



Sürgün uçları kullanarak tıbbi ve süs bitkisi özelliği olan *Arum italicum* MILLER bitkisinden *in vitro* sürgün çoğaltımı

Efficient *in vitro* shoot induction of (*Arum italicum* MILLER) using shoot tips as medicinal and ornamental plant

Hussein Abdullah Ahmed AHMED¹, Serkan URANBEY², Cennet YAMAN³

¹Uşak Üniversitesi, Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, 64200, Uşak

²Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, 06100, Ankara

³Bozok Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, 66100, Yozgat

Sorumlu yazar (*Corresponding author*): H. A. A. Ahmed, e-posta (*e-mail*): huseyin.ahmed@usak.edu.tr

Yazar(lar) e-posta (*Author e-mail*): emuranbey@yahoo.com, cennet.yaman@bozok.edu.tr

MAKALE BİLGİSİ

Alınış tarihi 07 Ağustos 2018
Düzeltilme tarihi 01 Ekim 2018
Kabul tarihi 07 Ekim 2018

Anahtar Kelimeler:

Mikroçoğaltım
Arum italicum
Geofit
Doku Kültürü

ÖZ

Akdeniz bölgesinde yayılış gösteren, ülkemizde gen merkezi konumunda olduğumuz *Arum* cinsine ait bazı türleri, tıbbi ve süs bitkisi amaçlı doğadan düzensiz toplanmakta ya da yetiştirilerek uzun yıllardır ihraç edilmektedir. Ülkemizde *Arum italicum* MILLER türünün üretiminde fungal hastalıklar yumru verimini azaltmakta, yavru yumru oluşturmada için uzun zamana ihtiyaç duyması nedeniyle üretiminde sorunlar bulunmakta, ayrıca, doğadan düzensiz toplanması sonucu ekolojik problemlerle karşılaşmaktadır. Bu çalışmanın da amacı, *Arum italicum*'da ilk kez doku kültürü teknikleriyle patojenlerden arı hızlı çoğaltımıdır. Çalışmada, *Arum italicum* yumruları dormansi kırılacak şekilde soğuk ortamda (+4 °C) kültüre alınmış, daha sonra sürgün uçları farklı konsantrasyonlarda sitokinin 6-Benzylaminopurin (BAP), Kinetin (KIN), Thidiazuron (TDZ) ve oksin Indol-3-asetik asit (IAA), Indol-3-bütirik asit (IBA) ve Naftalenasetik asit (NAA) içeren besin ortamlarında kültüre alınmıştır. En yüksek sürgün rejenerasyonu (% 35.0) ve en yüksek eksplant başına sürgün sayısı (0.75 adet) 2 mg l⁻¹ BAP ve 0.50 mg l⁻¹ NAA uygulamasından elde edilmiş, bitkiciklerin ortalama % 52'si başarılı bir şekilde aklimatize edilerek yayılatılmıştır.

ARTICLE INFO

Received 07 August 2018
Received in revised form 01 October 2018
Accepted 07 October 2018

Keywords:

Micropropagation
Arum italicum
Geophytes
Tissue culture

ABSTRACT

Arum italicum MILLER is mainly distributed in the Mediterranean also cultivated and exported in Turkey. The genus *Arum* have been irregularly collected from their natural habitat and exported for food, medicinal and ornamental uses in our country and especially fungal diseases and other pathogens and comparatively result in low tuber yield in growing of *Arum italicum*. Therefore, we aimed to develop a efficient regeneration system for pathogen free production of *Arum italicum*. Tubers of *Arum italicum* were washed with distile water and pre-treated with cold (+4 C), and then, shoot tips, were isolated and cultured on MS medium supplemented with combinations of cytokinin 6-Benzylaminopurin (BAP), Kinetin (KIN), Thidiazuron (TDZ) and auxin Naphthaleneacetic acid (NAA), Indole-3-butyric acid (IBA), Indole-3-acetic acid (IAA) and 30 g l⁻¹ sucrose and 7 g l⁻¹ agar. The highest shoot regeneration (35%) and the highest number of shoot per explant (0.75) were achieved on MS medium supplemented with 2 mg l⁻¹ BAP and 0.50 mg l⁻¹ NAA from shoot tips. The plantlets were acclimatized with high survival ratio (52%).

1. Giriş

Aroideae alt familyası 78 cins ile temsil edilmekte olup (Davis 1984; Grayum 1990; Linz ve ark. 2010), *Arum* cinsi 29 türe sahiptir. Bu cinsde ait türler çoğunlukla Akdeniz bölgesinde, Orta Doğu'da, Orta Asya'da ve Kuzey Avrupa'da yayılış göstermektedir (Boyce 1993; Boyce 2006; Lobin ve ark. 2007; Linz ve ark. 2010). *Arum* türleri değişik organ ve dokularda

kalsiyum okzalit kristalleri, okzalit asit, çözünen okzalitler içeren toksik türlerdir (Barabé ve ark. 2003; Kandemir 2008). Genellikle ilkbaharda çiçek açmakta olup, kış mevsiminde yapraklı kalmaları, iri, gösterişli, renkli çiçeleri, dekoratif yaprak yapısı ve ontogenesiz süresince yeşil ve sarı renk dönemleri geçerek beyazdan portakal turuncuya kadar renk

