T.C.
DİCLE ÜNİVERİSTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENDEMİK TUNCELİ SARIMSAĞININ (*ALLIUM TUNCELIANUM*) OLGUNLAŞMAMIŞ EMBRİYOLARININ *IN VITRO* REJENERASYONU ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

Ümit ACAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR
Ocak 2018

T.C

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

DİYARBAKIR

Ümit ACAY tarafından yapılan "Endemik Tunceli Sarımsağının (*Allium tuncelianum*) Olgunlaşmamış Embriyolarının *In Vitro* Rejenerasyonu Üzerine Çalışmalar" konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Tarla Bitkileri Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyesinin

Ünvanı Adı Soyadı

Başkan: Doç. Dr. Özlem TONÇER (Danışman)

Üye : Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR

Üye :Doç. Dr. Gültekin ÖZDEMİR

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 17/01/2018

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../...../20

Doç.Dr.Sevtap SÜMER EKER

ENSTİTÜ MÜDÜR V.

(MÜHÜR)

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamım tüm aşamalarında yanımda olan bilgi birikimini benimle paylaşan, laboratuvar çalışmalarında destek olan, çalışma materyalinin temini, tezin yürütülmesi ve yazımında desteklerini esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Süleyman KIZIL'a ve Tez Danışmanım Sayın Doç. Dr. Özlem TONÇER'e teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Her türlü zorlukta yanımda olan bana desteklerini hayatımın her aşamasında hissettiğim aileme teşekkür ederim.

Ümit ACAY

ŞUBAT 2018

İÇİNDEKİLER

		Sayfa
TEŞEKKÜR		I
İÇİNDEKİLER		II
ÖZET		III
ABSTRACT		IV
ÇİZELGE LİSTESİ		V
ŞEKİL LİSTESİ		VII
KISALTMA VE SİMGELER		IX
1.	**GİRİŞ**	1
2.	**ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR**	7
3.	**MATERYAL VE METOT**	13
3.1.	Materyal	13
3.2.	Metot	14
3.2.1	Eksplantların Ön Hazırlığı ve Sterilizasyonu	14
3.2.2.	Çalışmada kullanılan eksplantlar	14
3.2.3.	Bitki Büyüme Düzenleyicileri ve Ortamlar	15
3.2.4.	Kültür Koşulları	17
3.2.5.	*In vitro* Çalışmalar	17
3.2.5.1.	Bitki Rejenerasyonu	17
3.3.	İstatistik Değerlendirmeler	17
4.	**BULGULAR VE TARTIŞMA**	19
4.1.	Olgun *A.tuncelianum* tohumlarından *in vitro* çimlendirme çalışmaları	19
4.2.	Olgunlaşmamış embriyolarda rejenerasyon çalışmaları..	21
4.2.1.	Farklı oranda 2,4-D içeren MS ortamda rejenerasyon çalışmaları	21
4.2.2.	Farklı oranda BAP içeren MS ortamda rejenerasyon çalışmaları	23
4.2.3.	Farklı oranda BAP + 0.5 mg/L NAA içeren MS ortamda rejenerasyon çalışmaları	24
4.2.4.	Farklı oranda BAP +300 mg/L Putresin içeren MS ortamda rejenerasyon çalışmaları	26
4.2.5.	Farklı oranda BAP + 300 mg/L Putresin + 0.5 mg/L NAA içeren MS ortamda rejenerasyon çalışmaları	27
4.2.6.	Farklı hormon uygulamalarının *A. tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarının rejenerasyonu üzerine etkisi	29
4.3.	**TARTIŞMA**	33
5.	**SONUÇ VE ÖNERİLER**	37
6.	**KAYNAKLAR**	39
ÖZGEÇMİŞ		45

ÖZET

ENDEMİK TUNCELİ SARIMSAĞININ (*ALLIUM TUNCELIANUM*) OLGUNLAŞMAMIŞ EMBRİYOLARININ *IN VITRO* REJENERASYONU ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÜMİT ACAY

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARLA BİTKİLERİ ANABİLIM DALI

2018

Tunceli sarımsağı (*Allium tuncelianum* KOLMANN) oldukça sınırlı bir fitocoğrafik alanda yayılış gösteren ekonomik önemi yüksek bir soğanlı bitkidir. Bu çalışma ile bitkinin olgunlaşmamış embriyolarında farklı hormon uygulamaları ile mikroçoğaltım yapılarak uygun hormon ve dozun belirlenmesine çalışılmıştır. Bu amaçla (i) 0.3, 0.5, 0.7, 0.9 ve 1.2 mg/L 2,4-D, (ii) 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 ve 0.9 mg/L BAP, (iii) 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 ve 0.9 mg/L BAP+ 0.5 mg/L NAA, (iv) 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 ve 0.9 mg/L BAP + 300 mg/L Putresin (v) 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 ve 0.9 mg/L BAP + 0.5 mg/l NAA + 300 mg/L Putresin kullanılmıştır. Araştırma sonucunda 2,4-D uygulamasında diğer uygulamalar göre yüksek düzeyde kallus oluşumu gözlenmiştir. En yüksek kallus oranı %20 ile 0.3 ve 1.2 mg/L dozlarından elde edilmiştir. BAP, BAP + 0.5 mg/L NAA, BAP + 300 mg/L Putresin, BAP + 300 mg/L Putresin + 0.5 mg/L NAA uygulamalarından olgunlaşmamış embriyodan direk rejenerasyon ile soğan oluşumu gerçekleşmiştir. 2,4-D uygulamasından elde edilen somatik embriyolar soğan büyütme ortamına (MS + %3 şeker ve %3 aktif karbon) alınarak büyütülmüş ve toprağa aktarılmışlardır.

Anahtar Kelimeler: *Allium tuncelianum* Kolmann, mikroçoğaltım, olgunlaşmamış embriyo, putresin, Tunceli sarımsağı.

ABSTRACT

STUDIES ON *IN VITRO* REGENERATION OF IMMATURED EMBRYOS OF ENDEMIC *ALLIUM TUNCELIANUM* KOLLMAN

MSc THESIS

ÜMİT ACAY

DEPARTMENT OF FIELD CROPS
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DİCLE UNIVERSITY

2018

Tunceli garlic (*Allium tuncelianum* KOLMANN) is a rare spread economically important endemic plant. The aim of this study was to micropropagate immature embryos of Tunceli garlic using. (i) 0.3, 0.5, 0.7, 0.9 and 1.2 mg/L 2,4-D, (ii) 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 and 0.9 mg/L BAP, (iii) 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 and 0.9 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA, (iv) 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 and 0.9 mg/L BAP + 300 mg/L Putresin (v) 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 and 0.9 mg/L BAP + 0.5 mg/l NAA + 300 mg/L Putresin. Calli formation rate of 2,4-D was compared to regeneration on other hormonal treatments. The highest callus formation (20%) was obtained on 0.3 and 1.2 mg/L treatment. The other variant (BAP, BAP + 0.5 mg/L NAA, BAP + 300 mg/L Putrescine, BAP + 300 mg/L Putrescine + 0.5 mg/L NAA) induced bulblets by direct somatic embryogenesis. Somatic embryos obtained on 2,4-D were transferred bulb growth medium (MS + 3% sucrose and 3% active carbon) followed by their transfer to soil.

Key words: *Allium tuncelianum* Kolmann, immatured embriyo, micropropagation, putrescine, Tunceli garlic.

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge No		Sayfa
Çizelge 3.1.	MS (Murashige ve Skoog 1962) ortamında bulunan makro, mikro elementler, vitaminler ve konsantrasyonları	16
Çizelge 3.2.	Kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri ve stok çözelti konsantrasyonları	16
Çizelge 3.3.	Tunceli sarımsağı bitkisinin olgunlaşmamış embriyolarının MS besin ortamında farklı büyüme düzenleyicilerle kurulan denemelerde kullanılan fitohormonlar ve konsantrasyonları	17
Çizelge 4.1.	*A. tuncelianum* olgun tohumlarının farklı ortamlarda çimlenmesine ait ortalama değerler	19
Çizelge 4.2.	Farklı dozlarda 2,4-D uygulamasının *Allium tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarında *in vitro* çimlenme oranı, kallus oranı ve soğancık sayısı bakımından elde edilen Varyans Analiz Tablosu	21
Çizelge 4.3.	Farklı dozlarda 2,4-D uygulamasının *Allium tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarının *in vitro* çimlenme oranı, kallus oluşum oranı ve soğancık sayısı bakımından oluşan ortalama değerler	22
Çizelge 4.4.	Farklı dozlarda BAP uygulamasının *Allium tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarında *in vitro* çimlenme oranı, kallus oranı ve soğancık sayısı bakımından elde edilen ortalama değerlere ait Varyans Analiz Tablosu	23
Çizelge 4.5.	Farklı dozlarda BAP uygulamasının *Allium tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarında çimlenme oranı, kallus oranı ve soğancık sayısı bakımından oluşan ortalama değerler	24
Çizelge 4.6.	Farklı dozlarda BAP + NAA uygulamasının *Allium tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarında *in vitro* çimlenme oranı, kallus oranı ve soğancık sayısı bakımından elde edilen ortalama değerlere ait Varyans Analiz Tablosu	24
Çizelge 4.7.	Farklı dozlarda BAP + NAA uygulamasının *Allium tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarında çimlenme oranı, kallus oranı ve soğancık sayısı bakımından oluşan ortalama değerler	25
Çizelge 4.8.	Farklı dozlarda BAP + 300 mg/L Putresin uygulamasının *Allium tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarında *in vitro* çimlenme oranı, kallus oranı ve soğancık sayısı bakımından elde edilen ortalama değerlere ait Varyans Analiz Tablosu	26
Çizelge 4.9.	Farklı dozlarda BAP + 300 mg/L Putresin uygulamasının *Allium tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarında çimlenme oranı, kallus oranı ve soğancık sayısı bakımından oluşan ortalama değerler	26

Çizelge 4.10. Farklı dozlarda BAP + 300 mg/L Putresin + NAA uygulamasının *Allium tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarında *in vitro* çimlenme oranı, kallus oranı ve soğancık sayısı bakımından elde edilen ortalama değerlere ait Varyans Analiz Tablosu 27

Çizelge 4.11. Farklı dozlarda BAP + 300 mg/L Putresin + NAA uygulamasının *Allium tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarında çimlenme oranı, kallus oranı ve soğancık sayısı bakımından oluşan ortalama değerler 28

Çizelge 4.12. Farklı hormon uygulamalarının *Allium tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarında *in vitro* çimlenme oranı, kallus oranı ve soğancık sayısına ait Varyans Analiz Tablosu 29

Çizelge 4.13. Farklı dozlarda 2,4-D uygulamalarında *Allium tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarından *in vitro* çimlenme oranı bakımından elde edilen ortalama değerler 29

Çizelge 4.14. Farklı hormon uygulamalarının *Allium tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarında *in vitro* çimlenme oranı bakımından oluşan ortalama değerler 30

Çizelge 4.15. Farklı dozlarda 2,4-D uygulamalarında *Allium tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarından *in vitro* kallus oluşum oranı bakımından elde edilen ortalama değerler 31

Çizelge 4.16. Farklı hormon uygulamalarında *Allium tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarından kallus oluşum oranı bakımından elde edilen ortalama değerler 31

Çizelge 4.17. Farklı dozlarda 2,4-D uygulamalarında *Allium tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarından *in vitro* soğancık sayısı bakımından elde edilen ortalama değerler 32

Çizelge 4.18. Farklı hormon uygulamalarının *Allium tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarından *in vitro* soğancık sayısı bakımından elde edilen ortalama değerler 32

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 1.1.	*A. tuncelianum* bitkisinin Tunceli ili Ovacık karayolu üzerinde yol kenarlarındaki yamaçlarda doğal yayılışına ait görünümü	2
Şekil 1.2.	Tunceli sarımsağı bitkisinin Tunceli ve çevresinde yayılış gösterdiği alanlar	3
Şekil 3.1.	*A. tuncelianum* bitkisinin tarla denemesi ve çiçeklenme döneminden görünümü	13
Şekil 3.2.	*A. tuncelianum* bitkisinin hasat sonrası soğanlarının görünümü	13
Şekil 3.3	*In vitro* çalışmaların yapıldığı hazırlık odasının, steril kabin ve bitki büyütme kabinlerinin görünümü	14
Şekil 3.4.	*A. tuncelianum* bitkisinin kültür ortamından görünümü	15
Şekil 3.5.	*A. tuncelianum* bitkisinin laboratuvar ortamına alınan meyveler ve olgunlaşmamış embriyolarına ait görünümü	15
Şekil 4.1.	*A. tuncelianum* tohumlarının MS ortamında 16/8 (a) ve 4 derecede (b) yapılan çimlendirme çalışmalarına ait görünüm	20
Şekil 4.2.	*A. tuncelianum* tohumlarının MS ortamında 16/8 (a) aydınlık ortamda çimlenme sonrası kararma ve 4 °C karanlık ortamda (b) elde edilen sağlıklı çimlendirme sonuçlarına ait görünüm	20
Şekil 4.3.	*A. tuncelianum* tohumlarının MS + %3 aktif karbon içeren ortamda 4 °C karanlıkta çimlenme sonrası soğan oluşumuna ait görünüm	21
Şekil 4.4.	*A. tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarının 2,4-D (1.2 mg/L) içeren ortamda kallus oluşturmasına ait görünüm	23
Şekil 4.5.	*A tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarının BAP 0.5 mg/L uygulamasında sürgün ve soğan oluşumuna ait görünüm	24
Şekil 4.6.	*A. tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarının 0.3 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA uygulamasında soğan ve sürgün oluşumuna ait görünüm	25
Şekil 4.7.	*A. tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarının BAP (0.5 mg/L) + 300 mg/L Putresin (%3) içeren uygulamada soğan ve sürgün oluşumuna ait görünümü	27
Şekil 4.8.	*A. tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarının BAP 0.9 mg/L + NAA 0.5 mg/L + 300 mg/L Putresin (%3) uygulamasında sürgün oluşumuna ait görünüm	28

