hala stevia üretiminin artırılmasının önündeki en büyük engel olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu problemlerin yanında dış tozlaşma ile meydana gelen tohumlardaki genetik varyasyonun, Steviol glikozitlerin üretiminde ciddi anlamda varyasyona neden olduğu, bu nedenle ticari üretimde daha çok vejetatif üretimden elde edilmiş fidelerin tercih edildiği bilinmektedir. Stevia'nın gerek fide üretiminin artırılması gerekse vejetatif üretiminin gerçekleştirilmesini sağlayacak bitki doku kültürü yöntemlerine yönelik birçok çalışma yapılarak (Sairkar ve ark.,2009; Janarthanam ve ark., 2009; Preethi ve ark 2011; Khalil ve ark. 2014; Yücesan ve ark.2016a) mikroüretim prosedürleri belirlenmiştir. Ancak bu çalışmaların birçoğunda bitkisel materyal olarak stevia bitkisinin nod-internod kısımları ile sürgün uçları kullanılmıştır. Ancak fide gereksinimine ihtiyaç duyan bu yöntemlerin üretim kapasitesi sınırlı olup, yöntemin devamlılığı stevia bitkisinin varlığına dayanmaktadır. Oysa kallustan rejenerasyon sistemleri, kendi bitkisel materyalini üretme potansiyeli olduğundan stevia üretimi için indirek organogenez yöntemlerinin kullanılması çok daha uygundur. Steviol glikozitlerin üretiminin bir diğer yolu da bitkiye ihtiyaç duyulmadan hücre süspansiyon yöntemi ile üretimine dayanmaktadır. Doku kültüründen elde edilen kallusların kullanılarak hücre üretilmesi aracılığı ile Steviol glikozit üretimi üzerine bugüne kadar birkaç çalışma yapılmış olup, bu çalışmalar erlende optimizasyon çalışmalarının ötesine geçmemiştir (Mathur ve Shekhawat 2013, Sharma ve ark., 2015). Ancak ticari amaçlı hücre süspansiyon kültürlerinin biyoreaktörlerde denenecek optimize edilmesi ve Steviol glikozit üretim potansiyellerinin belirlenmesi gerekmektedir.

Bu çalışma ile özellikle stevia tohumlarındaki çimlenme oranının artırılması için gibberellik asit uygulamaları test edilmiş, ayrıca stevia yapraklarından kallus indüksiyonu ve rejenerasyonu ile fide üretimi araştırılmıştır. Gerek çimlendirme gerekse doku kültüründen elde edilen fideler Tokat yöresinde stevia bitkisinin tarla ve sera koşullarına adaptasyon

çalışmaları için kullanılmıştır. Bunun yanında rejenerasyon çalışmaları sırasında elde edilen kalluslardan biyoreaktörde hücre süspansiyon kültürü ile Steviol glikozit üretim potansiyeli araştırılmıştır. Bu çok yönlü çalışma, *in vitro* fide üretimi, adaptasyon ve hücre süspansiyonu ile Steviol glikozit üretiminin bir arada değerlendirildiği ilk çalışma niteliğindedir

## 2. Materyal ve Metot

### Stevia Tohumlarının Çimlendirilmesi ve Bitkisel Materyal Temini

Çalışmada ilk olarak Stevia tohumlarının çimlenme oranının artırılması için gibberellik asit uygulaması yapılmıştır. Bunun için ticari bir firmadan (KALO Organik Tarım, Türkiye) alınan Stevia tohumları ilk önce steril su ile yıkanmış, ardından %2 tween içeren %50 etanol çözelti içerisinde 3 dakika bekletilerek kısmi yüzeysel sterilizasyon uygulanmıştır. Etanol sonrası saf su ile yıkanan 100'er adet tohum, içerisinde değişik konsantrasyonlardaki gibberellik asit (GA<sub>3</sub>) (0, 10mg/l, 25mg/l, 50mg/l, 100 mg/l, 200 mg/l ve 500mg/l) çözeltisi bulunan steril Whatman kâğıdının arasına konularak, 7 gün boyunca karanlık ortamda ve 25 °C sıcaklıkta bekletilmiştir. Her bir uygulama 10 tekrarlı hazırlanmış olup bu safha sonunda çimlenen tohumlar sayılarak hangi hormonal konsantrasyonun çimlenme üzerine ne kadar etki yaptığı belirlenmiştir. Çimlenen tohumlar daha sonra içerisinde torf:pelit:vermiculit (10:1:1) bulunan ortamlara aktarılarak gelişimleri takip edilmiştir. Tohumlar viyollere ekildikten sonra üzeri yüksek nem oranının sağlanması için naylon ile kaplanmıştır. Böylece hem doku kültürü hem de adaptasyon çalışmaları için maksimum sayıda fidenin elde edilmesi sağlanmıştır.

### İndirek Organogenez ve Yapraktan Kallus İndüksiyonu

*In vitro* koşullarda mikro üretim yolu ile Stevia fidesinin elde edilmesi, çalışmanın ana amaçlarından birisini oluşturmuştur. Bu kapsamda gerek hücre süspansiyonun uygulanabilmesi gerekse mikroüretim ile stevia fidesi üretimi için kallustan rejenerasyon yolu seçilmiştir. Bu amaçla

çimlenmeden sonra, 5-7 cm uzunluğuna ulaşmış fidelerden (8 hafta sonra) elde edilen yapraklar öncelikle sterilizasyon işlemine tabi tutulmuşlardır. Bunun için steril su ile yıkanan yapraklar, 5 dak. boyunca %50 (v/v) etanol çözeltisi içerisinde bekletilerek steril distile su ile 3 kez çalkalanmıştır. Ardından 0.01 % HgCl<sub>2</sub> (2 dakika) solüsyonu ile muamele edilen yapraklar distile su ile tekrar yıkanarak yüzey sterilizasyonları tamamlanmıştır. Kallus oluşumunun sağlanması için steril edilen yapraklar, petri içerisinde %3 sukroz ve %8 agar ile değişik konsantrasyonlarda 2,4-D (1-20 mg/l), NAA (1-20 mg/l) ve BAP (0.1-10 mg/l) bulunan MS (Murashige ve Skoog., 1962) ortamlarına (pH;5.8) nakledilmişlerdir. Hormonal kombinasyonların belirlenmesi için daha önceki Stevia'nın kallus indüksiyonunu gösteren çalışmalar (Sairkar ve ark.,2009; Janarthanam ve ark., 2009; Preethi ve ark 2011; Mathur ve Shekhawat., 2013; Gauchan ve ark.,2014) dikkate alınmıştır. Bu çalışmalarda en yüksek kallus veriminin görüldüğü kombinasyonlar (Çizelge 1) petrilere oluşturularak, steril edilmiş 4 yaprak diski ekilmiştir. Yirmi tekrarlı hazırlanan her kombinasyon 25 °C sabit sıcaklık, %45-50 nem altında 16 saat ışık (200 µmole/m<sup>2</sup>.s ışık şiddeti) 8 saat karanlık fotoperiyodunda 3 hafta boyunca bekletilmiştir. Kallus indüksiyonu 3 hafta sonra belirmiş, kontaminasyon göstermeyenler aynı hormon konsantrasyonlarında alt kültür edilerek 3 hafta boyunca büyütülmüşlerdir. Kallus indüksiyonun ve gelişiminin 6 hafta boyunca takip edilmesinin ardından, kallusların bir bölümü sürgün oluşumunun indüklenmesi için Janarthanam ve ark.(2009), Sairkar ve ark.,(2009), ve Preethi ve ark.,(2011)'de belirtilen BAP (2-5 mg/l) ve NAA (0.1-2 mg/l) hormonal kombinasyonlarının bulunduğu ortamlara aktarılmıştır (Çizelge 2). Kalluslardan elde edilen sürgünler en yüksek verimin olduğu ortamda alt