değişimi gösteren meyveleri (Bonora ve ark. 2000) ile başta Avrupa ülkeleri olmak üzere, park, bahçe, süs havuzları, mezarlıklar, doğal ve suni rekreasyon alanlarının süslenmesinde ve saksı çiçeği olarak mekanlarda kullanılmaktadır. Yumruları ve yaprakları yemeklik olarak, kullanıldığı gibi yaprakları, meyveleri ve yumruları tıbbi amaçlı ve yumrularının içerdiği nişasta yapısından dolayı endüstriyel olarak kullanılmaktadır (Prime 1960; Espindola ve ark. 2010). Yumruları % 13.5-20 nişasta ve % 3.6-4.3 civarında protein içermekte ve haşlanarak yaprakları ile birlikte dünyada ve ülkemizde yemeklik olarak tüketildiği bilinmektedir (Alpınar 1985). *Arum* cinsine ait türler yaprak ve yumrular saponin ve konisin gibi alkaloidleri içermekte olup, taze yumrular dış yüzeyden romatizmaya karşı, kurutulmuş yumrular cilt hastalıklarının tedavisinde (Alpınar 1985), böbrek taşı, kolit, karaciğer hastalığı (Kozuharova ve ark. 2014), sıtma (Adams ve ark. 2011) bağırsak ve solunum yollarında iltihab giderici olarak halk hekimliğinde bazı *Arum* türleri ise ateş düşürücü olarak kullanılmaktadır (Alencar ve ark. 2005). Ülkemizde de *Arum* türlerinden, *A. balansanum*, *A. detruncatum* ve *A. elongatum* hemoroit tedavisinde (Gurhan ve Ezer 2004; Demirci ve Ozhatay 2012;), *A. maculatum* 'un kolit tedavisinde (Everest ve Ozturk 2005) *A. elongatum* tansiyon düşürücü, karın ağrısı giderici, diyabet hastalıkları, guatr ve romatizmal hastalıklarda (Polat ve ark. 2013), pek çok *Arum* türü ise akrep ve yılan sokmalarını nötralize etmek için ve olgun meyvelerin basur hastalığının (Kandemir 2008) tedavisinde etnobotanik olarak kullanılmaktadır.

Türkiye florasında doğal olarak yetişen gıda, tıbbi amaçlı ve süs bitkisi olarak kullanılan *A. italicum* (Yılanıyastığı, Yılan bacağı) türünün de doğal yetiştiği alanlardan sökülerek veya üretimi yapılarak ülkemizden ihraç edilmektedir. Bu bitkilerde yetiştiricilik tekniğinin iyi bilinmemesi ve bitkilerin uygun olmayan koşullarda yetiştirilmesi, bitkide yumru verimi düşüklüğüne, ayrıca fungal hastalıklar başta olmak üzere, bakteriyel veya diğer patojenler ürün kayıplarına yol açmaktadır. Özellikle *Arum* türlerinde de genel olarak tohumdan gelişen fidelerde çiçek oluşumu için 3-4 yıla gereksinim vardır (Bryan 2002). Bu da üretimi sınırlayan bir faktör olup, uygunsuz koşullarda az sayıda yumru meydana getirmesi üretimde karşılaşılan bir diğer problemdir. *Arum* türleri ile çok sınırlı doku kültürü çalışması yapılmış olup (*A. palaestinum*; Farid ve ark. 2014; Shibli ve ark. 2012) *A. italicum* şimdiye değin etkili ve geniş kapsamlı bir doku kültürü çalışmasına rastlanmamıştır. Bu bağlamda; bu çalışmada ülkemiz için önemli bitki türlerinden olan *Arum italicum*'un *in vitro* koşullarda doku kültürü yoluyla hızlı ve patojenlerden arı çoğaltılabilmesi amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Bitki materyali ve hazırlanması

Çalışmada bitki materyali olarak *Arum italicum* türüne ait yumrular, özel bir firma tarafından temin edilmiştir. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü deneme tarlasına dikilen yumrular, haziran ayında sökülüş, sökülen yumrular kuruması için oda sıcaklığında karanlıkta 1-1.5 ay, dormansi istediği içinde 4 °C'de 1-2 ay kadar bekletilmiştir.

2.2. Besin ortamı ve doku kültürü koşulları

Çalışmada MS (Murashige ve Skoog 1962), veya MS Gamborg B₅ (Gamborg ve ark. 1968) mineral ve vitaminleri kullanılmıştır. Besin ortamlarının pH'sı 1 N NaOH ya da 1 N

HCl kullanılarak 5.8'e ayarlandıktan sonra 1.2 atmosfer basınç altında ve 121 °C'de 20 dakika tutularak steril edilmiştir. Tüm kültürler beyaz florasan ışığında 16 saat ışık ve 8 saatlik karanlık fotoperiyotta 20-24 °C'de tutulmuştur. Çalışmada temel besin ortamı olarak MS (Murashige ve Skoog 1962), 6-Benzylaminopurin (BAP) (1.0-4.0 mg l⁻¹), Kinetin (KIN) (0.5-2.0 mg l⁻¹), Thidiazuron (TDZ) (0.25-0.50 mg l⁻¹), Indol-3-asetik asit (IAA), (0.10-0.40 mg l⁻¹), Indol-3-bütirik asit (IBA) (1.0 mg l⁻¹) ve Naftalenasetik asit (NAA) (0.25-1.00 mg l⁻¹) ise büyüme düzenleyici olarak kullanılmıştır.