Şekil 4.9. *A. tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarından elde edilen yavru soğancıklar 31

Şekil 4.10. *A. tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarının 2,4-D (0.30 mg/L) uygulamasından elde edilen soğancıkların büyütme ortamından sürgün oluşumuna ait görünümü 33

KISALTMA VE SİMGELER

µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromol
2,4-D	: 2,4-Diklorofenoksi asetik asit
2iP	: 6-dimetilaminopürin
ABA	: Absisik Asit
B5	: Gamborg B5 Ortamı
BAP	: 6-Benzilaminopurin
cm	: Santimetre
g/L	: Gram/litre
IAA	: İndol 3 asetik Asit
IBA	: İndol 3 bütirik Asit
mg/L	: miligram/litre
mm	: Milimetre
MS	: Murashige and Skoog temel besin ortamı
NAA	: α-Naftalen asetik asit
^{o}C	: Santigrat derece (Celcius)

1. GİRİŞ

Dünyada yaklaşık 4300 civarında olan geofitler, Afrika ve Amerika kıtası, Akdeniz iklimine sahip ülkeler ve Avustralya gibi coğrafik bölgelerde zengin bir yayılış göstermektedirler. Bu durum Türkiye'yi de etkilemekte ve Türkiye florasının da 800'den fazla geofit bitki ile geofitler yönünden zengin olduğu görülmektedir (Özhatay ve ark. 1997, Davis 1988, Güner ve ark. 2000). Akdeniz, Ege, Doğu Karadeniz, Doğu ve Güney Doğu Anadolu Bölgelerinde yayılış gösteren Türkiye geofitlerinin yaklaşık 500 adedi soğanlı bitkiden oluşmaktadır. Tür zenginliği ve endemizm oranı bakımından Nergisgiller (*Amaryllidaceae*), Süsengiller (*Iridaceae*) ve Zambakgiller (*Liliaceae*) familyalarının zengin olduğu belirtilmektedir (Davis 1988).

Türkiye, iklim koşulları ve coğrafik konumu nedeniyle, *Allium* türleri ve birçok endemik türe ev sahipliği yapmaktadır. Dünyada 500 kadar *Allium* türünün bulunduğu, Türkiye'de ise 170 tanesine rastlandığı ve bunların yaklaşık % 40'ının endemik olduğu belirtilmektedir (Fırat 2015).Ülkemizdeki *Allium* türlerinin birçoğuna Avrupa, Kuzey Afrika ve Asya'da rastlanırken, Güney Amerika ve kuzey kutbunda da tespit edildiği görülmektedir. *Allium* türleri süs bitkisi, tıbbi bitki ve beslenme amaçlı olarak da kullanılmaktadır (Brewster 1994).

Allium tuncelianum endemik bir tür olup, Tunceli ili, özellikle Ovacık ve Pülümür ilçeleri çevresinde ve Munzur dağları eteklerinde yaygın olarak bulunmakta ve "dağ sarımsağı" olarak adlandırılmaktadır (Koyuncu ve Güvenç 1994; Fırat 2015). Bitki 1980'li yıllardan beri yıllık tahmini rakam olarak 15-20 ton civarında sökülerek ticareti yapılmaktadır (Fırat 2015). Kollman (1983) tarafından *A. macrochaetum'un* bir alt türü olarak tanımlanmış olan *A. tuncelianum* daha sonra farklı bir tür olarak tanımlanmıştır (Özhatay ve ark. 1997). Ayrıca Tunceli sarımsağı olarak da adlandırılan *A. tuncelianum*, 2n=16 koromozomlu, *Monocotyledonea* (tek çenekliler) sınıfının, *Liliflore* takımında ve *Liliaceae* familyasının *Allium* cinsi içerisindedir (Hanelt 1990, Özhatay 2002).



Şekil 1.1. *A. tuncelianum* bitkisinin Tunceli ili Ovacık karayolu üzerinde yol kenarlarındaki yamaçlarda doğal yayılışına ait görünümü (Kızıl ve ark. 2014a)

***Allium tuncelianum*'un sistematiği**

Takım: *Liliales*

Familya: *Liliaceae (Amaryllidaceae)*

Cins: *Allium*

Tür: *Allium tuncelianum* Kollman

***Allium tuncelianum*:** *A. Tuncelianum*, 18-20 ˚C'de uzun süre saklanabilen, tek dişli, kabuk ve baş sayısı (1-2 adet) kültür sarımsağından az olan endemik bir türdür. *A. tuncelianum* bitkisi, lila renkli çiçekler, kapsül görünümlü meyveler, 3 köşeli, 1-2 mm çapa sahip, üsttü kırışık tohumlar ve 25-60 cm uzunluğunda çiçek sapı ile morfolojik olarak tanımlanabilir. Ayrıca, baş kabuk rengi beyaz, üzerinde 2, 3 kabuklu pulcukları olan tek dişli bir sarımsaktır. Tek dişli olan bu tür 2,8-3,4 cm çapında ve yüksekliği 2,7-3,5 cm arasındadır. Çevresel koşullara bağlı olarak baş ağırlığı 80 gr 'a kadar çıkabilirken ortalama ağırlıkları 10-30 gr arasındadır (Özhatay ve Şiraneci 1992).

Allium tuncelianum Tunceli ili, özellikle Ovacık ve Pülümür ilçeleri çevresinde ve Munzur dağları eteklerinde yayılış göstermektedir (Şekil 3.2). Ayrıca Tunceli ili ile Erzincan ile Sivas sınırları arasındaki meşe ormanı alanlarında da yayılış gösterdiği bilinmektedir. Doğa'da kendiliğinden yetişen bu tür yöre halkı tarafından ticari amaç için toplanmakta ve mutfakta sarımsağın (*Allium sativum*) yerini almaktadır. Ağustos ayı başlarında çiçeklenmeye başlayan bitki, ağustos ayı boyunca çiçekli kalır. Ayrıca, baş kabuk rengi beyaz, üzerinde 2-3 pul soğanları olan tek dişli bir sarımsaktır.



Şekil 3.3. Tunceli sarımsağı bitkisinin Tunceli ve çevresinde yayılış gösterdiği alanlar (www.torut.com'dan modifiye edilmiştir)

Endemik bitkilerin çoğu doğadan bilinçsiz ve aşırı bir şekilde toplandığı için bu türlerin büyük çoğunluğu nesli tükenme tehdidi altındadır. *A. tuncelianum* bitkisinin kimyasal yapısının *A. sativum*'a benzemesi bölge halkı tarafından toplanmasına ve ticaretinin yapılmasına neden olmuştur (Taşkın ark. 1997). Bitkinin endemik olması ve zarar görebilir sınıfında yer alması (Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı) bu türün koruma altında değerlendirilmesi gerektiği bildirilmektedir (Ekim ve ark. 2000).

Allium türlerinin kanser riskini azaltıcı potansiyele sahip olduğu bilinmektedir. Sarımsağın tıbbi amaçlarla, kanser tedavisi için, kullanımı 3500 yıl öncesine dayanmaktadır. Sarımsak antimutajen, antikarsinojenik, antitrombotik, antineoplastik ve antioksidan özelliklere sahiptir. Deneysel ve epidemiyolojik çalışmalar sarımsak tüketimi ile kanser oranı arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir. Tunceli Sarımsağı (*Allium tuncelianum*) bulunan organosülfür bileşikler bitkinin antitümör özelliğe sahip olduğunu göstermektedir (http://www.iaea.org)

Sarımsağın Antik Yunanistan'da, Pakistan'da, Hindistan'da ve Çin İmparatorluğunda performans arttırıcı, yara ve ülser tedavisinde antiseptik losyon, kolera, dizanteri gibi hastalıkların giderilmesinde kullanıldığını bilinmektedir. Ayrıca, Firavun döneminde Mısır'da işçi ve kölelerin hastalıktan korunmaları içinde bol miktarda sarımsak yedikleri belirtilmektedir. Bununla beraber kangreni önlemek için antiseptik olarak İkinci dünya savaşında kullanıldığı kayıtlarda mevcuttur (Lawson 1998, Rahman 2007, Rivlin 2001).

Büyüme hormonu, büyüme ve gelişme üzerine güçlü etkileri olan doğal kimyasallar içermektedir. Bu hormonlardan bazılarının düşük veya yüksek konsantrasyonlarda kullanılması kallus, sürgün ve kök oluşumunu teşvik etmektedir. Salisilik asit potansiyel enzimatik olmayan bir bitki büyüme düzenleyicisi olup bitki fizyolojisinde önemli bir düzenleyici olarak rol almaktadır. Poliaminler, spermidin, spermin ve öncül bir amin olan 300 mg/L Putresin hücre içinde oldukça yaygındır.

Sarımsaktaki organosülfür bileşiklerinin, allin, allisin, diallil sülfid, sallilsistein, allilpropil disülfid, diallil disülfid, S-allil merkaptove dialil trisülfid, ajoen, alliksin, allil merkaptanlar, allil metil sülfitler ve vinilditinler gibi başlıca sülfür bileşiklerinin bir türü olabileceği ve bunların sarımsakta aktif bileşik olarak kabul edildiği ileri sürülmektedir. Allil grupları ve sülfür atomlarının sayısının mevcut bileşiklerin biyolojik etkilerini belirlemede rol oynadığı ve alisin gibi etkin kükürt bileşiklerinin sarımsağa anti-kanser ve antioksidan özellik kattığı belirtilmektedir (Devrim 2004, Bektaş 2010).

Cavallito ve Bailey (1944) tarafından izole edilerek tanımlanan allisin sarımsağın temel aktif bileşiğidir. Sarımsak kesildiğinde ya da ezildiğinde alin-allinaz enzimi aracılığıyla oluşan allisinin, gram-negatif ve gram-pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal etki gösterdiği belirtilmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda pro-oksidan, düşük konsantrasyonlarda antioksidan özellik gösteren allisinin tümör ilerlemesini önlediği ve aflatoksinin neden olduğu DNA hasarını engellediği tespit edilmiştir. Ayrıca, yapılan çalışmalar, sarımsağın ağır metal (kurşun, cıva, kadmiyum, arsenik ve bakır) zehirlenmelerine karşı vücudu antioksidan özelliğinden kaynaklı koruduğu belirtilmektedir (Sermenli 2006).

Literatürde, bazı *Allium* türlerinin içerdiği allicin yardımıyla şeker metabolizmasını düzenleme kabiliyetine sahip olduğu, kalp krizi riskini kandaki plakçık oluşumunu ve fibrin seviyesini düşürerek azatlığı vurgulanmaktadır. Virüs ve fungal hastalıklarda kullanılan ilaçlar toksik etkiye sahiptir, sürekli kullanımında ise ilaca karşı direnç kazanabilir. Sarımsakta bulunan allisin ise enfeksiyonlara karşı doğal antifungal bir etki yaptığı belirtilmektedir (Atmaca 2003).

Bitki hormonlarının yaygın olarak kabul gören sınıfları, oksinler, gibberellinler, sitokininler, absisik asit ve etilen'dir. Son zamanlarda 300 mg/L Putresin çeşitli bitki uygulamalarının kontrolünde büyük ilgi görmektedir. PAs spermidine (Spd), spermin (Spm) ve bunların diamine obligate rekürsör putresini (Put), tüm bitki hücrelerinde her

yerde bulunan küçük alifatik aminlerdir. Putresin, spermine ve spermidine gibi poliaminler tüm canlı organizmalarda bulunur. Hücrelerin proliferatif aktivitesi ile içerikleri arasında pozitif bir korelasyon olduğu için, poliaminler hücre bölünmesi için önemlidir. Poliaminler (PA) embriyogenez dahil hücre çoğalması ve farklılaşmanın hormonal ikinci habercileri gibi birçok işlemde bitki büyüme düzenleyicilerinin yeni bir sınıfı olarak kabul edilmiştir. PA'ler, amino asitlerden dekarboksilasyon yoluyla sentezlenir. Arginin ve ornitin gibi bazik amino asitler, ornitin dekarboksilaz ve arginin dekarboksilaz enzimlerinin etkisiyle, Putresin oluşturmak için karbon iskeletinin ana bölümünü sağladığı belirtilmektedir (Kakkar ve Sawhney 2002).

Poliaminler, birçok bitki sisteminde somatik embriyogenez ile ilişkili olarak çalışılmıştır. Çünkü bu sistem bitki yenilenmesi için önemli bir yol ve *in vitro* bitki morfogenezisinin düzenleyici olaylarını incelemek için potansiyel bir model sistemidir. Poliaminlerin eksojen uygulaması gibi, poliaminlerin düzeylerini değiştiren tedaviler morfogenezisinin iyileştirilmesi için ilginç yollardır. Eksojen poliaminlerin hem hücre bölünmesine neden olabileceği hem de bitki hücre kültüründe rejenerasyonu arttırdığı bilinmektedir. Panax ginseng somatik embriyolarının üretiminin poliamin düzeyleri ve metabolizması manipüle edilerek düzenlenebildiği göstermiştir. Poliaminlerin somatik embriyogenez üzerindeki etkisi açıkça görülmekle birlikte, etki gösterdikleri kesin mekanizmalar henüz net değildir (Bais ve ark. 2002).