kültür edilerek büyütülmüş, ardından ayrılarak köklendirme ortamına transfer edilmişlerdir. Köklendirme için Razak ve ark., (2014) ve Patel ve ark (2009) 'da belirtildiği şekilde farklı kombinasyonlardaki IBA (0.1-3 mg/l) ve NAA (0.1-3 mg/l) içeren ortamlar hazırlanmıştır (Çizelge 3). Böylece kalustan rejenere edilen fideler kültür ortamından çıkarılarak distile su ile yıkanmış ve içerisinde torf, perlit ve vermiculit (10:1:1) karışımı bulunan ortamlara aktarılmıştır.

### **Stevia'nın Tokat Şartlarına Adaptasyonunun Sera ve Tarlada Test Edilmesi**

Çalışmanın diğer önemli ayaklarından biriside Karadeniz iklimi geçit kuşağında bulunan Tokat ilinde Stevia'nın adaptasyon performansının belirlenmesidir. Bu kapsamda doku kültüründen elde edilen fideler sera koşullarında büyütülmüş, tohumdan çimlendirilerek elde edilen fideler ise tarla denemesine alınmıştır. Sera denemesi, 200 adet fidenin içerisinde torf perlit:vermiculit (10:1:1) bulunan 10 litrelik saksılara 4 tekrar (50 fide/tekrar) halinde Nisan 2016'da ekilmesi ile başlamıştır. Saksılar Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tarımsal Uygulama Merkezi bünyesinde bulunan yarı kontrollü seralara aktarılmış, ortalama 25-32 derece sıcaklık ve % 44-52 nem aralığında 5 ay boyunca büyütülerek verim ve gelişim parametreleri kaydedilmiştir. Tarla denemesi ise aynı tarihte uygulama merkezi bünyesindeki araziye, yine 4 tekrar halinde, 400 adet Stevia fidesinin birbirine 65cm'lik uzaklıklarda bulunan sıralara 45 cm aralıklarla ekilmesi ile oluşturulmuştur (toplam 120 m<sup>2</sup>). Deneme damla sulama sistemi ile sulanmış, yabancı ot mücadelesi çapalama ile yapılmıştır. Her iki denemede de fidelerin büyüme performansları, bitki başına düşen gövde ve yaprak miktarı, çiçeklenme zamanı ve hasat sonucu elde edilen yaş ve kuru yaprak miktarları ölçülmüştür.

**Çizelge 1.** Farklı oranlarda büyüme düzenleyicisi bulunan MS ortamlarının *Stevia rebaudiana* bitkisinin yapraklardan kallus indüksiyonu ve gelişimine etkileri.

**Table 1.** Effects of different hormonal combinations on callus induction and development from the leaves of *Stevia rebaudiana*

NAA (mg/l)	2,4D (mg/l)	BAP (mg/l)	Kallus indüksiyon oranı (%)	Kallus morfolojisi	Kallus Büyümesi	Referans
0	0	0	0 ± 0	Kallus oluşumu gözlenmedi	0	
1		0.1	64 ± 3.8	Açık yeşil, kırılğan	2	Sairkar ve ark.,2009
1		0.5	71 ± 4.5	Açık yeşil, kırılğan	3	Sairkar ve ark.,2009
2		0.1	74 ± 5.7	Kahverengi, kırılğan	3	Sairkar ve ark.,2009
2		0.5	71 ± 6.6	Kahverengi, kırılğan	3	Sairkar ve ark.,2009
2		2	34 ± 2.5	Kahverengi, kırılğan	1	Preethi ve ark 2011
5		2	38 ± 5.2	Açık yeşil, kırılğan	1	Preethi ve ark 2011
10		2	53 ± 6.2	Açık yeşil, sıkı	2	Preethi ve ark 2011
20		2	61 ± 5.7	Açık yeşil, sıkı	3	Preethi ve ark 2011
5		5	88 ± 5.9	Yeşil, kırılğan	4	Mathur ve Shekhawat., 2013
10		5	96 ± 4.1	Yeşil, sıkı	5	Mathur ve Shekhawat., 2013
10		10	92 ± 6.5	Yeşil, sıkı	5	Mathur ve Shekhawat., 2013
20		10	84 ± 4.5	Yeşil, kırılğan	5	Mathur ve Shekhawat., 2013
1	1		84 ± 5.8	Açık yeşil, sıkı	5	Janarthanam ve ark., 2009
1	2		68 ± 4.5	Açık yeşil, kırılğan	4	Janarthanam ve ark., 2009
1.5	2		66 ± 7.7	Açık yeşil, kırılğan	3	Janarthanam ve ark., 2009
2	2		67 ± 6.8	Açık yeşil, kırılğan	4	Janarthanam ve ark., 2009
	2	2	28 ± 3.8	Açık kahverengi, sıkı	2	Gauchan ve ark .,2014
	5	2	37 ± 5.4	Açık kahverengi, sıkı	3	Gauchan ve ark .,2014
	10	2	32 ± 5.0	Açık yeşil, kırılğan	3	Gauchan ve ark .,2014
	20	2	25 ± 4.5	Açık yeşil, kırılğan	3	Gauchan ve ark .,2014

\*\*Herbir hormonal kombinasyon için 20 petri kabı içerisine 4 yaprak diski konularak tekrarlar oluşturulmuş sonuçlar 6 hafta sonundaki tekrarların ortalamaları alınarak hesaplanmıştır. Kombinasyonlar arasındaki farklılık ANOVA ve Tukey HSD test ile belirlenmiştir (p<0.05) Kallus büyümesi 0:hiç büyümeyen, 5: en çok büyüyen

**Çizelge 2.** *Stevia rebaudiana* bitkisinin yaprak dokusundan elde edilen kallus dokusundan sürgün rejenerasyonu ve gelişimi (n=20)

**Table 2.** The parameters of shoot regeneration from the callus obtained from *Stevia rebaudiana* leaves

BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	Rejenerasyon sıklığı (%)	Ortalama sürgün sayısı/Kallus	Ortalama sürgün uzunluğu (cm)	Referans
0	0	-	0	0	
2.0	-	69	7.4 ± 0.2	7.2 ± 0.5	Janarthanam ve ark.(2009)
4.0	-	64	6.4 ± 0.4	7.1 ± 0.4	Janarthanam ve ark.(2009)
5.0	-	68	6.8 ± 0.3	6.9 ± 0.3	Janarthanam ve ark.(2009)
2.0	0.1	50	4.1 ± 0.2	3.0 ± 0.1	Sairkar ve ark.,(2009)
2.0	0.5	65	4.8 ± 0.6	4.1 ± 0.4	Sairkar ve ark.,(2009)
2.0	1.0	56	3.5 ± 0.1	3.2 ± 0.4	Sairkar ve ark.,(2009)
2.0	2.0	48	4.7 ± 0.2	3.5 ± 0.1	Sairkar ve ark.,(2009)
4.0	0.1	58	3.8 ± 0.4	2.4 ± 0.2	Preethi ve ark.,(2011)
4.0	0.5	69	4.9 ± 0.5	4.8 ± 0.4	Preethi ve ark.,(2011)
4.0	1.0	87	6.1 ± 0.4	5.9 ± 0.6	Preethi ve ark.,(2011)
4.0	2.0	76	6.2 ± 0.8	6.4 ± 0.4	Preethi ve ark.,(2011)
5.0	0.1	55	4.5 ± 0.5	4.8 ± 0.3	Preethi ve ark.,(2011)
5.0	0.5	45	3.8 ± 0.5	3.6 ± 0.3	Preethi ve ark.,(2011)
5.0	1.0	58	4.8 ± 0.6	4.9 ± 0.2	Preethi ve ark.,(2011)
5.0	2.0	61	5.1 ± 0.4	5.3 ± 0.3	Preethi ve ark.,(2011)