2.3. Eksplantların sterilizasyonu, izolasyonu ve kültüre alınması

Yumrular deterjanlı su ile yıkanıp steril su içinde 45 dakika ardından % 95' lik etanolde 5 dakika bekletilmiş olup, 10 g l⁻¹ captan (fungisit) saf su içerisine ilave edilerek 30 dakika bekletilmiştir. Daha sonra % 90 oranında ticari çamaşır suyu (% 5 NaClO) ile 25 ve 50 dakika yüzey sterilizasyonuna tabi tutulup, yumrular 3 kez 5'er dakika süreyle steril saf su ile durulanmıştır. Dormansi sonrası gelişen sürgün uçlarından meristamik dokuları içeren 2.5-3.0 cm boyundaki sürgün uçları izole edilmiştir.

2.4. Elde edilen adventif sürgünlerin köklendirilmesi ve aklimatizasyonu

Kültür tüplerinde gelişen sürgünler steril kabin içerisinde 1 mg l⁻¹ IBA, 0.5 g l⁻¹ aktif karbon içeren ve 6 g l⁻¹ ile katılaştırılan ½ MS (yarı indirgenmiş) besin ortamında köklendirilmiştir. Daha sonra dış koşullara kolay adaptasyon ve hızlı nem kaybını engellemek amacıyla bitkiler şebeke suyu içinde 10-15 dk bekletilmiştir. Adaptasyon sağlamak amacıyla bitkiler torf-perlit kompozisyonuna transfer edilmiştir. Sürgünlerde oluşan adventif kökler toprağa aktarılmadan önce köklendirme ortamlarında 4 °C'de 4-6 hafta ön üşütmeye tabi tutulmuştur. Daha sonra, birkaç gün yüksek nemde (% 80-90) tutularak bitkiciklerin hem şartlara uyumu hem de kök sisteminin gelişmesi beklenmiş olup, yaşayan bitkiler aklimatize edilmiştir. İki hafta sonra gözlenen sonucuna göre 1:1 oranında hazırlanmış olan torf-perlit içeren karışımda canlılığını kayıp etmeden adaptasyonu sağlanmıştır.

2.5. İstatistiksel değerlendirme

Çoğaltım deneyleri 4 tekerürlü olarak Tesadüf Parselleri Deneme Desenine göre kurulmuş olup, her bir tekerrürde 5 ya da 10 ekplantın kültüre alındığı magenta ya da tekli disposable tüpler kullanılmıştır. Çalışmadan elde edilen veriler bilgisayarda "SPSS for Windows" programı ile tesadüf parselleri deneme desenine göre analiz edilmiştir. Uygulama ortalamaları Duncan testi ile karşılaştırılmıştır. Yüzde değerleri istatistik analizi yapılmadan önce "arcsin transformasyon"una tabi tutulmuştur (Snedecor ve Cochran 1967).

3. Bulgular

3.1. Farklı KIN X NAA kombinasyonlarının *Arum italicum* sürgün uçlarından *in vitro* sürgün rejenerasyonuna etkisi

Arum italicum sürgün uçları farklı KIN x NAA kombinasyonlarından oluşan MS besi ortamında kültüre alınmıştır. Farklı KIN ve NAA konsantrasyonlarının *Arum italicum* sürgün rejenerasyon oluşumuna etkilerine ait varyans analizi sonuçlarına göre, *Arum italicum* sürgün uçlarında KIN x NAA konsantrasyonlarının sürgün oluşturan eksplant yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısı üzerine etkisi 0.01 düzeyinde

önemli bulunmuştur. KIN ve NAA konsantrasyonlarının sürgün oluşturan eksplant oranına etkisine ait yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 1’de verilmiştir. Sürgün oluşturan eksplant yüzdesi en fazla (% 12.50) 1 mg l⁻¹ KIN + 0.50 mg l⁻¹ NAA ve 2 mg l⁻¹ KIN + 1 mg l⁻¹ NAA içeren besin ortamında elde edilirken en yüksek eksplant başına sürgün sayısı (0.35 adet) 2 mg l⁻¹ KIN ve 1 mg l⁻¹ NAA uygulamasından elde edilmiştir. En düşük eksplant başına sürgün sayısı ise (0.00 adet) 0.5 ile 1.5 mg l⁻¹ KIN, 0.25 ile 0.75 mg l⁻¹ NAA ve kontrol ortamında saptanmıştır.

3.2. Farklı KIN X IAA kombinasyonlarının kombinasyonlarının *Arum italicum* sürgün uçlarından in vitro sürgün rejenerasyonuna etkisi

Arum italicum sürgün uçları farklı KIN x IAA kombinasyonlarından oluşan MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Farklı KIN ve IAA konsantrasyonlarının *Arum italicum* sürgün rejenerasyon oluşumuna etkilerine ait varyans analizi sonuçlarına göre, *Arum italicum* sürgün uçlarında KIN x IAA konsantrasyonlarının sürgün oluşturan eksplant yüzdesi 0.05 ve eksplant başına sürgün sayısı üzerine etkisi 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur. KIN ve IAA konsantrasyonlarının sürgün rejenerasyonu üzerine etkisine ait yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 2’de verilmiştir. Çizelge 2 incelendiğinde, sürgün oluşturan eksplant yüzdesi en fazla

(% 17.50) ve en yüksek eksplant başına sürgün sayısı (0.15 adet) 2 mg l⁻¹ KIN ve 0.40 mg l⁻¹ IAA uygulamasından elde edilirken, en düşük eksplant başına sürgün sayısı (0.00 adet) 0.5 mg l⁻¹ KIN ve 0.10 mg l⁻¹ IAA ve 1.5 mg l⁻¹ KIN ve 0.30 mg l⁻¹ IAA içeren besin ortamında elde edilmiştir.