Tezin Amacı

Bu tez çalışması ile Doğu Anadolu Bölgesinde yayılış gösteren ekonomik önemi yüksek, endemik bir tür olan *Allium tuncelianum* bitkisinin;

- doku kültürü tekniği ile olgunlaşmamış embriyolarından mikroçoğaltım çalışmalar yapılması,
- olgunlaşmamış embriyoların rejenerasyon yeteneğinin saptanması
- *in vitro* çalışmalarıyla geliştirilen bitkiciklerden soğan/cık elde edilmesi,
- elde edilen soğancıkların köklendirilmesi ve büyütülmesi amaçlanmıştır.

1. GİRİŞ .

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Türkiye florasında 800'den fazla geofit bitki bulunmaktadır (Davis 1988, Güner ve ark. 2000). Bu bitkiler daha ziyade Akdeniz, Ege, Doğu Karadeniz ile Doğu ve Güney Doğu Anadolu Bölgelerinde yayılış göstermektedir. Türkiye geofitlerinin yaklaşık 500 adedi soğanlı bitki olup, Nergisgiller (*Amaryllidaceae*), Süsengiller (*Iridaceae*) ve Zambakgiller (*Liliaceae*) familyaları tür zenginliği ve endemizm oranı bakımından en zengin familyalardır (Davis 1988).

Önceleri, *Allium* cinsi, *Liliaceae* familyasına bağlı bir cins olarak tanımlanmış, (Başer ve ark. 1993) fakat son 50 yıla bakıldığında bu tür hakkında değişik fikirler söylenmiştir. Başlangıçta *Allium* cinsi *Amaryllidaceae* familyası altında incelenmiş olmakla birlikte, sonradan taksonomistler arasında ortaya çıkan genel yaklaşım, bu cinsin *Alliaceae* familyası altında yer alması olmuştur (Rabinowich ve Browster 1990, Brewster 1994). Oluşturan yeni sınıflandırmaya göre *Allium sativum L.*; *Monocotyledones* sınıfı, *Liliiflorae* üst takımı, *Asparagales* takımı, *Alliaceae* familyası ve *Allium* cinsine mensup bir tür olarak kabul edilmiştir.

Türkiye'de Akdeniz havzası ile Kafkaslara kadar uzanan bölge sarımsağın 2'inci gen merkezi olarak tanımlanmaktadır. Bu durum zengin tür çeşitliliğinin nedeni olarak kabul görmektedir (Etoh ve Simon 2002). Türkiye'de *Allium* cinsine ait 159 takson olup (Seçmen ve ark. 1995), bunların 53 adeti endemiktir.

Tunceli sarımsağı ile ilgili agronomik çalışma sayısı sınırlı olmakla birlikte yapılan çalışmalar daha ziyade tohumlarda çimlendirme ve *in vitro* çoğaltmaya yöneliktir. *Allium tuncelianum* (Tunceli sarımsağı), çiçeklenme dönemine ulaşması için 4-6 seneye ihtiyaç duymaktadır. Bu yılların uzayabilmesi ve bazılarının tohum oluşturma yeteneğinin olmaması nedeniyle sadece vejetatif olarak çoğalabildiği dikkate alındığında bazı hızlı çoğaltma tekniklerinin bu bitkiler üzerinde geliştirilmesi gereklidir. *In vitro* çoğaltımda bitkinin genotipi, eksplant kaynağı, çevresel faktörler, eksplantın alınma zamanı kültür ortamı vb faktörler önemli unsurlardır.

Son zamanlarda gelişen *in vitro* çalışma teknikleri günümüz endemik bitkilerin çoğaltılmasında kayda değer sonuçlar vermektedir. Böylelikle, soğanlı bitkilerin kültüre alınması, bilinçsizce doğadan toplanan endemik soğanların neslinin tükenmesinin önüne geçeceği düşünülmektedir. *Allium tuncelianum* ve *Allium* cinsine ait bazı türler üzerine yapılan önemli doku kültürü ve mikroçoğaltım çalışmaları aşağıda verilmiştir.

Tunceli ve yakın komşu illeri olan Sivas ve Erzincan sınırlarına kadar olan alanda endemik bir sarımsak türü olarak tanımlanan *Allium tuncelianum* yoğun bir şekilde doğadan toplanarak tüketilmektedir. Bitki popülaritesinden dolayı yurt dışına da ihraç edilmektedir. Toplamalar sonucu nesli tehlikede olan endemik türler arasında yer almaktadır.

Yörede dağlardan toplanarak 'Kaya sarımsağı' adı altında satılmaktadır. Bitkinin kıska, tohum ve soğanlarının ticareti yapılmakla birlikte, 2015 yılı verilerine göre bir kg soğanın fiyatı ~ 50 TL'ye satılmaktadır. Bitkinin kültüre alınmasına yönelik çalışmalar yapılmakla birlikte yoğun sökümlerden dolayı popülasyonda görülen azalmalar nedeni ile toplanması yasaklanmıştır.

Pooler ve Simon (1994), yaptıkları araştırmada sarımsak tohumlarını 1-2 ay boyunca 3ºC'de depolamış ve tohumların sadece %10'unun gelişme gösterdiğini (çimlendiğini) gözlemlemiş, fakat yapılan uygulamanın maliyeti yüksek ve emek isteyen bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra tohum hasadının ilkbaharda yapıldığını ardından tohumların iki hafta nemli soğuklama (0–3ºC'de) sonrasında çimlenmenin % 80'inin uzun gün koşullarında (22ºC'de, 16 S/3000 lüks) gözlemlendiğini belirtmişlerdir.

Yanmaz ve Ermiş (2005), GA_3'in 1 ve 2 ppm düzeylerinin çimlenme üzerine uyarıcı etkide olduğu ve çimlenme oranı üzerinde düşük sıcaklık süresine bağlantılı olarak % 18-20'ye varan artış sağladığını bildirmişlerdir. Çalışmada en yüksek çimlenme oranları Ovacık-Tunceli bölgesinden sağlanan tohumların 5ºC'de 2 ay depolanması ve 48 saat süreyle 1 ve 2 ppm GA_3 uygulamasına tabi tutulmasıyla elde edilmiştir. İki aylık düşük sıcaklıktaki depolama süresi uygulamasının etki seviyesinin yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Geoffriau ve ark. (2006), Gynogenesis kabiliyeti yüksek çeşitlerde spermin ve spermidin seviyesinin daha yüksek olduğu, fakat gynogenesis meydana getirme kabiliyeti düşük çeşitlerde putresin ve türevlerinin seviyesinin yüksek olduğu belirtilmişlerdir. Araştırıcılar 2×10^{-3} M (spemin %5,4 ve spermidin %5,08) uygulamasının önemli seviyede gynogenik embriyo oluşumunu arttırdığı tespit edilmiş, gynogenesis çalışmalarında poliaminlerin kültür ortamına eklenmesi ile olumlu sonuçlar verdiğini belirtilmektedirler.

Arslan ve ark. (2007), ülkemizde endemik bir tür olan Tunceli sarımsağının (*Allium tuncelianum*) tohumlarına 100, 200, 300, 400, 500 ppm dozlarında gibberallik asit uygulayarak sera ortamında torf ve tarla koşullarında yaptıkları ekimlerde, 100 ppm uygulamasında bitki yaprak sayısı ve soğan çaplarının diğer uygulamalara göre daha iyi olduğunu belirtmektedirler. Araştırıcılar, bitkideki vernalizasyon ihtiyacından dolayı ekimin ilkbahara bırakılmamasını, bitki soğanlarının ilk iki yıl yavru soğan üretimi, üçüncü yıldan itibaren ise ticari üretim için kullanılabileceğini bildirmektedirler.

Ebrahimi ve Zamani (2009), farklı İran soğanlarının çiçek tomurcuğu kültürü yoluyla, putresin ve spermidin gibi poliaminler kullanılarak gynogenesis üzerine etkisini belirlemeye çalışmışlardır. Çiçek tomurcukları öncelikle 0.1 mM spermidin katılan veya spermidin katılmayan besin ortamlarına alınmışlardır. Araştırıcılar 0,01 µM 2,4-D, 0,01 µM BA, 0,1 µM spermidin ve 2 µM putresin içeren besin ortamlarında en yüksek embriyo oluşumu gözlemlediklerini bildirmişlerdir.

Yanmaz ve ark. (2010), kök ve sürgün kültürleriyle yaptıkları *in vitro* rejenerasyon ve soğancık oluşturma çalışmasında *A. tuncelianum* için mikro üretim yöntemi geliştirmeye çalışmışlardır. Kök ve sürgün kültürlerinde farklı kombinasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri kullanarak yaptıkları çalışmada, kök tipi kültürün *A. sativum*'daki gibi sürgün oluşumu için uygun olmadığını belirtmişlerdir. Aksine sürgün kültürünün, 1 veya 2 içeren eksplant ve düşük dozlarda BA ve IAA (0.1 mg/L) sürgün oluşumuna önemli ölçüde etki ettiği belirtilmektedir.

Scotton ve ark. (2013), explant olarak kök segmentlerini kullandıkları 8 ticari sarımsak çeşidinin *in vitro* koşullarda rejenerasyonunun amaçlandığı çalışmada, her genotip için soğancığı çıkarılmış eksplantlar izole edilmiş ve 2,4-D ve 2-İP eklenen MS ortamına ekilmiştir. Kalluslar MS ortamına 8.8 µ M BAP ve 0.1µ M NAA veya 4.6 µ M kinetin eklenerek transfer edilmiştir. 0.1µ M NAA ortamı bütün çeşitlerde en yüksek rejenerasyon oranı göstermiştir.

Taşkın ve ark. (2013), virüs içermeyen sarımsak bitkisinin üretimi için doku kültürü tekniğini kullandıkları çalışmada, meristem kültür tekniği ile kök ucu kültür tekniği karşılaştırılmış. *Allium sativum* ve *A. tuncelianum* türleri için farklı besin ortamlarının kullanıldığı çalışmada elde edilen *in vitro* bitkiler real-time PCR kullanılarak OYDY (onion yellow dwarf virüs – Soğan cücelik virüsü) ve LYSV (leek yellow stripe virüs – Pırasa çizgili virüsü) virüslerini belirlemek için test edilmişlerdir.

Meristem kültür aracılığıyla oluşturulan sarımsak bitkilerinde herhangi bir virüs belirlenmemiştir. Kök ucu kültürlerinde ise OYDV ve LYSV virüsleri belirlenmiştir.

Kizil ve ark. (2014a) Dicle Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünde yürütülen 110 O703 nolu TÜBİTAK projesi kapsamında Tunceli Sarımsağı ile yürütülen çalışmalarda bitkinin olgunlaşmış tohumlarından yapılan çimlendirme çalışmalarında herhangi bir sorun gözlenmemiştir. Ancak, literatürde bazı sorunlar olduğu bildirilmiştir. Buna göre: Etoh ve Simon (2002) sarımsak tohumlarının çimlenmelerinin bir aydan fazla sürebileceğini ve gelişme potansiyellerinin yetersiz olduğunu, 3–6 ay depolandıktan sonra (3ºC'de) soğuklanma uygulamaları yapılarak %20 oranında çimlenme 5ºC'de yapılan çimlendirme çalışmaları sonucunda gerçekleştiği belirtilmektedir. Araştırıcılar yabani *Allium* tohumlarının dinlenme ihtiyaç gösterdiğini ve *Allium sativum* tohumlarının bu özellik bakımından benzer olduğunu bildirmektedirler.

Allium tuncelianum ile yapılan *in vitro* çoğaltım çalışmalarında farklı eksplantlardan oldukça değişik sonuçlar elde edilmiştir (Yanmaz ve ark. 2010; Kızıl ve ark. 2014b). Kök tipi eksplantlar soğanlı bitkilerin rejenerasyonu çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu durum çalışmalarda kullanılan hormonların konsantrasyonu, kombinasyonu ve bitkinin genotipi yanında eksplant seçiminin de oldukça önemli olduğunu göstermektedir. Buna göre; Yanmaz ve ark. (2010), kök ve sürgün ucu kültürü ile farklı kombinasyonlarda 2,4-D, NAA ve IAA ve BA kullandıkları çalışmada; kök ucu kültürünün sürgün çoğaltma için uygun bir eksplant olmadığını buna karşın sürgün ucu kültürünün sürgün çoğaltmada daha iyi sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir. Araştırıcılar, eksplant başına 1-2 adet sürgün elde edildiğini ve düşük dozlarda IAA ve BA'nın etkili sonuçlar verdiğini ve alt kültür sayısının artırılmasının soğan oluşumunu olumlu etkilediğini bildirmişlerdir. Buna karşın, Kızıl ve ark. (2014b), Yaprak, yarım yaprak, yaprak tabanı, dikey ve yatay kesilmiş soğan ve kök eksplantları ile farklı konsantrasyonlarda 2,4-D (5.0, 4.0, 3.0, 2.0 ve 1.0 mg/L), BA (1.0, 2.0, 3.0, 4.0 ve 5.0 mg/L) ve NAA kullanmışlardır. Çalışma sonucunda; kök tipi eksplantların soğan rejenerasyonu için çok uygun olduğunu ve en iyi sonuçların NAA (0.5 mg/L) ve BA (5 mg/L) uygulamalarından sağlandığını bildirilmiştir.

Haider ve ark. (2015), yaptıkları çalışmada G121, G122, G123 ve G124 olarak isimlendirilen 4 yerel sarımsağın *in vitro* rejenerasyonu için etkin bir protokol

geliştirmek amacıyla yaptıkları çalışmada; kök uçlarını bazal disk ve yaprak tabanlarını kallus oluşumunu başlatmak için 2,4-D'yi yalnız ve 2,4-D ve BAP ekleyerek MS besisinde kültüre almış, sonuç olarak 0.5 mg/L den 2 mg/L'ye kadar konsantrasyonlarda kullanılan 2,4-D konsantrasyonu arttıkça kallus indüksiyonunun % si ve kallus oluşumu artış göstermekte ancak 2,4-D muamelelerinin daha da arttığında kallus indüksiyonu azalmaktadır. Ayrıca, 2,4-D ve BAP takviye edilen MS ortamı, tek başına 2,4-D eklenen ortamla karşılaştırıldığında daha yüksek bir kallus indüksiyon ve oluşum gözlenmiştir. Bütün genotiplerde kallus oluşumu 0.5 mg/L BAP + 2 mg/L 2,4-D içeren besi ortamında % 90 olarak gözlemlendiği belirtilmiştir.