\*\*Gözlemler sürgün transferinden itibaren 4.hafta sonunda elde edilmiştir. Her bir ortam için 20 sürgün dikkate alınmış ve hesaplamalar ile gözlemler ortalamalar alınarak yapılmıştır.Kombinasyonlar arasındaki farklılık ANOVA ve Tukey HSD test ile belirlenmiştir (p<0.05)

**Çizelge 3.** *Stevia rebaudiana* sürgünlerinin farklı hormonal kombinasyonlar altındaki kök gelişim performansları

**Table 3.** *Root initiation and improvement performances on Stevia rebaudiana shoots grown under different hormonal combinations*

IBA (mg/l)	NAA (mg/l)	Kök indüksiyonu (%)	Sürgün başına ortalama kök sayısı	Ortalama kök uzunluğu (cm)	Referans
0.1	-	76	3.8 ± 0.4	4.4 ± 0.2	Razak ve ark., (2014)
0.5	-	68	4.9 ± 0.5	3.8 ± 0.3	Razak ve ark., (2014)
1.0	-	79	6.1 ± 0.4	6.9 ± 0.3	Razak ve ark., (2014)
2.0	-	94	6.2 ± 0.8	6.5 ± 0.5	Razak ve ark., (2014)
3.0	-	88	4.5 ± 0.5	4.3 ± 0.3	Razak ve ark., (2014)
	0.1	42	3.8 ± 0.5	4.6 ± 0.3	Patel ve ark (2009)
	0.5	47	4.8 ± 0.6	4.9 ± 0.1	Patel ve ark (2009)
	1.0	49	5.1 ± 0.4	5.3 ± 0.2	Patel ve ark (2009)
	2.0	56	3.7 ± 0.4	3.2 ± 0.4	Patel ve ark (2009)
	3.0	49	4.9 ± 0.2	4.4 ± 0.4	Patel ve ark (2009)

**\*\*Gözlemler sürgün transferinden itibaren 4.hafta sonunda elde edilmiştir. Her bir ortam için 20 sürgün dikkate alınmış ve hesaplamalar ile gözlemler ortalamalar alınarak yapılmıştır. Kombinasyonlar arasındaki farklılık ANOVA ve Tukey HSD test ile belirlenmiştir (p<0.05)**

### Steviol Glikozitlerin Hücre Süspansiyon Kültürü İle Biyoreaktörde Üretimi

Steviol glikozit üretiminin bir diğer alternatifi ise elde edilen kalluslardan hücre süspansiyonu ile biyoreaktörlerde hücre üretilmesidir. Bu nedenle çalışmada Gaziosmanpaşa Üniversitesi Biyomühendislik bölümünde bulunan Biostat B-plus bioreaktöründe daha önce erlende optimize edilmiş *Stevia* hücre süspansiyon ortamlarının (Mathur ve Shekhawat, 2013) yükseltme (scale up) çalışması yapılmıştır. Biostat B-plus tekrar kullanılabilir karıştırıcı ve otoklavlanabilir bir cam hazneye sahip olup maksimum 4 litreye kadar solüsyonu proses edebilmektedir. Hücre süspansiyonu için en uygun başlangıç hücre miktarının litre başına 10 gr yaş kallus olduğu, Mathur ve Shekhawat, (2013) tarafından en uygun hormonal konsantrasyonlar ile beraber belirlenmiştir. Bu nedenle bu çalışmada maksimum *Stevia* hücre üretiminin gerçekleştiği 10 g/l kallus dokusu, %3 sukroz, 0.27 µM 2,4-D ve 0.27 µM BAP ile 0.06 µM Askorbik asit bulunan MS ortamı (pH:5.8) aktarılmıştır. Süre. 41'lik iki adet Biostat B plus bioreaktöründe takip edilmiştir. Kallusların steril kabin içerisinde transferinden sonra bioreaktörlerde ki karıştırıcı hızı kallusların zarar görmeden çözülmesi için ilk önce 70 rpm'e ayarlanmıştır. Kallusların kaybolarak hücresel kitleler haline geçtiği anda ise karıştırıcı hızı 150 rpm'e çıkarılmıştır. Ayrıca

solüsyon içerisindeki minimum çözünmüş oksijen miktarı dışarıdan filtrelenerek kompresörle sabit hızda verilen hava ile %21'e ayarlanmıştır. Karanlık ortamda bekletilen biyoreaktörlerin sıcaklığı 26 derecede sabit tutulmuş, pH değişimleri de bilgisayar ortamındaki programlar ile sürekli takip edilmiştir. Reaktörde bulunan düzenleyiciler ile pH 5.8 civarında kalması sağlanmıştır. Hücrelerin biyoreaktörde çoğaltılması sürecinde, her gün 6 ml'lik solüsyonlar alınarak hücre miktarındaki artışlar belirlenmiş, ayrıca hücrelerin canlılığını ve sayısını gösteren Evan's Blue testi uygulanmıştır (Rodriguez-Monroy ve Galindo.,1999). Bu prosedürde biyoreaktörden alınan solüsyon içerisinde 1 ml alınarak % 0,25'lik Evan Mavisi ile 5 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Gerekli dilüsyonları yaptıktan sonra solüsyondan 10 µl alınarak Thoma Lamı üzerine yüklenmiş, canlı ve ölü hücreler sayılarak canlılık oranı (%), jenerasyon süresi (saat) ve büyüme oranı (gün) hesaplanmıştır. İki reaktörden aynı anda alınan örnek solüsyonlar için ölçümler üç kez tekrarlanmıştır. Alınan örnek solüsyonun geri kalanı ise 12000 rpm de 10 dakika süre ile santrifüj edilerek çöktürülmüş ve bu şekilde hücre hacmindeki (Packed cell volume) değişimler kaydedilmiştir. Süpernantantı alınan solüsyondan geriye kalan hücrelerin yaş ve kuru hücre ağırlığı belirlenmiştir. Bu işlemlere yaklaşık 15 gün boyunca devam edilerek, alınan solüsyonlardaki

Steviol glikozit değişimi kuru örnekler üzerinde yapılan HPLC analizi ile belirlenmiştir. HPLC analizi Yücesan ve ark.(2016a) 'da belirtildiği şekilde Ortadoğu Teknik Üniversitesi Merkezi laboratuvarında hizmet alım yolu ile gerçekleştirilmiştir.