3.3. Farklı BAP X NAA kombinasyonlarının *Arum italicum* türünde in vitro sürgün rejenerasyonuna etkisi

Arum italicum sürgün uçları kültüre alındıktan sonra farklı BAP x NAA kombinasyonlarından oluşan MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının *Arum italicum* sürgün rejenerasyon oluşumuna etkilerine ait varyans analizi sonuçlarına göre, *Arum italicum* sürgün uçlarında BAP x NAA konsantrasyonlarının sürgün oluşturan eksplant yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısı üzerine etkisi 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur. BAP ve NAA konsantrasyonlarının sürgün oluşturan eksplant oranına etkisine ait yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 3’de verilmiştir. Sürgün oluşturan eksplant yüzdesi en fazla (% 35.0) 3 mg l⁻¹ BAP ve 0.75 mg l⁻¹ NAA MS besin ortamında elde edilirken, en yüksek eksplant başına sürgün sayısı (0.75 adet) 2 mg l⁻¹ BAP ve 0.50 mg l⁻¹ NAA uygulamasından elde edilmiştir. En düşük sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (% 7.5) kontrol ve % 17.5 ile 1 mg l⁻¹ BAP ve 0.25 mg l⁻¹ NAA içeren MS besin ortamında elde edilmiştir.

Çizelge 1. Farklı KIN ve NAA konsantrasyonlarının *Arum italicum*’da sürgün ucu eksplantında sürgün rejenerasyonuna etkisi.

Table 1. Effects of different concentrations of KIN and NAA on shoot tips regeneration of *Arum italicum*.

Büyüme düzenleyiciler (mg l ⁻¹)		Sürgün Oluşturan Eksplant Oranı (%)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet)**
KIN	NAA		
-	-	0.00 b*	0.00 c*
0.5	0.25	0.00 b	0.00 c
1	0.50	12.50 a	0.22 b
1.5	0.75	0.00 b	0.00 c
2	1	12.50 a	0.35 a

*) Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

**) Eksplant başına sürgün sayısı sürgün oluşturmamayan eksplantlarda dikkate alınarak hesaplanmıştır.

Çizelge 2. Farklı KIN ve IAA konsantrasyonlarının *Arum italicum*’da sürgün ucu eksplantında sürgün rejenerasyonuna etkisi.

Table 2. Effects of different concentrations of KIN and IAA on shoot tips regeneration of *Arum italicum*.

Büyüme düzenleyiciler (mg l ⁻¹)		Sürgün Oluşturan Eksplant Oranı (%)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet)***
KIN	IAA		
-	-	5.0 bc*	0.05 b **
0.5	0.10	0.0 c	0.00 b
1	0.20	12.5 ab	0.12 a
1.5	0.30	0.0 c	0.00 b
2	0.40	17.50 a	0.15 a

*) Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.

**) Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

***) Eksplant başına sürgün sayısı sürgün oluşturmamayan eksplantlarda dikkate alınarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3. Farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının *Arum italicum*’da sürgün ucu eksplantında sürgün rejenerasyonuna etkisi.

Table 3. Effects of different concentrations of BAP and NAA on shoot tips regeneration of *Arum italicum*.

Büyüme düzenleyiciler (mg l ⁻¹)		Sürgün Oluşturan Eksplant Oranı (%)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet)**
BAP	NAA		
-	-	7.5 c*	0.08 e*
1	0.25	17.5 b	0.225 d
2	0.50	18.75 b	0.75 b
3	0.75	35.0 a	1.22 a
4	1	22.25 b	0.575 bc

*) Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

**) Eksplant başına sürgün sayısı sürgün oluşturmamayan eksplantlarda dikkate alınarak hesaplanmıştır.

3.4. Farklı BAP X IAA kombinasyonlarının *Arum italicum* türünde *in vitro* sürgün rejenerasyonuna etkisi

Arum italicum sürgün uçları teşvik ortamında kültüre alındıktan sonra farklı BAP x IAA kombinasyonlarından oluşan MS besi ortamında kültüre alınmıştır. Farklı BAP ve IAA konsantrasyonlarının *Arum italicum* sürgün rejenerasyon oluşumuna etkilerine ait varyans analizi sonuçlarına göre, *Arum italicum* sürgün uçlarında BAP x IAA konsantrasyonlarının sürgün oluşturan eksplant yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısı üzerine etkisi 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur. BAP ve IAA konsantrasyonlarının sürgün oluşturan eksplant oranına etkisine ait yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4'te verilmiştir. Sürgün oluşturan eksplant yüzdesi en fazla (% 30.0) 4 mg l⁻¹ BAP ve 0.40 mg l⁻¹ IAA içeren MS besin ortamında elde edilirken en yüksek eksplant başına sürgün sayısı (0.225 adet) 4 mg l⁻¹ BAP ve 0.40 mg l⁻¹ IAA uygulamasından elde edilmiştir. En düşük eksplant başına sürgün sayısı kontrol ve (00.0 adet) 2 mg l⁻¹ BAP ve 0.20 mg l⁻¹ IAA içeren MS besin ortamında elde edilmiştir.