Kızıl ve Khawar (2015), yaptıkları çalışmada 7.5 ve 15 cm ekim derinliğinin *A.tuncelianum*'un morfolojik özelliklerine etkisini saha çalışması yaparak araştırmışlardır. Sonuç olarak kurak koşullar altında (Diyarbakır Bölgesi) sığ ekimin (7.5 cm derinlik) bitkinin vejetatif karakterlerinin üzerinde pozitif etki yaptığını belirtmektedirler.

Aasim (2015), *Allium tuncelianum* rejenerasyonu için BA 1.0, 0.50 ve 0.25 mg/L ve KNAA 1.0 0.50 ve 0.25 mg/L (potasyum tuzu içermekte olan NAA) kullandıkları çalışmada; eksplant olarak yarım baş kışı geçirmiş soğanlardan ve en iyi sonuçları KNAA ve BA (0.50 mg/L) uygulamalarından alındığını bildirmiştir.

Helaly ve ark. (2016), Giberallin (GA_3) ve Cycocel (CCC) kullanarak yaptıkları çalışmada; 1000 ppm GA_3 ve 50 ppm CCC uygulamalarından yüksek tohum verimi elde ettiklerinin, GA_3 ve CCC uygulamalarının tohum verimi, 1000 dane ağırlığı ve tohum çimlenmesi üzerine etkili olduğunu bildirmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışma 2016-2018 yılları arasında Dicle Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, Biyoteknoloji Laboratuvarında yürütülmüştür.

3.1. Materyal

Araştırmada materyal olarak kullanılan *Allium tuncelianum* Kolmann bitkisinin olgunlaşmamış meyveleri ve soğanları (Şekil 3.1; Şekil 3.6), Dicle Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Soğanlı Bitkiler Koleksiyon Bahçesi'nden temin edilmiştir. Olgunlaşmamış meyveler 16 Haziran 2016 tarihinde çiçeklenme başlangıcından 15 gün sonra alınmıştır. Soğanlar ise tarla hasattan sonra tam fizyolojik olgunlaşma döneminde alınmıştır. Bu soğanlar yaklaşık iki ay boyunca 4 °C'de çalışmaların yapılacağı tarihe kadar bekletilmiştir.



Şekil 3.1. *A. tuncelianum* bitkisinin tarla denemesi ve çiçeklenme döneminden görünümü (Kızıl ve ark. 2014a)



Şekil 3.2. *A. tuncelianum* bitkisinin hasat sonrası soğanlarının görünümü (Kızıl ve ark. 2014a)

3.2. Metot

3.2.1. Eksplantların Ön Hazırlığı ve Sterilizasyonu

Allium tuncelianum türünün çiçeklenmeden 15 gün sonra alınan olgunlaşmamış embriyoları içinden üzerinde yara olmayan ve enfeksiyonsuz meyveler seçilmiştir (Şekil 3.6; Şekil 3.2). Olgunlaşmamış embriyolar kağıt keselerin içerisine yaralanmaya sebep olmadan özenli bir şekilde konulmuş ve *in vitro* çalışmaların yapıldığı tarihe kadar buzdolabında 4 ^{o}C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir.

Olgunlaşmamış embriyolar ve soğanların sterilizasyon işlemi için 30 dk çeşme suyunda bekletildikten sonra %100 çamaşır suyu (sodyum hipoklorit) ile 20 dk steril edilmiş ve 3 × 5 dk durulama işlemi destile (steril saf) su ile yapılmıştır. Steril kabin içerisinde yüzey sterilizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Olgunlaşmamış embriyolar sterilizasyon işlemlerinden sonra steril pens ve steril bisturi kullanılarak meyvelere zarar gelmeyecek şekilde kabuklarından steril kabin içerisinde ayrıştırılmıştır. Olgunlaşmamış embriyolar 24 ± 1 $^{\circ}$C'de 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyodunda, içerisinde % 3 sukroz ve % 0.62 agar (Duchefa) ile katılaştırılan farklı oranlarda oksin ve sitokinin içeren MS besi ortamlarında kültüre alınmıştır.



Şekil 3.3. *In vitro* çalışmaların yapıldığı hazırlık odası, steril kabin ve bitki büyütme kabinlerinin görünümü

3.2.2. Çalışmada Kullanılan Eksplantlar

Yapılan araştırmada *Allium tuncelianum* bitkilerinin tam çiçeklendikten 15-20 gün sonra (Şekil 3.5 b) oluşan meyvelerinden alınan olgunlaşmamış embriyolar eksplant olarak kullanılmıştır.



(a) Diyarbakır koşullarında kültüre alma çalışmaları

(b) Tam çiçeklenmeden 15-20 gün sonraki görünüm

Şekil 3.4. *A. tuncelianum* bitkisinin kültür ortamından görünümü (Kızıl ve ark. 2014a)



Şekil 3.5. *A. tuncelianum* bitkisinin laboratuvar ortamına alınan meyveler ve olgunlaşmamış embriyolarına ait görünümü

3.2.3. Bitki Büyüme Düzenleyicileri ve Ortamları

Denemelerde, MS mineral tuz ve vitaminleri (Murashige ve Skoog 1962), %3 oranında şeker (sukroz) ile katılaştırma amacıyla agar (Duchefa) içeren besi ortamları kullanılmıştır. Ortam hazırlığında iki kez distile edilmiş su kullanılmış olup, besin ortamına, farklı oranlarda sitokinin ve oksin ilave edilmiştir.

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler, Sigma - Aldrich Chemical Co.'dan temin edilmiştir. Bu kimyasallar, Çizelge 3.3'de verildiği gibi, uygun çözücülerde çözüldükten sonra istenilen miktarda ve oranlarda stok solüsyonları hazırlanmıştır. Bitki büyüme düzenleyicileri otoklavlanmadan önce besin ortamına ilave edilmiştir. Hazırlanan bitki büyüme düzenleyicileri stok solüsyonları iki ay süreyle +4 ^{o}C'de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.1. MS (Murashige ve Skoog 1962) ortamında bulunan makro, mikro elementler, vitaminler ve konsantrasyonları

Ortamda bulunan maddeler		Konsantrasyonu (mg/L)
Makro besin elementleri	NH_4NO_3	1650
	KNO_3	1900
	$CaCl_2.2H_2O$	440
	$MgSO_4.7H_2O$	370
	KH_2PO_4	170
Mikro besin elementleri	KI	0.83
	H_3BO_3	6.2
	$MnSO_4.4H_2O$	22.3
	$ZnSO_4.7H_2O$	8.6
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
	$CuSO_4.5H_2O$	0.025
	$CoCl_2.6H_2O$	0.025
	$FeSO_4.7H_2O$	27.8
	$Na_2EDTA.2H_2O$	37.3
Vitaminler	Inisitol	100
	Nicotinic Acid	0.5
	Pyridoxine-HCl	0.5
	Thiamine-HCl	0.1
	Glycine	2

Çizelge 3.2. Kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri ve stok çözelti konsantrasyonları

Bitki Hormonları	Çözücü	Saklama Sıcaklığı	Stok Çözelti Konsantrasyonu (mg/ml)
Sitokinin			
BAP	1 N NaOH/Etanol	4ºC	1/1
Oksin			
2,4-D	1 N NaOH/Etanol	4ºC	1/1
NAA	1 N NaOH/Etanol	4ºC	1/1
Polyamin			
Putresin	-	4ºC	%3 (3/1)

3.2.4.Kültür Koşulları

Besin ortamının pH'sı 1 N NaOH ya da HCl kullanılarak 5.6-5.8'e ayarlandıktan sonra otoklavda 1.2 kg/cm^2 basınç altında 121^{o}C'de 20 dk sterilizasyon sağlanmıştır. Tüm kültürler iklim dolaplarında (Fitotron UK) beyaz floresans ışığı altında 16 saat ışık 8 saat karanlık periyodunda 24 ^{o}C bekletilmiştir (Kızıl ve ark. 2014; Kızıl ve ark. 2017).

3.2.5. *In vitro* Çalışmalar

3.2.5.1. Bitki Rejenerasyonu

Bitki rejenerasyonu için, tüm eksplantlar Çizelge 3.3.'de verilen BBD'leri ve belirlenmiş dozları, beş adet eksplant kullanılarak, hazırlanmış Magenta kutuları, petri veya kavanoz içerisine her biri üç tekerrürlü olmak şartıyla kültüre alınmıştır.

Çizelge 3.3. Tunceli sarımsağı bitkisinin olgunlaşmamış embriyolarının MS besin ortamında farklı büyüme düzenleyicilerle kurulan denemelerde kullanılan fitohormonlar ve konsantrasyonları

Deneme 1	Deneme 2	Deneme 3	Deneme 4	Deneme 5
2,4-D(mg/L)	BAP (mg/L)	BAP(mg/L) + NAA (mg/L)	BAP (mg/L) + Putresin (mg/L)	BAP(mg/L)+ NAA (mg/L) + Putresin(mg/L)
0.3	0.1	0.1 + 0.5	0.1 + 300	0.1 + 0.5 + 300
0.5	0.3	0.3 + 0.5	0.3 + 300	0.3 + 0.5 + 300
0.7	0.5	0.5 + 0.5	0.5 + 300	0.5 + 0.5 +300
0.9	0.7	0.7 + 0.5	0.7 + 300	0.7 + 0.5+ 300
1.2	0.9	0.9 + 0.5	0.9 + 300	0.9 + 0.5 + 300

3.3. İstatistiksel Değerlendirmeler

In vitro denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre her biri tek faktörlü olarak 3 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Her tekerrür içinde 5 adet eksplantın bulunduğu 100 ×10 mm'lik Petri kutularından oluşmuştur. Elde edilen veriler "IBM SPSS 20 for Windows'' paket programında Univariate analizine tabi tutulmuş, muamele ortamlarını karşılaştırmak amacıyla Duncan ve LSD testleri uygulanmıştır. Yüzdelik değerler, istatistik analizinden önce arcsin değerlerine çevrilmiştir (Snedecor ve Cochran 1967).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Olgun *A. tuncelianum* tohumlarından *in vitro* çimlendirme çalışmaları

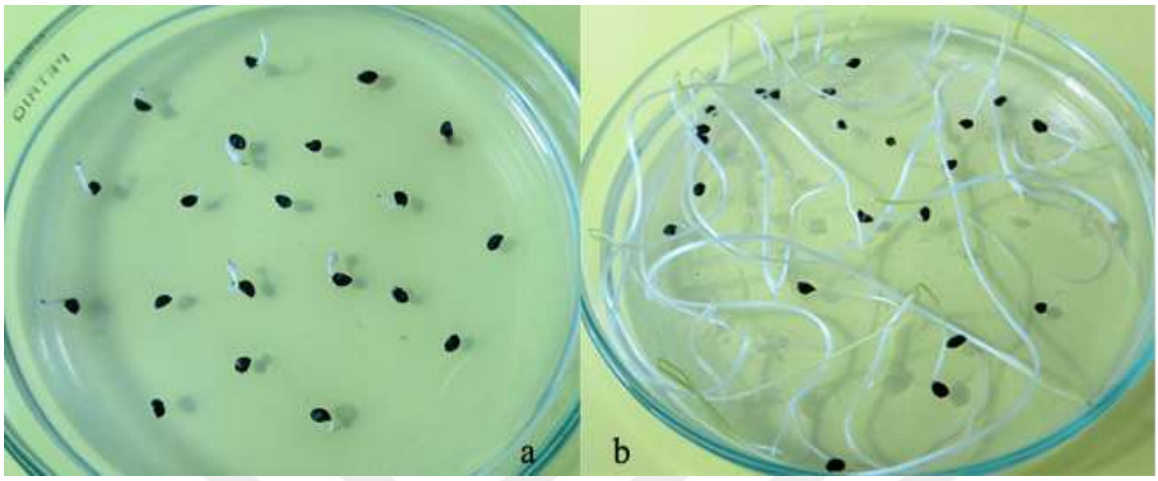
A. tuncelianum bitkisinin tohumları çimlenme için düşük sıcaklık isteğine (soğuklama) ihtiyaç duymaktadır. Çizelge 4.1.'de görüldüğü gibi 16 saat ışık fotoperiyot olacak şekilde çimlendirmeye bırakılan tohumlarda çimlenme oranı %40 ile %90 arasında değişmiştir. Yirmi tekerrürlü yapılan çalışmada 16saat aydınlık fotoperiyotta ortalama çimlenme oranı %61.5 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. *A. tuncelianum* olgun tohumlarının farklı ortamlarda çimlenmesine ait ortalama değerler