#### İstatistik Analizler

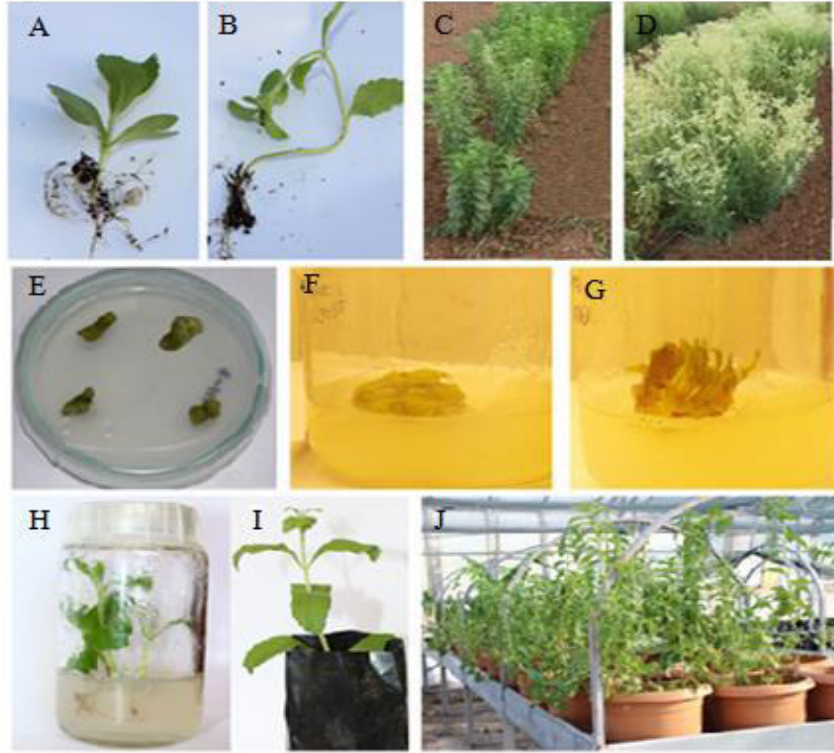
Elde edilen veriler ortama ve standart hataları ile birlikte verilmiş olup, tüm denemelerde replikasyonlardan alınan ortalamalar varyans analizi (one-way ANOVA) ile istatistik olarak test edilmiştir. Ayrıca Tukey' post hoc çoklu karşılaştırma testi ile grup içi farklılıklar belirlenmiştir. İstatistiksel analizler için SPSS programı kullanılmış, testlerin istatistiksel anlamı %95 güven aralığında belirlenmiştir.

#### 4. Sonuç ve Tartışma

##### Gibberellik Asit Uygulamasının Stevia Tohumlarının Çimlenmesi Üzerine Etkileri

Daha öncede belirtildiği üzere Stevia bitkisinin üretiminde karşılaşılan en önemli problem, tohumlarındaki çimlenme veriminin çok düşük olmasıdır. Bu nedenle tohumların tarlada çimlendirilerek ekiminin yapılması çok zor olup, fidelerin sera ortamında yetiştirilerek tarlalara dikilmesi gerekmektedir. Serada tohumdan fide elde edilmesi aşamasında dahi tohumlarda %20-30'luk bir çimlenme başarı sayılmaktadır. Bu nedenle tarlalarda Stevia ekimi için gerekli fidenin elde edilmesi için yüksek miktarda tohuma ihtiyaç duyulmakta ve fide üretme maliyetleri artmaktadır. Bu kapsamda yapılan çalışmada ilk olarak gibberellik asit uygulaması ile tohumlarda çimlenme oranının artırılması hedeflenmiştir. Bunun için değişik konsantrasyonlarda uygulanan gibberellik asitin istatistik olarak kontrol grubuna göre ( $p<0.05$ ) Stevia tohum çimlenmesi üzerinde yüksek oranda bir katkı yaptığı görülmüştür. Kontrol grubunda çimlenmenin ortalama % 28 olduğu çalışmada,

10mg/l, 25mg/l, 50mg/l, 100 mg/l, 200 mg/l ve 500 mg/l gibberellik asit ( $GA_3$ ) uygulanan tohumların sırası ile ortalama %42, %47, %58, %62, %64 ve %65 olduğu belirlenmiştir. Çimlenmenin en yüksek oranına 100 mg/l ve üstü gibberellik asit uygulamasında ulaşmasına rağmen, 200 ve 500 mg/l  $GA_3$  uygulamalarının çimlenme üzerindeki etkisinin birbiri arasında istatistik olarak anlamsız olduğu bulunmuştur. Ayrıca bu yüksek düzeydeki gibberellik asit uygulamalarının çimlenmeyi artırmasına rağmen, fide boyutuna ulaşmasına negatif yönde bir etki yaptığı gözlenmiştir. Özellikle 100mg/l ve üstü uygulamalarda çimlenen tohumlardan çıkan fidelerin gövdelerinde çok hızlı uzamanın meydana geldiği görülmüştür. Bu fidelerin gövdelerinin son derece ince olup bitkinin dik durmasını sağlayacak güçte olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 1). Bu nedenle yüksek gibberellik asit altında çimlenen fidelerden birçoğunun gelişimlerinin bir süre sonra durduğu ve daha fazla büyüyemeden öldüğü gözlenmiştir. Kontrol grubunda çimlenen tohumlardan uygun fide haline gelenlerin oranının %18 olduğu belirlenmiş, gibberellik asit uygulamasında ise bu oran sırası ile %36, %39, %48, %24, %13 ve %11 olarak ölçülmüştür. Bu durumda en uygun gibberellik asit uygulamasının 50 mg/l olduğu belirlenmiştir (Şekil 1). Gibberellik asit tohumlardaki dormansiyi kırmada çok yaygın kullanılan bir hormondur. Çimlenme sırasında gen ifadesini artıran bu hormon hem tohum kabuğunun incelmelerini hem de endospermdeki besin maddelerinin parçalanarak embriyoya gerekli enerjiyi sağlayan hidrolitik enzimlerin açığa çıkmasını sağlamaktadır. Gibberellik asit uygulamasının bitkilerde hücre uzaması ve bölünmesini hızlandırdığı bu nedenle bir çok tarımsal bitkide ince gövdeli, uzun boylu bitkilerin elde edilmesinde kullanıldığı daha önce bir çok raporda belirtilmiştir (Gupta ve Chakrabarty 2013'de derlenmiştir).



**Şekil 1.** 100 mg/l ve üzeri Gibberellik asit hormon uygulamasının kontrol grubuna (A) göre kıvrımlı, ince gövdeli ve uzun fidelerin (B) elde edilmesini sağlamıştır. Tokat şartlarında tarlaya ekilen fidelerin gelişimleri (C) ve çiçeklenme zamanı (D) bitkinin bu iklim kuşağında verimli bir şekilde büyüyebileceğini göstermiştir. Doku kültürü çalışmaları ile *Stevia rebaudiana* bitkisinin kallus indüksiyonu (E), gelişimi (F) sürgün (G) ve kök (H) rejenerasyonu ile ticari boyutta fidenin üretilmesi mümkün olmuştur (I). Üretilen fidelerin sera ortamında test edilmesi (J) stevia üretiminin sera koşullarında da önemli potansiyeli olduğunu göstermiştir.