3.5. Farklı TDZ X NAA kombinasyonlarının *Arum italicum* türünde *in vitro* sürgün rejenerasyonuna etkisi

Arum italicum sürgün uçları farklı TDZ x NAA kombinasyonlarından oluşan MS besi ortamında kültüre alınmıştır. Farklı TDZ ve NAA konsantrasyonlarının *Arum italicum* sürgün rejenerasyon oluşumuna etkilerine ait varyans analizi sonuçlarına göre, *Arum italicum* sürgün uçlarında TDZ x NAA konsantrasyonlarının sürgün oluşturan eksplant yüzdesi üzerine etkisi 0.01 düzeyinde önemli bulunmuş ve eksplant başına sürgün sayısı arasında istatistikî fark görülmemiştir. TDZ ve NAA konsantrasyonlarının sürgün oluşturan eksplant oranına etkisine ait yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 5'te verilmiştir. Sürgün oluşturan eksplant yüzdesi en fazla (% 7.5) 0.25 mg l⁻¹ TDZ ve 0.50 mg l⁻¹ NAA içeren MS besin ortamında elde edilirken, buna karşılık olarak en yüksek eksplant başına sürgün sayısı (0.22 adet) 0.25 mg l⁻¹ TDZ ve 0.50 mg l⁻¹ NAA uygulamasından elde edilmiştir. En düşük eksplant başına sürgün sayısı (0.00 adet) 0.25 ile 0.50 mg l⁻¹ TDZ ve 0.25, 0.75 ve 1 mg l⁻¹ NAA içeren ve 7 g l⁻¹ agar ile katılaştırılan besin ortamında elde edilmiştir.

Çizelge 4. Farklı BAP ve IAA konsantrasyonlarının *A. italicum*'da sürgün ucu eksplantında sürgün rejenerasyonuna etkisi.

Table 4. Effects of different concentrations of BAP and IAA on shoot tips regeneration of *Arum italicum*.

Büyüme düzenleyiciler (mg l ⁻¹)		Sürgün Oluşturan Eksplant Oranı (%)	Eksplant Başına sürgün Sayısı (Adet)
BAP	IAA		
-	-	0.0 c*	0.0 b**
1	0.10	2.5 c	0.05 b
2	0.20	0.0 c	0.00 b
3	0.30	15.0 b	0.20 a
4	0.40	30.0 a	0.225 a

*) Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

**) Eksplant Başına sürgün sayısı sürgün oluşturmeyen eksplantlarda dikkate alınarak hesaplanmıştır.

Çizelge 5. Farklı TDZ ve NAA konsantrasyonlarının *A. italicum*'da sürgün ucu eksplantında sürgün rejenerasyonuna etkisi.

Table 5. Effects of different concentrations of TDZ and NAA on shoot tips regeneration of *Arum italicum*.

Büyüme düzenleyiciler (mg l ⁻¹)		Sürgün Oluşturan Eksplant Oranı (%)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet)
TDZ	NAA		
-	-	0.0 a*	0.0***
0.25	0.25	0.0 a	0.0
0.25	0.50	7.5 a	0.22
0.50	0.75	0.0 b	0.0
0.50	1	0.0 b	0.0

*) Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

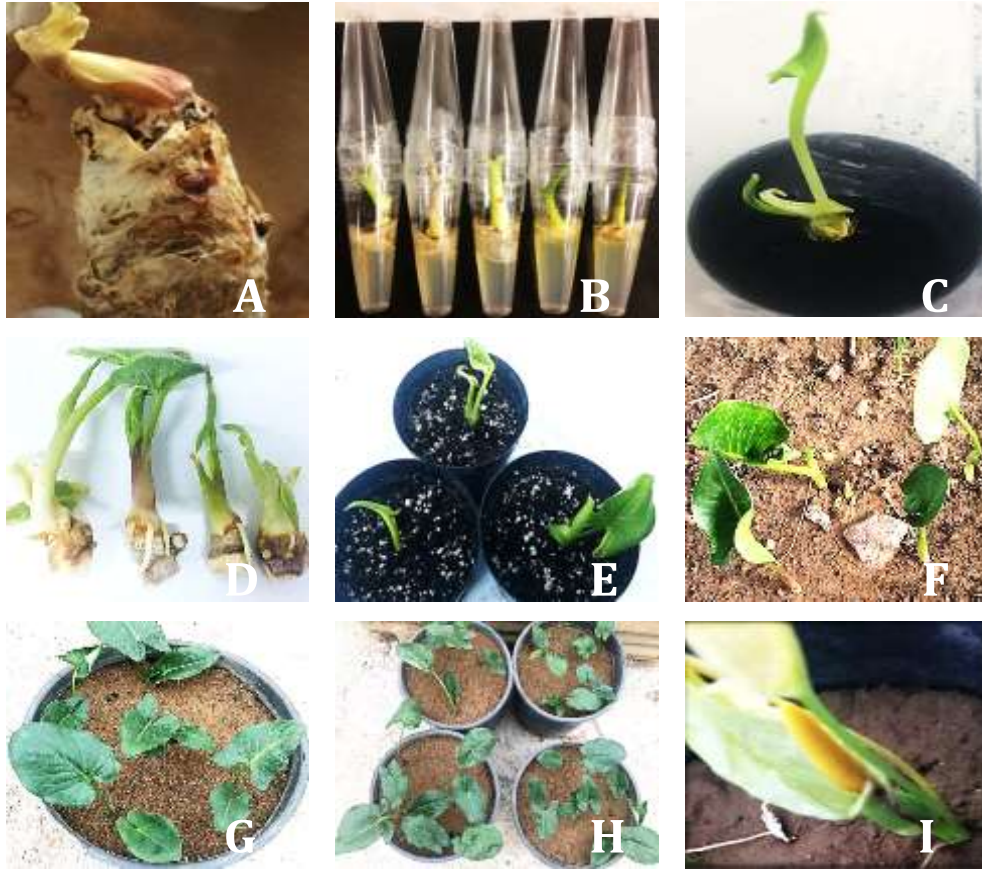
**) Eksplant Başına sürgün sayısı sürgün oluşturmeyen eksplantlarda dikkate alınarak hesaplanmıştır.