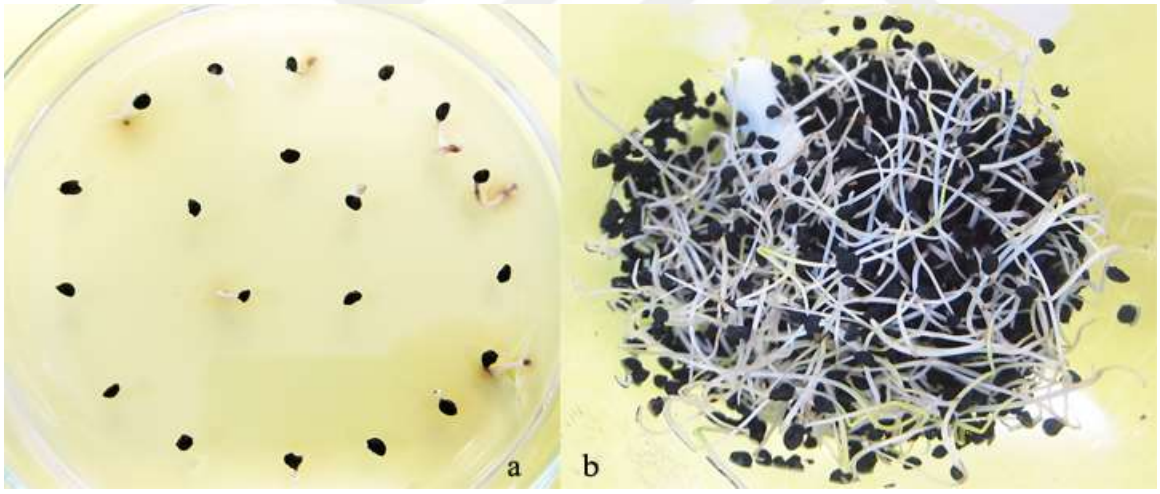
Tekerrür	**Çimlenme oranı(%)**	
	16 Saat aydınlık ortam	**4°C Karanlık ortam**
1	70	95
2	65	85
3	65	80
4	75	75
5	55	95
6	90	85
7	80	70
8	65	75
9	70	90
10	45	70
11	50	80
12	50	80
13	50	90
14	50	90
15	70	75
16	40	80
17	65	85
18	70	70
19	55	95
20	50	60
Ort.	**61.50**	**81.25**

Karanlık ortamda 4°C'de yapılan çimlendirmelerde bu oran %60 ile %90 arasında değişmiştir. Yirmi tekerrüre ait ortalama değer ise % 81.25 olarak belirlenmiştir. Bu değerler literatürde bildirilmiş olan çalışmalara göre daha yüksektir

(Kızıl ve ark. 2017). Kızıl ve ark. (2017) *in vitro* çimlenme süresini 81 gün olarak belirledikleri çalışmada belirtilen sürenin bu çalışmadan farklı olması kullanılan tohumların saklama koşulları ve tohumun yaşıyla ilgili olabileceği düşünülmektedir.

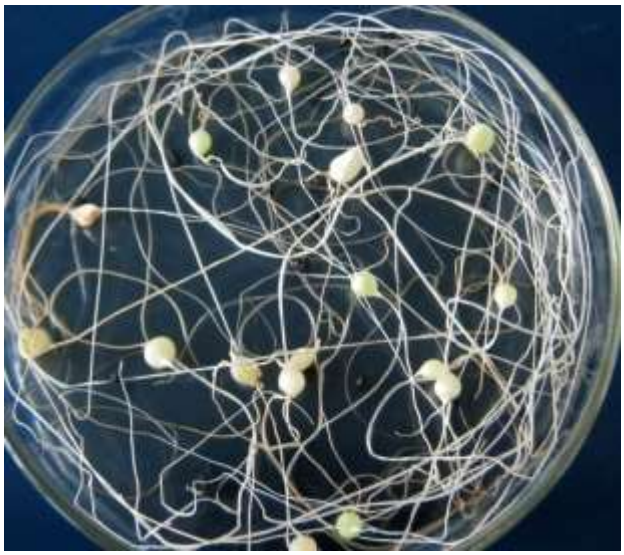


Şekil 4.1. *A. tuncelianum* tohumlarının MS ortamında 16 saat ışık fotoperiyotta (a) ve 4°C'de (b) yapılan çimlendirme çalışmalarına ait görünümler



Şekil 4.2. *A. tuncelianum* tohumlarının MS ortamında (a) 16 saat ışık fotoperiyodunda çimlenme sonrası kararma ve 4 °C karanlık ortamda (b) elde edilen sağlıklı çimlendirme sonuçlarına ait görünümler

Çimlenme çalışmalarında 16 saat ışık fotoperiyotunda başlangıçta çimlenen tohumlarda daha sonra uç kısımlarında kahverengileşme ve gelişme durgunluğu gözlendi. Bunun aksine 4 °C karanlıkta yapılan çimlendirmelerde monokotil yapraklarda düzenli ve sağlıklı büyüme ve gelişme gözlemlendi. Karanlık ortamda 4°C'de çimlenen tohumlarda 59 gün sonra soğan oluşumu görüldü. Bu soğanlar 30 g/L MS ortamında büyütmeye alındı (Şekil 4.2a).



Şekil 4.3. *A. tuncelianum* tohumlarının MS + %3 aktif karbon içeren ortamda 4 °C karanlıkta çimlenme sonrası soğan oluşumuna ait görünüm

4.2. Olgunlaşmamış Embriyolarda Rejenerasyon Çalışmaları

4.2.1. Farklı oranda 2,4-D içeren MS ortamda rejenerasyon çalışmaları

Çizelge 4.2'de görüldüğü 2,4-D bitki büyüme düzenleyicisinin farklı dozları uygulanarak yapılan denemede; 2,4-D dozlarının çimlenme oranı üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunurken, kallus oluşum oranı ve soğancık sayısı üzerine etkilerinin ise önemli bulunmadığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. Farklı dozlarda 2,4-D uygulamasının *Allium tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarında *in vitro* çimlenme oranı, kallus oranı ve soğancık sayısı bakımından elde edilen Varyans Analiz Tablosu

Varyasyon Kaynağı	Sd	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F
Çimlenme oranı (%)	4	906.667	226.667	1.063*
Kallus oranı (%)	4	906.667	226.667	1.063
Soğancık sayısı (adet/eksplant)	4	0.00	0.00	0.0

*: 0.05; **: 0.01 düzeyinde önemli

2,4-D hormonu uygulamasında çimlenme oranı değerleri % 0.00 ile % 20 arasında değişmiştir. Bu dozlar arasında en yüksek çimlenme oranı değeri 2,4-D uygulamasının 0.3 mg/L ile 1.2 mg/L dozlarından elde edilirken, çimlenme oranının en az olduğu değer 0.5 mg/L uygulamasından elde edilmiştir. Uygulamalar arasında

değişen oranda çimlenme değerleri elde edilmiş, ancak 0.5 mg/L uygulamasından hiçbir sonuç alınamamıştır (Çizelge 4.3).

Allium türlerine ait tohumların depolama/bekletme süresinin çimlenme oranına etkili olduğu bilinmektedir. *Allium* türlerine ait tohumlar depolama ortamında düşük sıcaklık ve nem toleransı yüksek olmayan tohumlardır. Bu nedenle çimlendirme çalışmalarında bu hususun dikkate alınması gerekmektedir.

Tunceli sarımsağı tohumlarının çimlenmesi için soğuklama ihtiyacı bulunmaktadır (Rahman ve ark. 2003; Kizil ve Khawar, 2017). Rahman ve ark. (2003) soğan tohumlarının çimlenmesi için akşam 8-20 ºC arasındaki sıcaklıkların, gündüz 13-24 ºC arasındaki sıcaklıklara gereksinim duyduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte Tunceli sarımsağı bitkisinin tohumlarında farklı çimlenme değerleri elde edildiğini bildiren birçok literatür sonucu bulunmaktadır. Pooler ve Simon (1994) düşük sıcaklık değerlerinde 3 ay gibi bir bekletme ortamında oldukça düşük çimlenme (% 10) değerleri elde ederken, 2 haftalık nemli bir ortamda 0–3ºC'de %80 oranında yüksek bir çimlenme değeri elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Çizelge 4.3. Farklı dozlarda 2,4-D uygulamasının *Allium tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarının *in vitro* çimlenme oranı, kallus oluşum oranı ve soğancık sayısı bakımından oluşan ortalama değerler (%)

2,4-D(mg/L)	Çimlenme oranı (%)	Kallus oluşum oranı (%)	Soğan sayısı (adet/eksplant)
0.3	20.00 a	20.00	0.00
0.5	0.00 d	0.00	0.00
0.7	6.66 c	6.66	0.00
0.9	13.33 b	13.33	0.00
1.2	20.00 a	20.00	0.00
Ort.	11.99	11.99	0.00

Farklı hormon uygulamaları arasında oluşan farklılıklar istatistiksel olarak LSD 0.05 düzeyinde önemli bulunmuştur.



Şekil 4.4. *A. tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarının 2,4-D (1.2 mg/L) içeren ortamda kallus oluşturmasına ait görünüm

4.2.2. Farklı oranda BAP içeren MS ortamda rejenerasyon çalışmaları

Çizelge 4.4. Farklı dozlarda BAP uygulamasının *Allium tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarında *in vitro* çimlenme oranı, kallus oranı ve soğancık sayısı bakımından elde edilen ortalama değerlere ait Varyans Analiz Tablosu

Varyasyon Kaynağı	Sd	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F
Çimlenme oranı (%)	4	373.333	93.333	0.350**
Kallus oranı (%)	4	0.000	0.000	.
Soğancık sayısı (adet/eksplant)	4	20.667	5.167	0.945

*: 0.05; **: 0.01 düzeyinde önemli

Çizelge 4.4'de görüldüğü gibi çimlenme oranları bakımından farklı BAP konsantrasyonlarında ortaya çıkan farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulunurken, kallus oluşum oranı ve eksplant başına soğancık sayısı bakımından oluşan farklılıklar ise istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur.

Çimlenme oranı % 0.00 ile 13.33 değerleri arasındadır. En yüksek çimlenme oranı %13.33 ile 0.7 mg/L ve 0.5 mg/L dozlarından elde edilirken, en düşük çimlenme oranı 0.3 mg/L uygulamasından elde edilmiştir. Farklı dozlarda BAP uygulamalarından kallus oluşumu gözlenmemiştir. Eksplant başına soğancık sayısı bakımından BAP uygulamaları arasında en yüksek sayı0.5 mg/L'lik doz uygulamasından (4.00 adet/eksplant) elde edilmiş, 0.9 mg/L BAP uygulamasından 0.33 adet elde edilirken diğer uygulamalardan soğan elde edilmemiştir (Çizelge 4.5; Şekil 4.5).

Çizelge 4.5. Farklı dozlarda BAP uygulamasının *Allium tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarında çimlenme oranı, kallus oluşum oranı ve eksplant başına soğancık sayısı bakımından oluşan ortalama değerler

BAP(mg/L)	Çimlenme oranı (%)	Kallus oluşum oranı (%)	Eksplant başına soğancık sayısı (adet/eksplant)
0.1	6.66 c	**0.00**	0.00
0.3	0.00 d	0.00	0.00
0.5	13.33 a	0.00	4.00
0.7	13.33 a	0.00	0.00
0.9	6.66 b	0.00	0.33
Ort.	7.99	0.00	0.86

Farklı hormon uygulamaları arasında oluşan farklılıklar istatistiksel olarak LSD 0.05 düzeyinde önemli bulunmuştur.



Şekil 4.5. *A tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarının BAP 0.5 mg/L uygulamasında sürgün ve soğan oluşumuna ait görünüm

4.2.3. Farklı oranda BAP +0.5 mg/L NAA içeren MS ortamda rejenerasyon çalışmaları

Çizelge 4.6. Farklı dozlarda BAP + 0.5 mg/L NAA uygulamasının *Allium tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarında *in vitro* çimlenme oranı, kallus oranı ve soğancık sayısı bakımından elde edilen ortalama değerlere ait Varyans Analiz Tablosu

Varyasyon Kaynağı	Sd	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F
Çimlenme oranı (%)	4	160.00	40.00	0.50**
Kallus oranı (%)	4	106.66	26.67	1.00
Soğancık sayısı (adet/eksplant)	4	14.27	3.57	0.57

*: 0.05; **: 0.01 düzeyinde önemli

Çizelge 4.6 incelendiğinde çimlenme oranları bakımından ortaya çıkan farklılıklar istatistiksel olarak BAP + NAA (0.5 mg/L) konsantrasyonlarında önemli bulunurken, kallus oluşum oranı ve eksplant başına soğancık sayısı bakımından oluşan farklılıklar ise istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur.

Çimlenme oranı değerleri 0.9, 0.3 ve 0.1 mg/L BAP + NAA (0.5 mg/L) uygulamalarında % 6.66 oranında gerçekleşirken, 0.7 ve 0.5 mg/L BAP + (0.5 mg/L) NAA uygulamalarında çimlenme görülmemiştir. Yüksek doz uygulaması olan 0.9 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA uygulamasında % 6.66 oranında kallus oluşumu belirlenirken diğer uygulamalarda herhangi bir kallus oluşumu meydana gelmemiştir. Bununla birlikte BAP + 0.5 mg/L uygulamaları arasında Soğancık sayınsa bakıldığında 0.5 mg/L'lik doz uygulaması en yüksek 4.00 (adet/eksplant) değerini vermektedir (Çizelge 4.7; Şekil 4.6).

Çizelge 4.7. Farklı dozlarda BAP + NAA uygulamasının *Allium tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarında çimlenme oranı, kallus oranı ve soğancık sayısı bakımından oluşan ortalama değerler

BAP (mg/L)	NAA (mg/L)	Çimlenme oranı (%)	Kallus oranı (%)	Soğancık sayısı (adet / eksplant)
0.1	**0.5**	6.66 a	0.00	2.33
0.3	**0.5**	6.66 a	0.00	1.00
0.5	**0.5**	0.00 b	0.00	0.00
0.7	**0.5**	0.00 b	0.00	0.00
0.9	**0.5**	6.66 a	6.66	2.00
Ort.		3.99	1.33	1.06

Farklı hormon uygulamaları arasında oluşan farklılıklar istatistiksel olarak LSD 0.05 düzeyinde önemli bulunmuştur.