**Figure 1.** Gibberellic acid treatment over 100mg/L (B) caused formation long and thin *Stevia rebaudiana* seedlings compared to control (A). Yield performance (C) and flowering time (D) of *Stevia rebaudiana* seedlings in field condition indicated adaptation success of this species to Tokat province. Callus induction (E), development (F), shoot (G) and root (H) regeneration enabled to produce *Stevia rebaudiana* seedlings at commercial scale. Regenerated seedlings grown in greenhouse revealed production potential of this species in controlled condition (I).

### **Stevia'nın Doku Kültürü ile İn Vitro Üretimi için Kallus İndüksiyonu**

*Stevia*'nın tohumdan fide üretiminden yeterli düzeyde randıman alınmamasının yanında, tohumdan elde edilen fidelerdeki genetik varyasyonda elde edilecek Steviol glikozit miktarında dalgalanmalara sebep olmaktadır. Tüm bu sorunları giderecek en önemli alternatif yöntem bitki doku kültürü ile klonal ve çok miktarda fide üretimidir. Bu çalışma kapsamında

*in vitro* koşullarda *Stevia*'nın mikroüretim potansiyelinin araştırılması ve bu sayede çok sayıda *Stevia* fidesinin mikroüretim yolu ile elde edilmesi hedeflenmiştir. Bunun için yapraklardan kallus elde edilmesinden sonra rejenerasyonla fide elde edilmesini sağlayan indirek organogenez yöntemi seçilmiştir. Yöntem için 20 adet oksin (2,4-D ve NAA) ve sitokinin (BAP) hormon kombinasyonunun kallus indüksiyon performansları değerlendirilmiş olup, tüm hormon



uygulamaları kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde kallus üretimini sağlamıştır. Çizelge 1’de gösterildiği üzere, istatistiki olarak anlamlı farklılık gösteren ( $p<0.05$ ) en yüksek kallus indüksiyonu, yaprakların doku kültürü ortamına alınmasından 3 hafta sonra NAA (10.0 mg/l) ve BAP (8.0 mg/l) kombinasyonundan elde edilmiştir. Bu konsantrasyonda kallusların morfolojisi yeşil renkte ve sıkı globular yapıda olduğu gözlenmiştir (Şekil 1). Diğer hormon konsantrasyonlarından 2,4D ile NAA kombinasyonları da yüksek oranda kallus indüksiyonu göstermesine karşın 2,4D ile BAP kombinasyonları en düşük kallus oluşturan ortamlar olmuştur. Alt kültürlerden sonra kallusun en hızlı büyüdüğü ortam yine NAA (10.0 mg/l) ve BA (8.0 mg/l) kombinasyonlarında gözlenmiştir. Denenen tüm hormon konsantrasyonları daha önceki çalışmalar ile paralel sonuçlar ortaya koymuştur (Sairkar ve ark.,2009; Janarthanam ve ark., 2009; Preethi ve ark. 2011; Mathur ve Shekhawat., 2013; Gauchan.,2014).

#### **Kallustan Sürgün ve Kök Rejenerasyonu**

Yaprakların doku kültürüne aktarılmasından itibaren, 6 hafta boyunca büyütülen kalluslar (Şekil 1) önce sürgün oluşumu için değişik konsantrasyonlarda BAP (0.1-2 mg/l) ve NAA (1-5mg/l) bulunan ortamlara transfer edilerek rejenerasyon çalışmalarına başlanmıştır. Elde edilen veriler tüm uygulamaların kontrol grubuna göre istatistiki olarak anlamlı bir fark oluşturduğunu göstermiş, kalluslardan en yüksek sayıda sürgün indüksiyonunun 4mg/l BA ile 1mg/l NAA (Şekil1) bulunan kültür ortamında geliştiği gözlenmiştir. Buna karşın oluşan sürgün sayısı ve sürgünlerin uzunlukları açısından en yüksek oran sadece BAP (2-4-5 mg/l) bulunan ortamlarda elde edilmiştir (Çizelge 2). Bu durum kallusların ilk olarak 4 mg/l BA ile 1 mg/l NAA ortamında bekletilmeleri ardından sadece BAP bulunan ortamlara altkültür edilmesinin hem sürgün oluşumuna hem de hızlı sürgün gelişimine katkı sağlayacağını göstermiştir. Sürgünler daha sonra birbirinden ayrılarak ayrı tüpler içerisinde değişik oranlarda IBA (0.1-3 mg/l) ve NAA (0.1-

3 mg/l) bulunan ortamlara aktarılmışlardır. Gerek kök indüksiyonu gerekse oluşan kök sayısı ve uzunluğu açısından en iyi sonuç 2mg/l IBA’nın (Çizelge 3) bulunduğu ortamdan elde edilmiştir (Şekil 1). Denenen tüm ortamlar yüksek oranda kök gelişimi gösterse de, NAA ortamına konan sürgünlerin çoğunda tekrardan kallus oluşumu gözlenmiştir. Bu durumda sürgünlerin IBA ortamında köklendirilmesinin en uygun yaklaşım olacağı sonucuna varılmıştır. Steviada doku kültürü ortamında sürgün ve kök gelimi genelde bitkilerin node-internod ve sürgün ucu kısımları kullanılarak araştırılmıştır (Janarthanam ve ark., 2009; Sairkar ve ark.,2009; Patel ve ark., 2009; Preethi ve ark., 2011; Razak ve ark., 2014). Ancak bu bitkisel materyaller yine Stevia bitkilerinin varlığına ihtiyaç duyduğundan doku kültürü ile fide elde edilmesinin sürdürülebilirliğini negatif yönde etkilemektedir. Oysa yapraktan elde edilecek kallusların rejenerasyon kapasitesi, Stevia bitkisine ihtiyaç duymadan sınırsız sayıda fide üretimini mümkün kılmaktadır. Elde edilecek kallusların bazıları kök ve sürgün oluşumu için indüklenirken, geri kalan kallus dokusundan hücre süspansiyonu ile çok sayıda yeni kallusun elde edilmesi mümkündür.

#### **Stevia rebaudiana Bertoni Bitkisinin Tokat Şartlarına Adaptasyonu**

Çalışmanın en önemli ayaklarından biriside *Stevia rebaudiana* bitkisinin Tokat ili iklimsel koşullarına adaptasyonunun test edilmesidir. Bunun için çalışmada çimlendirilen tohumlardan elde edilen fideler tarlaya ekilerek bir büyüme sezonundaki gelişim ve verim kapasiteleri test edilmiştir. Toprağa 4 tekrar halinde Nisan 2016 ortalarında ekilen 400 adet Stevia fidesinin gelişimleri çiçeklendiği 20 hafta sonuna kadar takip edilmiştir. Tarla denemelerinde tekrarlardan ölçülen tüm parametrelerden elde edilen veriler ANOVA ile karşılaştırılarak anlamlı bir farklılığın bulunmadığı belirlenmiştir. Yaklaşık 150 (Şekil 1) günde çiçeklenme evresine ulaşan fidelerin ortalama ağırlığı  $480 \pm 78$  gr, boyları ise  $68 \pm 8.0$  cm’e ulaşmıştır. Bitki başına dal sayısı  $9.4 \pm 0.6$  iken yaprak sayısı  $13 \pm 3.2$  olarak hesaplanmıştır. Çiçeklenme evresine ulaşan fidelerin ortalama yaş