***) İstatistikî olarak önemsiz.

3.6. Rejenere olan *Arum italicum* bitkilerini aklimatizasyonu

Gelişen sürgünler steril kabin içerisinde 1 mg l⁻¹ IBA, 0.5 g l⁻¹ aktif karbon içeren ve 6 g l⁻¹ ile katılaştırılan ½ MS (yarı indirgenmiş) besin ortamında köklendirilmeye alınmaya başlanmış kültür başlangıcından 8 hafta sonra bitkiciklerin köklenmeye başladığı görülmüştür. Köklenen ve yaklaşık 15-18 cm boylarına ulaşan bitkicikler kültür kaplarından çıkartılarak köklerdeki agar kalıntıları şebeke suyu altında yıkanmış ve köklere zarar vermeden uzaklaştırılmıştır. Adaptasyon sağlamak amacıyla bitkiler torf-perlit kompozisyonuna transfer edilmiştir. İki hafta sonra gözlenen sonucuna göre 1:1 oranında hazırlanmış olan torf-perlit içeren karışımda canlılığını kayıp etmeden adaptasyonu sağlanmıştır (% 52). Bitkilerin doğal şartlara uyumu ve daha iyi gelişmelerini sağlamak amacıyla 10-15 günde 1 g l⁻¹ (20 N, 20 P, 20 K) yaprak gübresi verilerek daha iyi gelişimleri sağlanmıştır. Ayrıca bitkilerde normal çiçek oluşumları yaklaşık 12 hafta sonra gözlemlenmiştir. Çiçek oluşumu sonrasında ise vejetasyon dönemini tamamlayan bitkilerin köklerinde oluşan yumrular elde edilmiştir. Elde edilen yumruları doku kültürü ile elde edilmemiş bitkileriyle karşılaştırma sonucunda aralada morfolojik açıdan her hangi farklılığı gözlenmemiştir **Şekil 1**.

Bitki büyüme düzenleyicileri *in vitro* kültürde bitki rejenerasyonunu en fazla etkileyen faktörlerin başında gelmekte olup oksin-stokinin dengesi, yüksek oranda bitki rejenerasyonu için şarttır. *In vitro* teknikleri bazı geofit türlerinde, *Fritillaria thunbergii* (Paek ve Murthy 2002), *Lilium candidum* (Baktır ve Özel 2003), *Galanthus ikariae* (Tıpırdamaz ve ark. 1999), *Sternbergia candida* ve *S. fischeriana* (Arslan ve ark. 2002; Mirici ve ark. 2005) *Ornithogalum platyphyllum* (İpek ve ark. 2009), *Muscari azureum* (Uranbey ve ark. 2010), başarıyla kullanılmış olup, *Arecaea* familyasından da bazı türlerde somatik embryogenezis yoluyla bitki rejenerasyonu başarılmış, bazıları ticari olarak üretime alınmıştır (Matsumoto ve Kuehnle 1996; Hamidah ve Debergh 1997; Chen ve Kuehnle 1999; Werbrout ve ark. 2000; Rani ve Raina 2000).



Şekil 1. a. *In vitro* çalışmalarında kullanılan *Arum italicum* yumrularının sürgün ucu, b. *Arum italicum*'un yumrularından izole edilen sürgün ucu eksplantının yapılan yüzey sterilizasyonundan 7-10 gün sonra bakteriyel ve fungal bulaşıksız sağlıklı sürgün gelişimi, c. *Arum italicum* sürgün ucu eksplantlarının farklı bitki büyüme düzenleyicilerini içeren MS ortamında kültür başlangıcından yaklaşık 3-5 hafta sonra sürgün oluşumu, d. ve e. *Arum italicum* gelişkin bitkiciklerde 1 mg l^{-1} IBA, 0.5 g l^{-1} aktif kömür ve $1/2$ MS besin ortamında köklendirilmesi ve iklim dolabında kompost torf içeren küçük saksılarda aklimatizasyonu, f. g. h. ve i. Tarla toprağı içeren saksılara aktarılan bitkilerin aklimatizasyonu sonrası gelişen *Arum italicum* bitkilerden çiçek oluşumu.

Figure 1. a. The shoot tip of *Arum italicum* tubers used in *in vitro* studies, b. After the surface sterilization 7-10 days of the shoot tip explant isolated from the tubers of *Arum italicum*, healthy shoot growth without bacterial and fungal, c. MS medium containing different plant growth regulators of *Arum italicum* shoot tips, shoot formation after 3-5 weeks from culture beginning, d. and e. *Arum italicum* growing plants in 1 mg l^{-1} IBA, 0.5 g l^{-1} activated charcoal and $1/2$ MS medium rooted and acclimatized in small pots containing compost peat, f. g. h. and i. Flower formation from *Arum italicum* plants that developed after acclimatization of plants transferred to pots containing field soil.

4. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada da, özellikle BAP içeren besin ortamlarının diğer sitokininlere (TDZ ve Kinetin) göre daha iyi sonuç verdiği görülmüştür. *Arum italicum* türünde sürgün ucunun mikro çoğaltım ve patojenlerden arı üretim bakımından uygun bir eksplant kaynağı olduğu ve uygun besin ortamı ve kültür koşullarında yüksek oranlarda sürgün rejenerasyonu sağlanabildiği görülmüştür. Üretilen bitkicikler daha sonra köklendirilerek aklimatize edilmiş, yüksek oranda canlı (% 52) bitkiciklerin tarla toprağı içeren saksılarda adaptasyonu sağlanmıştır. *A. palaestinum* ile yapılan farklı bir çalışmada yaprak, gövde, tomurcuklu korm ve diğer korm parçaları farklı besin ortamlarında *in vitro* da kültüre alınmış, benzer olarak hiçbir eksplant tipi kallus oluşturmaz iken, kormların tomurcuk gözlerinde 4 hafta içinde embriyonik kallus oluşumu görülmüş, daha sonra embriyoidler rejenerasyon ortamına aktarılarak embriyolar köklü bitkiciklere dönüştürülmüştür (Shibli ve ark. 2012).

A. palaestinum ile yapılan farklı bir çalışmada ise *in vitro*'da çimlendirilen tohumlardan elde edilen fideden

yaprak, gövde, kök ve korm (yumru) izole edilmiş, çeşitli besin ortamlarında kültüre alınmış, hiç bir eksplant tipinde gelişme olmaz iken, yumru üzerinde gelişmeye başlamış tomurcuklardan gelişen sürgünler elde edilmiş ve 5 mg l^{-1} BAP ve 0.1 mg l^{-1} NAA içeren MS ortamında en yüksek sürgün oluşumu tespit edilmiştir. Ayrıca *in vitro*'da rejenerasyon olan bitkilerle ve normal bitkiler arasında biyokimyasal ve genetik farklılıklar ortaya konmuştur Farid ve ark. (2014). Bu çalışmada da en yüksek sürgün rejenerasyonu sürgün uçlarından sürgün rejenerasyonu (% 35.0) ve en yüksek eksplant başına sürgün sayısı (0.75 adet) 3 mg l^{-1} BAP ve 0.75 mg l^{-1} NAA uygulamasından elde edilmiştir. *Arum italicum* ile hızlı çoğaltım teknikleri ilk kez test edilmiş olup, yüksek frekansta *in vitro* sürgün rejenerasyonu üretimi sağlanmıştır. Buna ek olarak uygun adventif sürgün rejenerasyon metodunun geliştirilmesi bitkilere gen aktarımında önemli faktörlerden biridir. Gelecekte doku kültürleri yolu ile yüksek frekansta adventif sürgün rejenerasyonu ilerideki gen aktarım çalışmalarını kolaylaştıracaktır. Geliştirilen bu yöntemin diğer geofit türleri için de kullanımının önü açılmış olabilecektir.