Şekil 4.6. *A. tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarının 0.3 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA uygulamasında soğan ve sürgün oluşumuna ait görünüm

4.2.4. Farklı oranda BAP + 300 mg/L Putresin içeren MS ortamda rejenerasyon çalışmaları

Çizelge 4.8. Farklı dozlarda BAP + 300 mg/L Putresin uygulamasının *Allium tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarında *in vitro* çimlenme oranı, kallus oranı ve soğancık sayısı bakımından elde edilen ortalama değerlere ait Varyans Analiz Tablosu

Varyasyon Kaynağı	Sd	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F
Çimlenme oranı (%)	4	693.333	173.333	0.361
Kallus oranı (%)	4	426.667	106.667	0.452
Soğancık sayısı (adet/eksplant)	4	9.733	2.433	0.600

*: 0.05; **: 0.01 düzeyinde önemli

Çizelge 4.8'de görünen çimlenme oranları, kallus oluşum oranı ve soğancık sayısı bakımından farklı BAP + 300 mg/L Putresin konsantrasyonlarında ortaya çıkan farklılıklar istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur.

Çimlenme oranı % 6.66 ile %20.00 değerleri arasındadır. En yüksek çimlenme oranı değeri 0.7 mg/L BAP + Putresin (300 mg/L) uygulamasından % 26.66 ile elde edilirken, en düşük çimlenme oranı 0.9 mg/L uygulamasından %6.66 olarak tespit edilmiştir. Farklı dozlarda BAP + 300 mg/L Putresin uygulamalarından kallus oluşumu sadece %13.33 ile 0.3 mg/L BAP + 300 mg/L Putresin uygulamasında gözlenmiştir. Soğancık sayısı bakımından BAP + 300 mg/L Putresin uygulamaları arasında en yüksek sayı 0.7 mg/L'lik doz uygulamasından (2.33 adet/eksplant) elde edilmiş, 0.1 mg/L BAP + 300 mg/L Putresin uygulamasından soğan elde edilmemiştir (Çizelge 4.9; Şekil 4.7).

Çizelge 4.9. Farklı dozlarda BAP + 300 mg/L Putresin uygulamasının *Allium tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarında çimlenme oranı, kallus oranı ve soğancık sayısı bakımından oluşan ortalama değerler

BAP (mg/L)	Putresin (mg/L)	Çimlenme oranı (%)	Kallus oranı (%)	Soğancık sayısı (adet / eksplant)
0.1	**300**	20.00	0.00	0.00
0.3	**300**	13.33	13.33	1.66
0.5	**300**	20.00	0.00	0.66
0.7	**300**	26.66	0.00	2.33
0.9	**300**	6.66	0.00	1.00
Ort.		17.33	2.66	1.13



Şekil 4.7. *A. tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarının BAP (0.5 mg/L) + 300 mg/L Putresin (%3) içeren uygulamada soğan ve sürgün oluşumuna ait görünümü

4.2.5. Farklı oranda BAP + 300 mg/L Putresin + 0.5 mg/L NAA içeren MS ortamda rejenerasyon çalışmaları

Çizelge 4.10. Farklı dozlarda BAP + 0.5 mg/L NAA + 300 mg/L Putresin uygulamasının *Allium tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarında *in vitro* çimlenme oranı, kallus oranı ve soğancık sayısı bakımından elde edilen ortalama değerlere ait Varyans Analiz Tablosu

Varyasyon Kaynağı	Sd	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F
Çimlenme oranı (%)	4	426.667	106.667	0.200
Kallus oranı (%)	4	373.333	93.333	0.583
Soğancık sayısı (adet/eksplant)	4	257.600	64.400	2.305

*: 0.05; **: 0.01 düzeyinde önemli

Çizelge 4.10'da görünen çimlenme oranları, kallus oluşum oranı ve soğancık sayısı bakımından ortaya çıkan farklılıklar istatistiksel olarak farklı BAP + NAA (0.5 mg/L) + Putresin (300 mg/L) konsantrasyonlarında önemsiz bulunmuştur.

Çimlenme oranı değerleri % 6.66 ile 20.00 arasında değişmiştir. En yüksek çimlenme oranı %20.00 ile BAP 0.1, 0.5 ve 0.9 mg/L + NAA 0.5 mg/L + Putresin (300 mg/L) uygulamalarından elde edilirken, en düşük çimlenme oranı 0.7 mg/L uygulamasından elde edilmiştir. Farklı dozlarda BAP + NAA (0.5 mg/L) + Putresin (300 mg/L) uygulamalarından kallus oluşumu BAP 0.3, 0.7 ve 0.9 mg/L + NAA (0.5 mg/L) + Putresin (300 mg/L) uygulamalarında gözlenirken 0.1 ve 0.5 mg/L BAP +

NAA (0.5 mg/L) + Putresin (300 mg/L) uygulamalarına kallus oluşumu gözlenmemiştir. Soğancık sayısı bakımından farklı dozlarda BAP + NAA (0.5 mg/L) + Putresin (300 mg/L) uygulamaları arasında en yüksek sayı 0.9 mg/L'lik doz uygulamasından (7.66 adet/eksplant) elde edilmiş, en düşük soğancık sayısı değeri ise 0.1 ve 0.5 mg/L BAP + NAA (0.5 mg/L) + Putresin (300 mg/L) uygulamalarından (0.33 adet/eksplant) elde edilmiştir (Çiz. 4.11; Şek. 4.8).

Çizelge 4.11. Farklı dozlarda BAP + 300 mg/L Putresin + 0.6 mg/L NAA uygulamasının *Allium tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarında çimlenme oranı, kallus oranı ve soğancık sayısı bakımından oluşan ortalama değerler

BAP(mg/L)	NAA (mg/L)	Putresin (mg/L)	Çimlenme oranı	Kallus oranı (%)	Soğancık sayısı (adet / eksplant)
0.1	**0.5**	300	20.00 a	0.00	0.33
0.3	**0.5**	300	13.33 b	13.33	10.33
0.5	**0.5**	300	20.00 a	0.00	0.33
0.7	**0.5**	300	6.66 c	6.66	1.66
0.9	**0.5**	300	20.00 a	6.66	7.66
Ort.			15.99	5.33	4.06



Şekil 4.8. *A. tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarının BAP 0.9 mg/L + NAA 0.5 mg/L + 300 mg/L Putresin (%3) uygulamasında sürgün oluşumuna ait görünüm

4.2.6. Farklı hormon uygulamalarının *A. tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarının rejenerasyonu üzerine etkisi

Çizelge 4.12'de görüldüğü gibi farklı hormonlar, hormon dozları ve Hormon × Doz interaksiyonunun kallus oluşum oranı, sürgün oluşum oranı ve soğancık sayısı üzerine etkileri açısından bulunan farklılıklar istatistiksel açıdan%1 düzeyinde önemli bulunmuştur.

Çizelge 4.12. Farklı hormon uygulamalarının *Allium tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarında *in vitro* çimlenme oranı, kallus oranı ve soğancık sayısına ait Varyans Analiz Tablosu

Varyasyon Kaynağı	Sd	Çimlenme oranı (%)		Kallus oluşum oranı (%)		Soğancık sayısı (adet/eksplan)	
		K.O	F	K.O	F	K.O	F
Hormonlar	4	339.346	42.418**	461.117	16.468**	37.144	50.643**
Dozlar	4	45.479	5.685**	127.904	4.568**	12.806	17.461**
Hormon × Doz	16	102.112	12.764**	128.134	4.576**	16.453	22.432**
Hata	50	8.000		28.000		0.733	

*: 0.05; **: 0.01 düzeyinde önemli

Farklı hormon uygulamalarına ait ortalamalar dikkate alındığında çimlenme oranı bakımından en yüksek değer BAP + 300 mg/L Putresin uygulamasından % 17 olarak belirlenmiştir. En düşük çimlenme oranı değeri ise % 4.99 ile BAP + NAA hormon uygulamalarından elde edilmiştir. Diğer uygulamalarda sırası ile 2,4-D uygulamasından % 12.04, BAP uygulamasından % 8.01, BAP + 300 mg/L Putresin + NAA uygulamasından % 16 oranında çimlenme gerçekleşmiştir (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.13. Farklı dozlarda 2,4-D uygulamalarında *Allium tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarından *in vitro* çimlenme oranı bakımından elde edilen ortalama değerler

2,4-D(mg/L)	Çimlenme oranı (%)
0.3	20.00A
0.5	0.00C
0.7	6.67
0.9	13.350
1.2	20.00A
Ort.	**12.04**

Farklı hormon uygulamaları arasında oluşan farklılıklar istatistiksel olarak LSD 0.05 düzeyinde önemli bulunmuştur

Kallus oluşum oranları bakımından 2,4-D hormon uygulaması diğer hormon ve hormon karışımlarından oldukça yüksek değerler elde edilmiştir. Ortalamalar dikkate alındığında 2,4-D uygulamasından %12.1 ile en yüksek değer elde edilirken BAP uygulamasında herhangi bir kallus oluşumu gözlenmemiştir. En yüksek kallus oluşum değerleri 2,4-D uygulamasının 1.2 ve 0.3 mg/L dozlarından %20 ile elde edilmiştir (Çizelge 4.15). Bununla birlikte BAP + 0.5 mg/L NAA hormon uygulamasından % 1.33, BAP + 300 mg/L Putresin uygulamasından % 2.67 ve BAP + 300 mg/L Putresin + 0.5 mg/L NAA uygulamasından % 5.34 oranında kallus oluşumu gözlenmiştir (Çizelge 4.16).

Çizelge 4.14. Farklı hormon uygulamalarının *Allium tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarında *in vitro* çimlenme oranı bakımından oluşan ortalama değerler

Dozlar	BAP	BAP + 0.5 mg/L NAA	BAP + 300 mg/L Putresin	BAP +300 mg/L Putresin + 0.5 mg/L NAA
0.1	6.670B	6.670B	20.000A	20.000A
0.3	0.00C	6.670B	13.357A	13.330A
0.5	13.350B	0.00C	20.000A	20.000A
0.7	13.350B	0.00	26.670A	6.670C
0.9	6.670B	6.670B	6.650B	20.000A
Ort.	**8.01**	**4.99**	**17.00**	**16.00**

Farklı hormon uygulamaları arasında oluşan farklılıklar istatistiksel olarak LSD 0.05 düzeyinde önemli bulunmuştur.

Doku kültürü uygulamalarında kallus oluşumundan elde edilen somatik embriyoların fazla olması istenir. Soğan ve benzeri yapıdaki çoğaltım materyalinde de yüksek miktarlarda üretim için somatik embriyo üretimi önemli bir yöntemdir. 2,4-D bir herbisittir. Bitkide evaporasyonu hızlandırarak stres oluşturmaktadır. Yüksek dozlarda kullanılması bitki hücrelerinin ve dolayısı ile bitkinin ölümüne neden olmaktadır. Bu durum aynı zamanda kallus oluşumunu hızlandırmaktadır. Doku kültürü uygulamalarında düşük dozlarda yapılan uygulamalarda bitki hücrelerinin strese maruz bırakılarak üremeleri/çoğalmaları sağlanmaktadır.

Elde edilen somatik embriyolar büyütme ortamına alındıktan sonra (Şekil 4.9) 0.5 cm büyüklüğe eriştikten sonra saksılara aktarılmışlardır.

Çizelge 4.15. Farklı dozlarda 2,4-D uygulamalarında *Allium tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarından *in vitro* kallus oluşum oranı bakımından elde edilen ortalama değerler

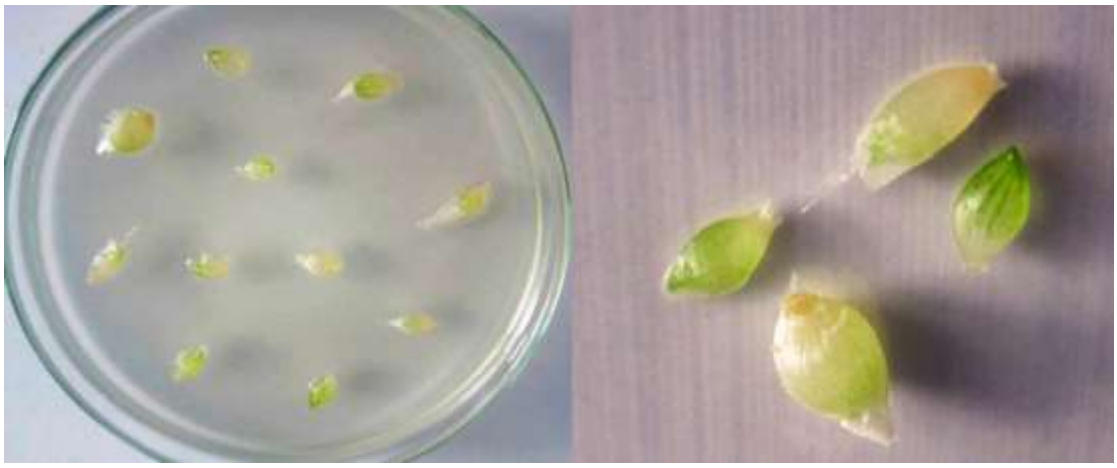
2,4-D(mg/L)	Kallus oluşum oranı (%)
0.3	20.00 a
0.5	0.00
0.7	6.670 c
0.9	13.390 b
1.2	20.00 a
Ort.	12.01

Farklı hormon uygulamaları arasında oluşan farklılıklar istatistiksel olarak LSD 0.05 düzeyinde önemli bulunmuştur.