yaprak miktarının hektar başına 4.8 ton olduğu hesaplanmıştır. Steviol glikozit miktarının bitkide en yüksek olduğu dönemin çiçeklenin ilk görüldüğü dönemler olduğu daha önceki raporlarda belirtilmiştir (Yadav ve ark 2011). Çalışmada çiçeklenmenin ilk görüldüğü dönemde toplanan yapraklarda Steviol glikozit miktarının bir gram kuru yaprakta 42 mg olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4). Bu oranın yaklaşık %30'unun en değerli Steviol glikozit olan RebA'den oluşması kullanılan çeşidinde tatlandırıcı üretimi için çok başarılı olduğunu göstermiştir (Lemus-Mondaca ve ark. 2012). Turgut ve ark., (2015) aynı bitkinin Antalya koşullarındaki adaptasyon çalışmalarını yapmış, 160 günlük çiçeklenme evresi gösteren bitkilerin çiçeklenme evresine kadar ortalama bitki boyunun 98 cm, ağırlığının ise 720 gr'a ulaştığını bildirmiştir. Aynı çalışmada Antalya'da Stevia'nın hektarda 8.6 ton yaş yaprak üretebileceği hesaplanmıştır. Bu sonuçlara kıyasla Tokat'ta Stevia üretimin verim açısından düşük olduğu görülmektedir. Ancak Yücesan ve ark. (2016 b) yaptığı çalışmada Yalova koşullarındaki elde edilen hektar başına 2.4 ton verime kıyasla Tokat şartlarında Stevia veriminin oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Elde edilen sonuçlar ve kıyaslamalar Stevia bitkisinin Tokat ili iklimsel koşullarına rahat adapte olduğu göstermiştir. Stevia esasen çok yıllık bir bitki olup hasat sonrası toprakta kalan köklerden, dondurucu soğukların yaşanmadığı bölgelerde her yıl yeni fidelerin geliştiği ve bu şekilde üç yıl boyunca yüksek verimde Stevia yaprağının hasat edilebileceği vurgulanmıştır (Yadav ve ark 2011). Tokat meyve ve bağcılığın çok yoğun yapıldığı bir bölge olup uzun kış ortalama sıcaklığının iki derecenin altına düşmediği bilinmektedir (Gebeloğlu ve ark., 2011). Bu durumda Tokat yöresindeki meyve ağaçlarının altına ekilecek Stevia'nın yıllar boyunca çiftçilere yüksek ek gelir sağlaması mümkündür. Bu anlamda Stevia'nın bölgeye ekonomik anlamda ciddi katkı yapma potansiyeli bulunmaktadır.

Çalışmada doku kültüründen elde edilen fidelerde sera ortamında büyütülerek bu bitkisinin gelişim ve verim parametreleri incelenmiştir.

Bunun için tarlaya ekim ile aynı zamanda sera ortamına aktarılan 200 adet kallustan rejener edilmiş Stevia fidesi (Şekil 1), tarla ortamına benzer şekilde 5.5 ay sonra çiçeklenme evresine ulaşmıştır. Ekilen fidelerin bu süre sonundaki ortalama boyu  $104 \pm 12$  cm, ağırlığı ise  $832 \pm 103$  gr'a ulaşmıştır. Bitki başına dal sayısı ( $8.2 \pm 2.6$ ) tarla koşuluna yakın bir değer göstermiştir. Bitki başına düşen yaprak sayısı ise  $16 \pm 4.2$  olarak hesaplanmıştır. Bu durum sera koşullarında üretimin tokat koşullarında çok daha verimli olduğunu göstermektedir. Sera denemesindeki toplam Steviol glikozit miktarı ( $46.2$  mg/g.kuru yaprak) ise tarla denemesine göre istatistiki olarak yüksek bulunmuştur ( $p < 0.05$ ) (Çizelge 4). Daha önceki çalışmalarda tohumdan elde edilen fidelerdeki genetik varyasyonun elde edilecek Steviol glikozit miktarında dalgalanmalara sebep olduğu bildirilmiştir. Bu durum zaman zaman Stevia üretiminde azalmalara ve elde edilen üründe kalite problemlerine sebep olabileceği rapor edilmiştir (Abdullateef ve Osman 2011; Yücesan ve ark, 2016 a). Doku kültüründen elde edilen fidelerin klonal olması her dönem yüksek miktarda ve aynı kalitede Steviol glikozit üretilmesi açısından önemlidir. Sera koşullarında elde edilen fidelerdeki Steviol glikozit miktarının yetiştirme koşulları yanında klonal üretimden de kaynaklandığı söylenebilir. Stevia'nın son yıllarda ülkemizde gördüğü ilgi ve elde edilen Steviol glikozitlerin yüksek fiyatlarda alıcı bulması ve pazarlama açısından sıkıntısının bulunmaması, Stevia'nın seralarda üretiminin kazançlı bir alternatif olabileceğini göstermektedir. Özellikle son yıllarda Stevia'nın çaylara katılarak kalorisiz tatlı poşet çay yapımında kullanılabileceğine dair öngörüler ilerleyen yıllarda özellikle Karadeniz bölgesinde Stevia talebinin katlanarak büyüyeceğini göstermektedir. Bu nedenle gerek sera gerekse tarlalarda yetiştirilecek Stevia'nın karlılık açısından ciddi bir alternatif yaratacağı açıktır.

#### **Hücre Süspansiyonu ile Biyoreaktörde Steviol Glikozit Üretimi**

Steviol glikozit üretiminin genelde yüksek maliyetli fide üretimine dayanması ve iklimsel

gereksinimler nedeni ile bu bitkinin üretimi birçok bölge için zor ve pahalı olabilmektedir. Bu nedenle bitkisel kökenli tatlandırıcı üretmek için Stevia bitkisi yerine hücrelerinin üretilmesi uygun bir alternatif olarak karşımızda durmaktadır. Bu kapsamda Stevia'nın hücre süspansiyon kültürü daha önce Mathur ve Shekhawat, (2013), Sharma ve ark (2015) ve Dwivedi ve ark (2016) tarafından çalışılmış hücre süspansiyon çalışmaları kallus üretim amaçlı optimize edilmiştir. Ancak bu çalışmaların hiçbirisinde biyoreaktörlerde hücre süspansiyonu ile Steviol glikozit üretim konusunda bir çalışma yapılmamıştır. Bu nedenle çalışmada Gaziosmanpaşa Üniversitesi Biyomühendislik bölümünde bulunan Biostat B-plus biyoreaktöründe daha önce erlende optimize edilmiş Stevia hücre süspansiyon ortamlarının yükseltme (scale-up) çalışması yapılmıştır. Çalışmada 10 gr /l kallus ile başlanan 4 lt'lik Biostat B plus biyoreaktörlerinde kallusların birinci günden itibaren çözünerek hücresel kütleler haline geldiği, üçüncü günde ise tamamen çözüldüğü gözlenmiştir. Bu safhada kremi renkte olan solüsyon ilerleyen safhalarda açık kahverengi haline dönmüştür (Şekil 2). Biyoreaktörde kallusların tamamen çözünmesi ile hücresel hacim %12, kuru hücre ağırlık değeri ise 6.4 gr/l olarak ölçülmüştür. Hücresel süspansiyon lag fazını geçirmeden logaritmik faza geçerek 6 gün boyunca bu evrede kalmış ve bu safhanın sonunda %81'lik hücresel hacme ulaştığı görülmüştür (Şekil 3). Karıştırıcı hızının kallusların çözünmesinden sonra 150 rpm'e çıkarılması solüsyonda köpürmelere sebep olmuştur (Şekil 2). Bu nedenle solüsyondaki köpürme 2 cm boyutlarına ulaştığında anti köpük ajanı solüsyona (Antifoam C Emulsion) eklenerek köpük oluşumu engellenmiştir. Köpük oluşumu biyoreaktör çalışmalarında sık rastlanan bir durum olup (Gupta ve ark., 2013; Gallego ve ark.,2015) reaktörün havalandırılmasından ve karbonhidrat içeriğinden kaynaklandığı bilinmektedir. Hücresel üretim, prosesin başlamasından 10 gün sonra yavaşlamış ancak büyümeye devam ederek maksimum %88'lik hücresel hacme ve %37.8 gr/l kuru ağırlığa ulaşmıştır (Şekil 3). Jenerasyon zamanının 22.4 saat, büyüme oranının ise 2.85/gün

