



Araştırma Makalesi

Dikenli Kabağın *In Vitro* Rejenerasyonu Üzerine Çalışmalar

İlknur KÜLAHLIOĞLU ÇEĞİL^{1*} Sebahattin ÇÜRÜK¹

Özet

Araştırmada, yaprak eksplantları kullanılarak yapılan rejenerasyon çalışmalarında MS ortamında farklı BA, GA₃ ve NAA konsantrasyonları denenmiştir. BA'nın 1 ve 1.5 mg/L konsantrasyonları (% 100) ile NAA'nın 1 mg/L konsantrasyonu (% 87.50) diğer uygulamalara göre daha yüksek kallus oluşturmuştur. Ancak, oluşan kalluslar karardığı için bitki üretilenmemiştir. Gövde tomurcukları ve sürgün uçlarının kullanıldığı rejenerasyon çalışmalarında ise farklı BA ve GA₃ konsantrasyonları içeren MS ortamları denenmiştir. Bu eksplantlarda en yüksek sürgün oluşturma oranları, 0.5 (% 83.75) veya 0.75 (% 87.50) mg/L BA bulunan MS ortamlarından elde edilmiştir. Köklendirme için 400 mg/L sefotaksim sodyum'lu NAA'sız (% 80.00) veya 0.05 (% 100.00) mg/L NAA içeren MS ortamlarının kullanılmasının uygun olacağı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Rejenerasyon, Chayote, *In vitro*

Studies on *In Vitro* Regeneration of Chayote

Abstract

In this study, using leaf explants, different concentration of BA, GA₃ and NAA in MS medium as regeneration media were examined. Media with 1 mg/L or 1.5 mg/L BA (100 %) and 1 mg/L NAA (87.50 %) concentrations formed more callus than other treatments. However, the shoots were not obtained since the produced callus were darkened. Different BA and GA₃ concentrations was used in MS medium for *in vitro* regeneration from stem buds or shoot tips of chayote. The highest shoot growth medium for stem buds or shoot tips was MS supplemented with 0.5 (83.75 %) mg/L BA or 0.75 (87.50 %), and the best rooting medium was MS containing 400 mg/L cefotaxime sodium and 0.05 mg/L NAA (100.00 %) or without NAA (80.00 %).

Keywords: Regeneration, Chayote, *In vitro*

ORCID ID (Yazar sırasına göre)

0000-0002-1480-3942, 0000-0003-0542-3363

Yayın Kuruluna Geliş Tarihi: 06.11.2019

Kabul Tarihi: 17.12.2019

*Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, HATAY

E-mail: ilknr_ilknr@hotmail.com

Dikenli Kabağın *In Vitro* Rejenerasyonu Üzerine Çalışmalar

Giriş

Halk arasında “dikenli kabak” olarak adlandırılan *Sechium edule* (Jacq.) Swartz, dünyanın farklı ülkelerinde ve yörelerinde; Chayote, Cho-cho, Chuchu, Huisquil, Chayota, Gayota ve Sebze Armut gibi 81 farklı kelime ile isimlendirilmektedir. Bunların arasında en çok kabul gören Chayote kelimesi, kökenini Meksika'nın eski Aztek kelimeleri “chayotli” veya “chayotl” (dikenli)’den almaktadır (Aung ve ark., 1990). Anavatamı Meksika ve Guatemala olmakla birlikte, dikenli kabağın yetiştiriciliği yapılan başlıca bölgeler Brezilya, Kosta Rika, Veracruz, Meksika ve Abhazyadır. Dikenli kabağın kromozom sayısının $2n=2x=28$ olduğu bildirilmekle (Donato ve Cequea (1994) birlikte, $2n=2x=24$ olduğunu belirten raporlar (Sobti ve Singh, 1961) da mevcuttur (Cadena-Iniguez ve ark., 2007).

Dikenli kabağın meyveleri dışında gövdeleri, genç yaprakları ve köklerin yumru şeklindeki kısımları da yiyecek olarak kullanılmaktadır. Bitkinin yenilen kısımlarının lif, protein ve vitamin içeriği diğer sebzelere oranla düşüktür. Meyve ve özellikle tohum, pek çok önemli amino asit (aspartik asit, glutamik asit, alanin, arjinin, sistein, fenilalanin, glisin, histidin, izolösin, lösin, methionin, prolin, serin, tirozin, treonin ve valin) yönünden zengindir (Saade, 1996). Dikenli kabak herhangi bir doymuş yağ içermemekle birlikte, antioksidan özelliğine sahiptir (Ordenez ve ark., 2006). Düşük kalorili olması nedeniyle kolesterol ve kilo kontrolü için diyetisyenler tarafından önerilmektedir. Kardiyovasküler değişimi sağlayan yaprakları, hipertansiyon için bitkisel ilaç olarak kullanılabilir. Meyve ve köklerinin diüretik olduğu kabul edilmekte ve tohumlarının bağırsaklarla ilgili problemlere iyi geldiği belirtilmektedir (Robinson ve Decker-Walters, 1997). Dikenli kabak, iri sulu kökleri bir kaç yılda gelişebilen çok yıllık bir bitkidir. Subtropik iklim bölgelerinde sürgünleri sonbaharda donarak ölür. Fakat kış ayları sert geçmezse, köklerin üst kısmındaki adventif gözlerden ilkbaharda sürgünlerin oluşmasıyla büyüme yeniden başlar (Aung ve ark., 1990; Robinson ve Decker-Walters, 1997).