Çizelge 4.16. Farklı hormon uygulamalarında *Allium tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarından kallus oluşum oranı bakımından elde edilen ortalama değerler

Dozlar	BAP	BAP+0.5 mg/L NAA	BAP+ 300 mg/L Putresin	BAP+300 mg/L Putresin +0.5 mg/L NAA
0.1	0.00B	0.00bB	0.00bB	0.00cB
0.3	0.00B	0.00bB	13.350aA	13.350aA
0.5	0.00B	0.00bB	0.00bB	0.00cB
0.7	0.00C	6.670aC	0.00bC	6.670bB
0.9	0.00C	0.00bC	0.00bC	6.670bB
Ort.	0.00	1.33	2.67	5.34

Farklı hormon uygulamaları arasında oluşan farklılıklar istatistiksel olarak LSD 0.05 düzeyinde önemli bulunmuştur.



Şekil 4.9. *A. tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarından elde edilen yavru soğancıklar

Farklı hormon uygulamalarına ait ortalamalar dikkate alındığında soğancık sayısı bakımından en yüksek değer BAP + NAA (0.5 mg/L) + Putresin (300 mg/L) uygulamasından 4.14 adet/eksplant olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.18). En düşük

soğancık sayısı değeri ise indirekt somatik embriyogenesisin görüldüğü 2,4-D uygulamasından elde edilmiştir (Çizelge 4.17).

Çizelge 4.17. Farklı dozlarda 2,4-D uygulamalarında *Allium tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarından *in vitro* soğancık sayısı bakımından elde edilen ortalama değerler

2,4-D(mg/L)	Soğancık sayısı (%)
0.3	0.00
0.5	0.00
0.7	0.00
0.9	0.00
1.2	0.00
Ort.	0.00

Farklı hormon uygulamaları arasında oluşan farklılıklar istatistiksel olarak LSD 0.05 düzeyinde önemli bulunmuştur.

Çizelge 4.18. Farklı hormon uygulamalarının *Allium tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarından *in vitro* soğancık sayısı bakımından elde edilen ortalama değerler

Dozlar	BAP	BAP+0.5 mg/L NAA	BAP+ 300 mg/L Putresin	BAP+300 mg/L Putresin +0.5 mg/L NAA
0.1	0.00cB	0.00cB	0.00eB	0.37dA
0.3	0.00cD	1.000bC	2.00bB	10.33aA
0.5	4.00aA	0.00cC	0.60dB	0.37B
0.7	0.00cB	0.00cB	2.33aA	2.00cA
0.9	0.33bD	2.00aB	1.00cC	7.67bA
Ort.	**0.86**	**0.60**	**1.19**	**4.14**

Farklı hormon uygulamaları arasında oluşan farklılıklar istatistiksel olarak LSD 0.05 düzeyinde önemli bulunmuştur.



Şekil 4.10. *A. tuncelianum* olgunlaşmamış embriyolarının 2,4-D (0.30 mg/L) uygulamasından elde edilen soğancıkların büyütme ortamından sürgün oluşumuna ait görünümü

4.3. Tartışma

Soğanlı bitkilerle ilgili doku kültürü çalışmalarında farklı organlarla soğancığın rejenerasyonu yapılabilmektedir. Eksplant olarak yapraklar, soğan pulları, çiçekli dallar, yumurtalık ve çiçek yaprakları kullanılmaktadır (De Hertogh ve Le Nard, 1993). Doku kültürü çalışmalarında en önemli uygulamanın ve bunların dozlarıdır. Tunceli sarımsağının olgunlaşmamış embriyo eksplantları kullanarak mikroçoğaltımı amacıyla değişen oranda farklı fitohormonların uygulanmasıyla bunların optimum dozların belirlenmesine yönelik çalışılmıştır.

Doku kültürü ortamında yalnız başına BA (BAP) soğan rejenerasyonunun başlatılmasında yeteri değildir. BA yanında KNAA kullanılması rejenerasyonu arttırmaktadır. Bunun temel nedeni, potasyumun hücre büyümesinde, fotosentez ve solunumda enzim aktivitesinin artmasına, klorofil öncül ürünlerinin ve selülozun oluşmasına yardım etmesinden kaynaklanmaktadır (Aasim, 2015).

Farklı eksplantların, kullanılan BBD'ne reaksiyonu faklı olabilmektedir. Sümbül bitkisinde yapılan bir çalışmada kallus oluşumu için soğan pul yapraklarının kullanıldığı, en yavaş kallus gelişimini (1.0 mg/L) NAA uygulamasının verdiği (6 hafta sonrasında), (0.3 mg/L) IBA – (3 mg/L) BAP ise (6 haftada) eksplant başına 3.06 adet soğancık oluşum ile en yüksek değeri verdiği belirtilmektedir (Salehzadeh ve ark. 2008). Yazar (2006), Tunceli sarımsağında *in vitro* sürgün ucu kültüründe, yaklaşık bir ay sonra sürgün uçlarından kardeş oluşturmaya başladığını bildirmektedir. Bununla

birlikte, Tunceli sarımsağının çoğalma katsayısının düşük olduğunu ve sürgün basına yaklaşık bir adet kardeş elde edildiği belirtilmektedir. Soğanlı bitkiler, Monokotiledon bitkiler grubunda olup soğanlarda bir ana gövde oluşmaktadır. Benzer şekilde *in vitro* ortamda da her sürgün bir soğan/soğancık oluşturmaktadır. Direkt somatik embriyo oluşumunda bu durum gözlenmektedir.

Olgunlaşmamış embriyolar hızlı bölünme özelliğine sahip olup, yüksek rejenerasyon kapasitesine sahiptirler. Bu çalışmada da farklı dozlarda kullanılan 2,4-D, BAP, NAA ve 300 mg/L Putresin ve bunların kombinasyonları olgunlaşmamış embriyolarda kallus oluşumu yanında direkt rejenerasyonla soğancık oluşturmuşlardır.

2,4-D uygulamasında oluşan kalluslardan çok sayıda somatik embriyo oluşmuştur. Özellikle 0.3 ve 1.2 mg/L uygulamalarında %20 oranında kallus oluşumu gözlenmiştir. Bu kalluslardan alınan ve soğan büyütme ortamında büyütülen soğanlar kök ve sürgün oluşturmuşlardır.

Tunceli sarımsağında dikey ve yatay kesilmiş yarım soğan eksplantları kullandıkları çalışmada; kallus oluşumu gözlemlenmiş ancak kallustan soğancık elde edilemediğini bildirmektedirler (Kızıl ve ark. 2014b). Benzer şekilde, Yaralı ve Yanmaz (2016), 2 mg/L 2,4-D ve 1 mg/L BAP kombinasyonunun kallus oluşumu için uygun bir doz olduğunu ve kallus oluşum oranının % 55.28 olarak tespit edilmiş, ancak kallustan bitki elde edilemediğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada kallustan soğancık elde edilmesi bir yeniliktir. Yaralı ve Yanmaz (2016)'ın kallustan bitki elde edememeleri farklı eksplant ve kullanılan bitki büyüme düzenleyici ve dozlarından kaynaklandığı düşünülmektedir. 2,4-D ve BAP oksin grubu büyüme düzenleyicilerdir. İkisinin bir arada kullanılması yerine oksin ve sitokinin grubu BBD uygun dozlarının belirlenmesi gerekmektedir (Babaoğlu ve ark. 2002). Kallus oluşturma çalışılan bitki çeşit, tür ve alt türlerinin genotipleri ile ilişkili olduğu gibi kullanılan eksplant tipine göre de farklılıklar göstermektedir. Nitekim düşük dozlarda 2,4-D uygulanması ile kallus oluşumunun başlatılabileceği bildirilmiştir (Matsuda ve Adachi, 1996).

Kizil ve ark. (2014a), Tunceli sarımsağında kök eksplantarı ile soğancık oluşumunu başarıyla gerçekleştirmişlerdir. Araştırıcılar, *in vitro* ortamda soğan eksplantları üzerinde 14 - 15 gün sonra belirgin bir şekilde kök oluşumu gözlemişlerdir. Gelişen kökler, soğanlardan *in vitro* koşullarda kesilip, farklı kombinasyonlarda BAP ve NAA gibi BBD'lerin bulunduğu MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Yaklaşık 2 - 3

gün sonra kök eksplantlarının ucunda şişme şeklinde soğan oluşumu başlamış olup, 5 - 6 gün sonra şişmeler 2 - 3 mm'lik mikro soğana dönüşmüştür. Rejenerasyon gelişmeye devam etmiş, mikro soğanlar 14 - 15 gün sonra 4-5 mm'lik çapa ve 20 - 21 gün sonra 7 - 8 mm'lik çapa ulaşmışlardır. Daha sonra, soğanların hızlı büyümesini sağlamak amacıyla gelişen soğanlar *in vitro* koşullarda kesilip MS ortamına kültüre alınmış, BAP ve NAA içeren MS besi ortamlarında gelişen kök eksplantlarından soğan oluşum oranlarını % 13.33 ile % 100 arasında değiştiğini rapor etmişlerdir. BAP'ın farklı konsantrasyonları ve NAA (0,5 mg/L) uygulamalarının soğan oluşum oranı üzerindeki etkisi incelendiğinde, 1.0, 2.0 ve 3.0 mg/L BAP - 0.5 mg/L NAA içeren ortamlarda BAP'ın konsantrasyonu arttıkça soğan oluşum oranının (%) ve eksplant başına soğan sayısının azaldığı görülmüştür. 1.0 mg/L BAP – 0.5 mg/L NAA konsantrasyonunda soğan oluşum oranı % 46.67 ve eksplant başına soğan sayısı 0.50 (adet) iken bu oran 3.0 mg/L BAP – 0.5 mg/L NAA konsantrasyonunda %13.33 ve 0.13 âdete düşmüştür. Ancak, 4.0 ve 5.0 mg/L BAP – 0.5 mg/L NAA içeren ortamlarda BAP'ın konsantrasyonu arttıkça hem soğan oluşum oranı hem de eksplant başına soğan sayısında artış gözlenmiştir. Soğan oluşum oranının BAP (4.0 mg/L) – NAA (0.5 mg/L) konsantrasyonunda % 60'a ve 5 mg/L BAP – 0.5 mg/L NAA konsantrasyonunda % 100'e çıktığı görülmüştür. Benzer şekilde, BAP 4 mg/L – NAA (0.5 mg/L) uygulamalarında eksplant başına soğan sayısı 0.60 adet iken, 5.0 mg/L BAP – 0.5 mg/L NAA konsantrasyonunda eksplant başına soğan sayısının 1.0'e çıktığını rapor etmişlerdir. Ancak, Yanmaz ve ark. (2010), kök kültüründe soğancık elde edilemediğini, buna mukabil sürgün ucu kültüründen daha başarılı sonuçlar elde ettiklerini bildirmektedirler. Kök eksplantları yüksek mitotik özelliğe sahip olup uygun BBD ve doz kullanımında başarılı sonuçlar verdiği Kızıl ve ark. (2014a) tarafından belirlenmiştir.

Aasim (2015), *A. tuncelianum* ile ilgili yarım soğanları eksplant olarak kullandığı çalışmada BAP'ın (1.00, 0.50 ve 0.25 mg/L) ve KNAA'nın (1.00, 0.50 ve 0.25 mg/L) dozları ile soğuklama uygulaması yapılmış ve yapılmamış soğanlarda; soğuklama uygulanmayan soğanlarda rejenerasyon olmadığını bunun aksine soğuklama uygulanan soğanlarda BAP 0.5 mg/L ve KNAA 0.5 mg/L uygulamasından %75 oranında rejenerasyon gerçekleştiğini bildirmiştir. Bununla birlikte en yüksek soğan ağırlığı değerini BAP (0.25 mg/L) ve KNAA (0.50 mg/L) uygulamasından elde edildiğini bildirmektedir.

Kim ve Soh (1996), Süspansiyon kültürü ile *Allium fistulosum* türünde 0.5 mg/L 2,4-D ve 0.5 mg/L BA içeren MS ortamından sarı renkli kalluslardan elde ettikleri yeşil renkli kallusları 0.5 – 1.0 mg/L BA içeren kültür ortamında geliştirmişlerdir. Buradan elde ettikleri hücre yığınlarını 2,4-D (0.1 ppm) içeren sıvı ortama almışlardır. Bu ortamdan elde ettikleri proembriyoları saksı ortamına başarıyla aktardıklarını bildirmektedirler. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar benzer şekilde 2,4-D ortamının kallus oluşumunu teşvik ettiğini ve bu ortamdan somatik embriyo oluşumunun başarıyla gerçekleştiğini göstermektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Allium tuncelianum ülkemizin ekonomik önemi yüksek endemik soğanlı bir bitkisidir. Bitki lokal bir alanda yetişmekte olup, farklı ekolojik yerlerde yetiştirilmesine yönelik birçok adaptasyonun çalışması yapılmaktadır. Bitkinin Diyarbakır ekolojik koşullarında başarı ile yetiştirilebileceğine ilişkin çalışmalar bulunmaktadır. Yürütülen projeler kapsamında oluşturulan Bitki Doku Kültürü Laboratuvarında yapılan bu çalışma ile aşağıda belirtilen önemli hususlar tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre;

- Doku kültürü yöntemi ile bitkinin çoğaltılma işlemi başarı ile yapılmıştır.
- 2,4-D ile kallus oluşumu ve kallustan soğan elde edilmesi başarıyla gerçekleştirilmiştir. Bu yönüyle bu çalışmadan literatüde ilk olma özelliğine sahip sonuçlar elde edilmiştir.
- 300 mg/L Putresin abiyotik stress koşullarını azaltıcı özelliğe sahip olup, soğan gelişimini olumlu etkilemiştir. Bununla birlikte özellikle soğancık üretimi sonrası uygun doz belirlenerek (optimize edilerek) kullanılmalıdır. Kallustan oluşan soğanlarında varsa mutasyonun tespiti için sitogenetik ve moleküler çalışmaları ile mutant tiplerin belirlenmesi büyük bir önem taşımaktadır.
- Bundan sonra yürütülecek çalışmalarda standart soğan üretim yöntemi/hormon dozu tespit edilerek otomasyon üretim çalışmaları yapılmalıdır.