olduğu çalışmada 40 gr ile başlanan biyoreaktör prosesinde 20 gün sonunda reaktör başına  $268 \pm 34$  gr yaş hücresel üretim gerçekleşmiştir (Şekil 2). Hücrelerin canlılığı başlangıç fazında yüzde 90'larda iken logaritmik büyüme fazında %80-85 aralığına düşmüştür. Durağan fazda ise %60 dolaylarına inen hücresel canlılık proses sonunda %40 seviyelerine düşmüştür (Şekil 3). Hücrelerin şekilleri proses boyunca geniş ve yuvarlak olduğu tespit edilmiş, özellikle logaritmik büyüme fazında hücre boyutlarının ilk safhalara göre daha küçük olduğu tespit edilmiştir. Biyoreaktörden elde edilen sonuçların hemen hepsi Mathur ve Shekhawat, (2013) çalışmasına çok paralel sonuçlar ortaya koymuştur. Ancak belirtilen çalışmaya kıyasla Steviol glikozit miktarı açısından biyoreaktörde çok daha yüksek değerlere ulaşıldığı görülmüştür. Kullanılan bitkisel materyal kaynaklı olduğu düşünülen Steviol glikozit miktarı hücre süspansiyonun başlangıç aşamasında kuru ağırlık başına  $2.52 \pm 0.67$  mg olarak ölçülmüştür (Çizelge 4). Aynı değer logaritmik büyüme fazının başı, ortası ve sonunda sırası ile  $2.48 \pm 0.87$  mg  $2.26 \pm 0.67$  ve  $2.08 \pm 0.25$  olarak ölçülmüştür. Steviol glikozit miktarı durağan fazda ise azalarak 1.19 mg/g kuru ağırlık değerine gerilemiştir (Şekil 3). Bu değerler daha önceki çalışmalarda kallusların Stevia değerine denk gelmekte olup (Sharma ve ark.,2015 ve Dwivedi ve ark .,2016), tarla ve sera koşullarında yetiştirilen bitkilerin yapraklardaki Steviol glikozit miktarı ile karşılaştırıldığında çok düşük olduğu görülmüştür. Bu nedenle hücresel süspansiyon ile Steviol glikozit üretiminin çok verimli olmadığı düşünülebilir. Steviol glikozitler diterpen ailesine ait sekonder metabolitlerdir. Dolayısı ile üretimleri dokulara özgü olup genelde en büyük birikimlerini çiçeklenmeden önce yapraklarda yapmaktadırlar. Yaprakta Steviol glikozit miktarı gr kuru yaprakta 30-40 mg arasında bulunurken gövdede bu değer 2-4 mg düşmektedir (Dwivedi ve ark., 2016). Kallus dokusuna ait hücrelerde yüksek oranda Steviol glikozit bulunmaması normal bir durumdur. Ancak Steviol glikozitlerin sentez yolu gibberellik asit yolu ile aynı yolağı takip etmektedir (Yadav ve ark.,2011). Dolayısı ile farklı hormonal

uygulamalar ya da Steviol glikozit salınımını artıracak kimyasallar kullanılarak hücre süspansiyon kültüründen yüksek düzeyde verim alınması mümkündür. Nitekim Sharma ve ark., (2015) metil jasmonat ile  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  uygulamasının Steviol glikozit miktarını hücre süspansiyonunda 5 mg'a kadar çıkardığını tespit etmiştir. Dolayısı

ile bu tür uyarıcı etkili ortamlarda, yüksek oranlarda yapılacak hücresel üretimin Steviol glikozit üretimi açısından ciddi bir potansiyeli bulunmaktadır. Steviol glikozit miktarındaki azlığa rağmen iki haftalık bir süre zarfında elde edilen 5 katlık hücresel artış bu potansiyelin en büyük göstergesidir.

**Çizelge 4.** Tarla ve sera denemesi ile hücre süspansiyon kültüründe kuru ağırlık (KA) başına düşen Steviol glikozit miktarı

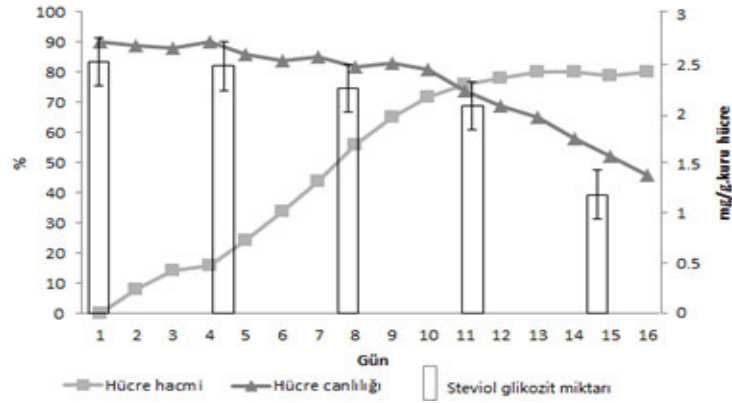
**Table 4.** Steviol glucoside (mg/dry weight) content of *Stevia rebaudiana* grown in field, greenhouse and cell suspension culture

Deneme	Bitki organı	Stevioside (mg/g KA)	RebA (mg/g KA)	Reb B (mg/g KA)	Reb C (mg/g KA)	Toplam SG (mg/g KA)
Tarla	Yaprak	22.3 ± 3.8	12.2 ± 0.8	1.6 ± 0.6	5.2 ± 0.9	42.3
Sera	Yaprak	24.2 ± 2.4	13.5 ± 1.1	2.2 ± 1.3	6.3 ± 1.6	46.4
Hücre kültürü	Başlangıç fazı	1.4 ± 0.4	0.7 ± 0.1	0.0 ± 0	0.3 ± 0.2	2.5
	Büyüme fazı	1.4 ± 0.2	0.6 ± 0.1	0.0 ± 0	0.3 ± 0.1	2.3
	Durağan faz	0.8 ± 0.2	0.3 ± 0.0	0.0 ± 0	0.1 ± 0.0	1.2



**Şekil 2.** *Stevia rebaudiana* bitkisinin hücre süspansiyon kültürünün Biostat B-plus biyoreaktöründe (A) üretimi sırasındaki başlangıç (B), logaritmik büyüme (C) ve durağan (D) fazlarının sonunda elde edilen hücresel üretim miktarı (E).

**Figure 2.** Cell suspension culture of *Stevia rebaudiana* in Biostat B-plus (A) with initiation (B), logarithmic growth (C) and stable (D) phases. Figure E represented the cell yield at the end of the suspension culture in bioreactor.