Teşekkür

Bu araştırma projesi, (*Arum italicum* MILLER türünde *in vitro* mikroçoğaltım çalışmaları) 2016/MF009 proje Kod numaralı Uşak Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimi tarafından desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Adams M, Alther W, Kessler M, Kluge M, Hamburger M (2011) Malaria in the renaissance remedies from European herbals from the 16th and 17th century. *Journal of Ethnopharmacol* 133(2): 278-288.
- Alencar VBM, Alencar MNM, Assreuy AMS, Mota ML, Brito GAC, Aragao KS, Bittencourt FS, Pinto VPT, Debray H, Ribeiro RA, Cavada BS (2005) Proinflammatory effect of *Arum maculatum* lectin and role of resident cells. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 37(9): 1805-1814.
- Alpınar K (1985) Batı Türkiye'de arum türleri ve bu türlerin yumrularının nişasta ve protein miktarları. İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Bilim Dalı, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu Temel Bilimler Araştırma Gurubu: TBAG-558.
- Arslan N, Gürbüz B, Özcan S, Koyuncu M, Gümüşçü A, Mirici S, Parmaksız İ (2002) *Stenbergia candida* ve *Stenbergia fischeriana* Türlerinin Kültüre Alınması ve Çoğaltılması Üzerine Araştırmalar. TUBİTAK projesi. Proje No: Tarp-2182.
- Baktır İ, Uysal S, Özel S (2003) Doku kültürü yöntemi ile miszambak (*Lilium candidum* L.) yetiştiriciliği üzerine bir araştırma. Türkiye IV. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, Antalya.
- Barabé D, Lacroix C, Gibernau M (2003) Development of the flower and inflorescence of *Arum italicum* (Araceae). *Canadian Journal of Botany* 81: 622-632.
- Bonora A, Pancaldi S, Gualandri R, Fasulo MP (2000) Carotenoid and ultrastructure variations in plastids of *Arum italicum* Miller fruit during maturation and ripening. *Journal of Experimental Botany* 51(346): 873-884.
- Boyce PC (1993) The genus *Arum*. Kew, Royal Botanic Gardens.
- Boyce PC (2006) *Arum*-A decade of change. *Aroideana*, 29: 132-137.
- Bryan EJ (2002) *Bulbs* Timber press. Inc.
- Chen F, Kuehnle A (1999) Micropropagation of *Spathiphyllum* cv. Sensation from *in vitro* etiolated internode explants. XVI International Botanical Congress, St Louis MO USA.
- Davis PH (1984) *Grayum* MH, 1990 Linz 2010 Flora of Turkey, Vol 8 and 10. Edinburg.
- Demirci S, Ozhatay N (2012) An ethnobotanical study in Kahramanmaraş (Turkey) wild plants used for medicinal purpose in Andirin, Kahramanmaraş. *Turkish journal of pharmaceutical sciences* 9(1): 75-92.
- Espindola A, Buerki S, Kupfer P, Bedalov M, Alvarez N (2010) New insights into the phylogeny and biogeography of *Arum* L. (Araceae): unravelling its evolutionary history. *Botanical journal of the linnean society* 163: 14-32.
- Everest A, Ozturk E (2005) Focusing on the ethnobotanical uses of plants in Mersin and Adana provinces (Turkey). *Journal of ethnobiology and ethnomedicine* 1: 1-6.
- Farid MM, Hussein SR, Ibrahim LF, El Desouky MA, Elsayed AM, Saker MM (2014) Shoot generation, biochemical, molecular and phytochemical investigation of *Arum palaestinum* Boiss. *African Journal of Biotechnology* 13(34): 3522-3530.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50(1): 151-158.
- Grayum MH (1990) Evolution and phylogenie of the Araceae. *Annals of the Missouri botanical garden* 11: 628-697.
- Gurhan G, Ezer N (2004) Halk arasında hemoroit tedavisinde kullanılan bitkiler. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi 24(1): 37-55.
- Hamidah M, Karim A, Debergh P (1997) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium scherzerianum*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 48: 189-193.
- İpek A, Çöçü S, Uranbey S, Kaya MD, Gürbüz B, Arslan N, Sancak C, Akdoğan G, Özcan S (2009) *In vitro* bulblet production from immature embryos of ornamental plant *Ornithogalum platyphyllum* Boiss. *Research Journal of Biotechnology* 4(4): 25-29.
- Kandemir N (2008) Ordu çevresinde yayılış gösteren *Arum* L. (Araceae) cinsinin bazı türleri üzerinde morfolojik ve anatomik incelemeler. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi* 1(2): 37-43.
- Kozuharova E, Kochmarov V, Kachaunova E, Espindola A, Aleksandrov B, Mincheva I (2014) Distribution of *Arum* (Araceae) in Bulgaria. Version of Record published online 24: 51-62.
- Linz J, Stokl J, Urru I, Krugel T, Stensmyr MC, Hansson BS (2010) Molecular phylogeny of the genus *Arum* (Araceae) inferred from multi-locus sequence data and AFLPs. *Taxon* 59(2): 405-415.
- Lobin W, Neumann M, Bogner J, Boyce PC (2007) A new *Arum* species (Areae, Araceae) from NE Turkey and Georgia. *Willdenowia* 37: 445-449.
- Matsumoto T, Webb D, Kuehnle A (1996) Histology and origin of somatic embryos derived from *Anthurium andraeanum* Linden ex Andre lamina. *Journal of the American Society for Horticultural science* 121: 404-407.
- Mirici S, Parmaksız İ, Özcan S, Sancak C, Uranbey S, Sarıhan EO, Gümüşçü A, Gürbüz B, Arslan N (2005) Large Scale *in vitro* Bulblet Production from Immature Embryos of Endangered *Stenbergia fischeriana*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 80, 239-246.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.
- Paek KY, Murthy HN (2002) High frequency of bulblet regeneration from bulb scale sections of *fritillaria thunbergii*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68: 247-252.
- Polat R, Cakilcioglu U, Satil S (2013) Tradition aluses of medicinal plants in Solhan *Journal of Ethnopharmacology. Journal of Ethnopharmacology* 148: 951-963.
- Prime CT (1960) *Lords and Ladies*. Collins, London, 241.
- Rani V, Raina SN (2000) Genetic fidelity of organized meristemderived micropropagated plants: a critical reappraisal. *In vitro cellular and developmental Biology Plant* 36(5): 319-330.
- Shibli RA, Duwayri MA, Sawwan JS, Mohamad AS, Al-Qudah TS (2012) Regeneration via somatic embryogenesis of the endangered wild arum (*Arum pa-laestinum*). *In vitro cellular and developmental biology plant* 48(3): 335-340.
- Snedecor GW, Cochran WG (1967) *Statistical Methods*. The Iowa State University.
- Tıpırdamaz R, Ellialtıoğlu Ş, Çakırlar H (1999) Kardelenin (*Galanthus ikariae* Baker.) doku kültürü yoluyla çoğaltımı: eksplant tipi, ortam pH'sı ve karbonhidrat kaynağının soğançık oluşumuna etkisi. *Turkish journal of agriculture and forestry* 23(4): 823-830.
- Uranbey S, İpek A, Caliskan M, Dundar E, Çöçü S, Basalma D, Guneylioglu H (2010) *In vitro* bulblet induction from bulb scales of endangered ornamental plant *Muscari Azureum*. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 24(2): 1843-1848.
- Werbrouck S, Eeckhaut T, Debergh P (2000) Induction and conversion of somatic embryogenesis on the anther filament of *Spathiphyllum*. *Acta Horticulturae* 520: 263-269.