6. KAYNAKLAR

Aasim, M. 2015. Adventitous bulblet regeneration of endemic Ovacik garlic (*Allium tuncelianum* Kollman, Özhatay, Mathew, Şiraneci) using wintered half clove explant. ***Romanian Biotechnological Letters***, *20*(5), 10845.

Arslan, N., İpek, A. ve Sarıhan, E. O. 2007. Farklı ortamların Tunceli sarımsağı *(Allium tuncelianum)* tohumlarına çıkış ve fide gelişimine etkisi. Türkiye VII. Tarla Bitkileri Kongresi, 25-27 Haziran, Erzurum, s: 462-465.

Atmaca, G. 2003. Sarımsağın ve tiol içeren bazı bileşiklerin antioksidatif etkileri. ***Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi***. 20(1-3):54-60.

Babaoğlu, M., Gürel, E. ve Özcan, E.2002. Bitki biyoteknolojisi, doku kültürü ve uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, 374 s.

Bais H.P., T.S. Walker T.S., Stermitz F.R., Hufbauer R.A. and Vivanco J.M. 2002. Enantiomeric dependent phytotoxic and antimicrobial activity of (±) -catechin; a rhizosecreted racemic mixture from Centaurea maculosa (spotted knapweed), Plant Physiol. 128, 1173–1179.

Başer, K. H. C., Koyuncu, M. ve Koşar. M. 1993. Türkiye'de yetişen bazı *Allium* türlerinin (sect. *Allium*) kükürtlü bileşikleri yönünden incelenmesi. (Yayınlanmamış TÜBİTAK projesi sonuç raporu), Sayfa:82

Bektaş, İ. 2010. Hücre kültürü ortamında çörek otu (*Nigella sativa*) ve sarımsak (*Allium sativum*) ekstraktlarının DNA hasarı üzerine etkisinin araştırılması, Doktora Tezi, Harran Üniversitesi Şanlıurfa.

Brewster, J. L. 1994. Onions and other vegetable *Alliums*. Cab International.

Cavallito, C. J. and Bailey, J. H. 1944. Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum. L.* Isolation, physical properties and antibacterial action. ***Journal of the American Chemical Society,****66* (11), 1950-1951.

Davis, PH. 1988. Flora of Turkey and The East Aegean Island. Edinburg Universty Press.Vol:19.

De Hertogh, A. and M. Le Nard, 1993."The physiology of flower bulbs". ***Elsevier Science Publ***, Amsterdam.

Devrim, E. 2004. Hücre kültürü yöntemleri ve çeşitli hücre serilerinde sarımsak bileşenlerinin etkileri (Seminer). Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı 19-21, 53-59.

Ebrahimi, R., and Zamani, Z. 2009. Effect of polyamines on *in vitro* gynogenesis of onion (*Allium cepa L.*) Am- Eurasian J. Sustain. Agric., 3(1): 71-75.

Ekim T., Koyuncu, M., Vural M., Duman, H., Aytaç, Z., ve Adıgüzel, N. 2000. Türkiye bitkileri kırmızı kitabı. Türkiye Tabiatını Koruma Derneği. Yayın No: 18, Sayfa:118-118.

Etoh. T., and P.W. Simon. 2002. Diversity, fertility and seed production of garlic. ***Allium cropScience Chapter***, 5: 101-111.

Fırat, 2015. The ethnobotanical usage of some east Anatolian (Turkey) *Allium L.* species. ***Manas Journal of Agriculture and Life Science,***MJAL 5 (1) 80-86.

Geoffriau, E., Kahane, R., and Tanguy, J.M. 2006. Polyamines are involved in the gynogenesis process in onion. Physiologia Plantarum, 127: 119-129.

Güner, A., Özhatay, N., Ekim., T., and Başer, K. H.C. 2000.Flora of Turkey and the East Aegean Islands, supplement II, Vol. XI., Edinburgh University Press. Edinburgh.

Haider, S. R., Hossain, M. R., Rahman, S., Sultana, S., Quddus, T., Chakraborti, M., and Haque, M. A. 2015. *In vitro* plantlet regeneration of four local garlic (*Allium sativum*). ***British Biotechnology Journal***. 8(3): 1-12.

Hanelt, P. 1990. Onions and allied crops.Vol. 1. Botany, Physiology and Genetics. CRC. Press, Boca Raton, Florida, pp. 1-26.

Helaly, A.A., Abdelghafar., M.S., Al-Abd, M.T. and Alkhearpotly. A.A. 2016. Effect of soaked *Allium cepa L*. bulbs in growth regulators on their growth and seeds production. ***Advances in Plants and Agriculture Research***, 4(3): 00139.

Kakkar, R. K. and Sawhney, V. P. 2002. Polyamines reserch in plants: A changing perspective, phsiol plant, 116-281.

Kızıl, S., Khawar., K.M., Tonçer., and Ö. Sağlam, S. 2014a. Güneydoğu ve Doğu Anadolu bölgelerinde yayılış gösteren ve ekonomik öneme sahip bazı soğanlı bitkilerin yetiştirilme ve çoğaltılma olanaklarının araştırılması. TÜBİTAK – 110 O 703 Nolu Proje, Sonuç Raporu, 145 s.

Kızıl, S., Icgil, D. Y. and Khawar, K. M. 2014b. Improved *in vitro* regeneration and propagation of Tunceli garlic (*Allium tuncelianum*). ***The Journal of Horticultural Science and Biotechnology***, *89*(4), 408-414.

Kızıl, S., and Khawar, K. M. 2015. Effect of planting depths on some agronomic characteristics of *Allium tuncelianum*. ***Scientific Papers-Series B, Horticulture,*** (59), 229-232.

Kızıl, S., and Khawar, K. M. 2017. Plasticity and adaptability of Tunceli garlic (*Allium tuncelianum* Kollman) under semiarid ecological conditions of South-East Anatolia. ***AgroLife Scientific Journal.*** *6*(1), 146-153.

Kızıl, S., Khawar, K. M., and Sogut T. 2017. Germination and bulb formation of *Allium tuncelianum* under *in vitro* condition. 19 th International Cofrence on Agriculture and Biotechnology.

Kim, J. W., and Soh, W. Y. 1996. Plant regeneration through somatic embryogenesis from suspension cultures of *Allium fistulosum L*. ***Plant Science***, *114*(2), 215-220.

Kollman, F. 1983. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol. 8. Edinburgh University Pres, Page, 98-208. Edinburgh.

Koyuncu, M., ve Güvenç, A. 1994. Türkiye'nin endemik *Allium L*. (soğan) türleri. Tübitak Projesi (Proje No: TBAG-1089). Ankara.

Lawson, L.D.1998. Garlic: a review of its medicinal effects and indicated active compounds. ***Phytomedicines of Europe: Chemistry and Biological Activity***, Series 691, DC American Chemical Society, Washington, s. 176-209.

Matsuda, Y., and Adachi, T. 1996. Plant regeneration via embryogenesis in commercial cultivars of Chinese Chive (*Allium tuberosum* Rottl.). ***Plant Science***, 119:149-156.

Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. ***Physiologia plantarum***, *15*(3), 473-497.

Özhatay, N. 2002. Diversity of bulbous monocots in Turkey with special reference. Chromosome numbers. ***Pure and applied chemistry,****74*(4), 547-555.

Özhatay, N., and Şiraneci, Ş. 1992. Comperative morphological, anatomical and priliminary chemical studies on two subspecies of *Allium macrochaetum Boiss*. et a Houssin in Turkey. İstanbul eczacılık Fakültesi Mec. 26-28, 31.

Özhatay, N., Koyuncu, M., Atay, S., and Byfield, A. 1997. Türkiye'nin doğal tıbbi bitkilerinin ticareti hakkında bir çalışma. Wwfuk/Stanley Smith Horticultural Trust. Doğal Hayatı Koruma Derneği, İstanbul, Türkiye I.S.B.N. 975-96081-9-7.

Pooler, M. R. and Simon, P. W. 1994. True seed production in garlic. ***Sexual Plant Reproduction,*** *7*(5), 282-286.

Rabinowich, H. D. and Brewster, J.L. 1990. Onion and Allied crops. Vol I. botany, physiology, and genetics, 273, CRC press. Boca Raton, Florida.

Rahman, M. H., Haque, M. S., and Ahmed, M. 2003. Pre-planting temperature treatments for breaking dormancy of garlic cloves. ***Asian Journal of Plant Sciences***, Vol 2, pp. 123-126.

Rahman, M.S. 2007. Allicin and other functional active components in garlic. Health Benefits and Bioavailability. ***International Journal of Food Properties***, 10: 245–268.

Rivlin, R.S. 2001. Historical perspective on the use of garlic. ***American Society for Nutritional Sciences***, 131: 951–954.

Salehzadeh, S.H., Daneshvar, M.H., and Moallemi, N. 2008. Indirect organogenesis from *scale*, leaf primordia and immature floret explant of *hyacinth* (*Hyacinthus orientalis L.).* American-Eurasian j. Agric. Environ. Sci.,4(5), 640-645.

Scotton, D. C., Benedito, V. A., De Molfetta, J. B., Rodrigues, B. I. F., Tulmann-Neto, A., and Figueira, A. 2013. Response of root explants to *in vitro* cultivation of marketable garlic cultivars. ***Horticultura Brasileira***. *31*(1), 80-85.

Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Bekat, L., ve Leblebici, E. 1995. Tohumlu bitkiler sistematiği. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi, 116, 394.

Sermenli, M. H. 2006. Farklı yöntemlerle elde edilen sarımsak (*Allium sativum L.*) ekstraktlarının antimutagenik etkilerinin araştırılması. Yüksek Lisan Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Aydın.

Snedecor, G.W., and Cochran,W.G.1967. Statistical methods. The Iowa State Univ.Press, Iowa.USA327-329.

Taşkın, R., Özgen, U., Babacan, M., Tuncel, E., and Koyuncu, M.1997.Compartive study on antimicrobial activities of garlic and some *allium* spicies. Journol of Faculty of Pharmacy of Ankara Universty, 26:2 1015-3918.

Taşkın, H., Baktemur, G., Kurul, M., and Büyükalaca, S. 2013. Use of tissue culture techniques for producing virus-free plant in garlic and their identification through real-time PCR. ***The Scientific World Journal,*** Article ID 781282 pages 5.

Yanmaz, R., ve Ermiş, S. 2005. Tunceli sarımsağı (*Allium tuncelianum* Kollman, Özhatay,. Matthew, Şiraneci)) tohumlarındaki çimlenme probleminin çözülmesi üzerine araştırma. Türkiye 2. Tohumculuk kongresi, Adana, s: 101- 106.

Yanmaz, R., Yazar, E., Kantoğlu, Y. and Alper, A. 2010. *In vitro* plant regeneration and bulblet formation of Tunceli garlic (*Allium tuncelianum* (Kollman) Özhatay, Matthew, Siraneci). By Shoot and Root Culture. Journal of Food, Agriculture and Environment, Vol: 8(3-4): 572- 576.

Yaralı, F. and Yanmaz R. 2016. The Effects ofmedia composition on *in vitro* gynogenic embryo induction in *Allium tuncelianum* Kollman, Özhatay, Matthew, Şiraneci). ***International Journal of Agriculture Sciences,***Volume 8, Issue 58, pp. 3247-3251.

Yazar, E. 2006. TDS'nda (*A. tuncelianum* Kollman, Özhatay, Matthew, Şiraneci*) In vitro* kök ve sürgün ucu kültürü yoluyla çoğaltma. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi. Ankara.

http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollection/NCLCollectionStore/_Public/42/097/42097932. pdf. Erişim Tarihi: 03.12.2017

http://www.torut.com; Erişim Tarihi: 02.12.2017

ÖZGEÇMİŞ

Ümit ACAY 01.11.1987 yılında Mardin'de doğdu. İlkokulu Sakarya İlköğretim Okulu, Ortaokulu Noter Cevdet Altun İlköğretim Okulu ve lise eğitimini Mardin Anadolu Lisesinde tamamladı. 2009-2014 yılları içerisinde Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümünde lisans eğitimini tamamladı.

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI İNTİHAL RAPORU FORMU

ÖĞRENCİ BİLGİLERİ	
ADI VE SOYADI	Ümit ACAY
ÖĞRENCİ NO	15811014
EĞİTİM – ÖĞRETİM YILI	2017-2018
YARIYIL	☒ Güz☐Bahar
ANABİLİM DALI	Tarla Bitkileri
PROGRAM	Yüksek Lisans
TEZ KONUSU	Endemik Tunceli Sarımsağının (*Allium tuncelianum*) Olgunlaşmamış Embriyolarının *In Vitro* Rejenerasyonu Üzerine Çalışmalar
İNTİHAL RAPORU BİLGİLERİ	
RAPOR TÜRÜ	Tez Savunma Sınavı Sonrası
SAYFA SAYISI	54
BENZERLİK ORANI	% 24
RAPORLAMA TARİHİ	06/02/ 2018

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın kapak sayfası, giriş, ana bölümler, sonuç ve tartışma kısımlarından oluşan toplam 54 sayfalık kısmına ilişkin, 06/02/ 2018 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan intihal raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 24 'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

- ☐ Kabul/Onay sayfaları hariç,
- ☐ Kaynakça hariç
- ☐ Alıntılar hariç/dâhil
- ☐ Diğer

Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Programlarda Tez Çalışması İntihal Raporu Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edilmesi durumunda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

(İmza)
Ümit ACAY

(İmza) 06/02/ 2018 Doç.Dr. Özlem TONÇER **Tez Danışmanı**	(İmza) 06/02/ 2018 Prof.Dr. Davut KARAASLAN **Anabilim Dalı Başkanı**