**Şekil 3.** Hücre süspansiyonunda *Stevia rebaudiana* 'nın hücresel miktar, canlılık (%) ve toplam Steviol glikozit (mg/g kuru hücre ağırlığı) değişimleri.

**Figure 3.** Changes in cellular quantity, vitality and steviol glycoside content in suspension culture of *Stevia rebaudiana*.

### 5. Sonuç ve Öneriler

Stevia'nın tohum çimlenmesi üzerine gibberellik asit uygulamasının etkisinin araştırıldığı çalışmada, en uygun konsantrasyonun hem çimlenme hem de gelişim açısından 50mg/l olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, indirek organogenez ile vejetatif olarak fide üretiminin optimize edildiği çalışmada yapraktan kallus, kök ve sürgün gelişimleri için en uygun hormonal kombinasyonlarda belirlenmiştir. Stevia'nın adaptasyon çalışmaları Tokat bölgesinde 4.8 ton/hektarlık bir verimin gerçekleştiğini, böylece meyveciliğin yoğun yapıldığı yörede ağaçlardan oluşan bahçelere yapılacak Stevia ekiminin bölgede önemli bir alternatif kazanç sağlama kapasitesi olduğunu göstermiştir. Çalışmada ayrıca hücre süspansiyonu ile Steviol glikozit üretimi için biyoreaktörde optimizasyon çalışmaları yürütülmüştür. Biyoreaktörde 50 mg kallus ile başlanan reaksiyonun iki hafta içine 5 kat dan fazla hücresel üretim gerçekleştirdiği ancak hücresel Steviol glikozit miktarının (2mg / kuru ağırlık) normal bitki yaprağına (> 40 mg / kuru ağırlık) göre çok düşük oranda Steviol glikozit barındırdığı görülmüştür. Bitkisel tatlandırıcı üretiminde önemli bir alternatif olan hücresel süspansiyonun denenecek çeşitli hormonal uygulamalar ile Steviol glikozit miktarının artırılması mümkün olup ilerleyen çalışmaların bu yönde yapılması önerilmektedir.

### Teşekkür

Çalışma TÜBİTAK 2241-A sanayi odaklı lisans bitirme tezi kapsamında 2 proje ile desteklenmiştir (1139B411502423-1139B411502423).

### Kaynaklar

- Abdullateef RA and Osman M (2011). Influence of Genetic Variation on Morphological Diversity in Accessions of *Stevia Rebaudiana* Bertoni. *International Journal of Biology* 3(3); 66-72
- Dwivedi S, Alam A and Shekhawat GS (2016). Antioxidant response of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni (Angiosperms; Asteraceae) during developing phase of suspension cell culture. *Plant Science Today* 3(2): 115-123.
- Gallego A, Imseng N, Bonfill M, Cusido RM, Palazon J, Eibl R, Moyano E (2015). Development of a hazel cell culture-based paclitaxel and baccatin III production process on a benchtop scale. *J Biotechnol.* 195:93-102.
- Gauchan D.P, Dhakal A, Sharma N, Bhandari S, Maskey E, Shrestha N, Gautam R, Giri S and Gurung S (2014) Regenerative callus induction and biochemical analysis of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Journal of Advanced Laboratory Research in Biology* 5(3): 41-45
- Gebeloğlu N, Cangı R, Edizer Y, Saygılı M, Yağcı A, (2011) Tokat İli Yaş Meyve Ve Sebze Sektörü Rekabet Analizi. Tokat Meyve Sebze Ürünleri Tarımsal Üreticiler Birliği Yayın No:1
- Gupta R and Chakrabarty SK (2013) Gibberellic acid in plant. Still a mystery unresolved. *Plant Signal Behav.* 8(9): e25504.
- Swithers SE (2013) Artificial sweeteners produce the counterintuitive effect of inducing metabolic derangements. *Trends Endocrinol Metab.* 24(9): 431-441
- İnanç L ve Çınar İ (2009) Alternatif Doğal Tatlandırıcı: Stevia. *GIDA* 34 (6): 411-415

- Janarthanam B, Gopalakrishnan M, Lakshmi Sai G and Sekar T (2009) Plant Regeneration from leaf Derived Callus of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Tissue Cult. Biotech.* 19(2): 133-141
- Khalil SA, Zamir R, and Ahmad N (2014). Selection of suitable propagation method for consistent plantlets production in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Saudi Journal of Biological Sciences.* 21(6):566-573.
- Lemus-Mondaca R, Vega-Gálvez A, Zura-Bravo L, Ah-Hen K (2012). *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chemistry* 132: 1121–1132.
- Mathur S and Shekhawat GS (2013) Establishment and characterization of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) cell suspension culture: an in vitro approach for production of stevioside. *Acta Physiol Plant.* 35:931–939
- Murashige T. and Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- Patel RM and Shah RR (2009). Regeneration of stevia plant through callus culture. *Indian J Pharm Sci.* 71:46-50
- Preethi D, Sridhar TM, and Naidu CV (2011). Efficient Protocol for Indirect Shoot Regeneration from Leaf Explants of *Stevia rebaudiana* (Bert.) – An Important Calorie Free Biosweetner. *Journal of Phytology*, 3(5): 56-60
- Razak A, Ong CB, Sing Yu T Li Kiaw and Lau L.K (2014) In vitro Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni in Malaysia. *Brazilian Archives Of Biology And Technology.* 57(1) 23-28
- Rodriguez-Monroy M and Galindo E (1999) Broth rheology, growth and metabolite production of *Beta vulgaris* suspension culture: a comparative study between cultures grown in shake flasks and in stirred tank. *Enz. Microb. Technol.* 24:687–693
- Saikar P, Chandravanshi MK, Shukla NP and Mehrotra NN (2009). Mass production of an economically important medicinal plant *Stevia rebaudiana* using in vitro propagation techniques. *Journal of Medicinal Plants Research* 3(4): 266-270
- Sharma N, Gauchan DP, Dhakal A, Luitel A, Shakya S, Shakya R (2015). Establishment of Regenerative Callus, Cell Suspension System and Molecular Characterization of *Stevia Rebaudiana* Bertoni for the Production of Stevioside in In Vitro. *IJRASET* 3(3);133-144
- Turgut K, Ucar E, Tutuncu B, Ozyigit Y, (2015). *Stevia rebaudiana* Bertoni could be an alternative crop in the Mediterranean region of Turkey. In: Geuns, J.M.C., Ceunen, S. (Eds.), *Stevia: Growth in Knowledge and Taste*, Proceedings of the 8th EUSTAS Stevia Symposium.
- Yadav AK, Singh S, Dhyani D, Ahuja PS, (2011). A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. *Can. J. Plant Sci.* 91, 1–27.
- Yücesan B, Büyükgöçmen R, Mohammed A, Sameeullah M, Altuğ C, Gürel S, Gürel E (2016 a) An efficient regeneration system and Steviol glycoside analysis of *Stevia rebaudiana* Bertoni, a source of natural high-intensity sweetener. *In Vitro Cell.Dev.Biol. Plant* 52:330–337
- Yücesan B, Mohammed A, Büyükgöçmen R, Altuğ C, Kavas Ö, Gürel S and Gürel E (2016b) In vitro and ex vitro propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni with high Rebaudioside-A content-A commercial scale application. *Scientia Horticulturae* 203:20–28