Dikenli kabak meyvelerinde; irilik, şekil, renk ve dikenlilik bakımından önemli derecede

genetik farklılıklar mevcuttur (Newstrom, 1991; Rubatzky ve Yamaguchi, 1997). Meyve tek tohumlu, etli ve sürgün üzerindeyken bile sürebilir (viviparous). Tohumundan gelişen sürgün, perikarptan beslenir (Aung ve ark., 1990; Robinson ve Decker-Walters, 1997). Kısa gün bitkisi olan dikenli kabağın meyveleri kullanılarak çoğaltılması ile ilgili olarak yapılan çalışmalar incelediğinde, çoğaltma katsayısının düşük olduğu görülmektedir. Bu bitkinin doku kültürü ile çoğaltılması konusunda ise birkaç çalışma mevcuttur. Wang ve ark. (1997), sürgün ucu segmentlerinin 1 mg/L IAA içeren MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortamında % 81.30 oranında köklendiğini ve tomurcuk taşıyan gövde çeliklerinin 0.3 mg/L IAA içeren ½ MS ortamında % 83.30 oranında sürgün oluşturduğunu bildirmişlerdir. Transfer edilen sürgünlerin % 75.00'i bitkiye dönüşmektedir. Abdelnour ve Engelmann (2002a)'ın dikenli kabak bitkisinde yaptığı çalışmada dondurularak muhafaza (kriyoprezervasyon) edilen embriyoların 0.5 mg/L BA içeren ortamda, kültüre alınması sonucu % 10 ila 30 arasında bir gelişmenin olduğunu ve bunların % 17 ila 38'nin hayatta kaldığını ifade etmişlerdir. Yapılan bir çalışmada dikenli kabağın mikro çoğaltımı için büyüme düzenleyicileri gereksinimlerinin çok düşük konsantrasyonda olduğu (0.1 mg/L BA) veya bitki büyüme düzenleyicilerinin bulunmadığı ortamlarda gerçekleştiği bildirilmiştir (Sommaribas ve ark., 1997; Abdelnour ve ark., 2002b; Cadena-Iniguez ve ark., 2007). Sweetly ve ark. (2018), dikenli kabağın boğum eksplantlarını kullandıkları çalışmada, en yüksek sürgün sayısını (4.89 adet/boğum) 0.2 µM IAA ve 0.2 µM BAP içeren MS ortamından elde ettiklerini belirtmişlerdir. Sonuç olarak, çoğaltma materyalinin pahalı olması ve yapılan *in vitro* çalışmalarda başarı oranının düşük olması nedeniyle, *in vitro* çoğaltılmasının geliştirilmesi gerekmektedir.

Materyal ve Yöntem

Doku kültüründe çoğaltma materyali olarak kullanılan dikenli kabak sürgün ve yaprakları, Belen'deki bir ev bahçesinden ve Serinyol pazarından alınan meyvelerin 5 L'lik torf:perlit (2:1) karışımı ile doldurulmuş saksılara dikilmesiyle serada elde edilen bitkilerden

Dikenli Kabağın *In Vitro* Rejenerasyonu Üzerine Çalışmalar

temin edilmiştir. Doku kültürü çalışmalarında, yukarıda belirtildiği gibi üretilen bitkilerden alınan çeliklerin yaprak koltuğunda bulunan tomurcuklar ve sürgün uçları ile gerçek yaprakları veya *in vitro* bitkilerin büyütme odasında yetiştirilmesi ile üretilen bitkilerin gerçek yaprakları eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır.

Yaprak rejenerasyonu çalışmalarında dezenfeksiyon yöntemleri

Yaprak eksplantları kullanılarak yapılan rejenerasyon çalışmalarında, 100 ml'sinde 2 damla Tween 20 bulunan % 0.5 veya % 0.6'lık sodyum hipoklorit çözeltisinde 15 dk manyetik karıştırıcıda çalkalandıktan sonra 3 kez steril saf sudan geçirilmiştir. Eksplantların alanı yaklaşık 0.5 cm² olacak şekilde ayarlanarak MS ortamı içeren Petri kaplarına (9 x 1.5 cm) aktarılmıştır. Söz konusu eksplantlar 25±1°C sıcaklık, 40-50 µmol/m²sn ışık yoğunluğunda (16 saat ışık, 8 saat karanlık) kültüre alınmıştır. Endojenik kontaminasyonların görülmesi halinde sefotaksim sodyum (Sefotak 1gIM/IV) kullanılmıştır.

Sürgün ucu ve tomurcuk rejenerasyonu çalışmalarında dezenfeksiyon yöntemleri

Dikenli kabağın *in vitro* çoğaltımını geliştirmek için uygun bir dezenfeksiyon protokolünün belirlenmesi amacıyla, bitkilerden alınan sürgün ucu veya tomurcuk bulunduran 2-3 gözlü çelikler kullanılmıştır. Çelikler, 100 ml'sinde 2 damla Tween 20 bulunan % 0.5'lik sodyum hipoklorit çözeltisinde 10 veya 15 dk, veya % 0.6'lık sodyum hipoklorit çözeltisinde 15 dk manyetik karıştırıcıda çalkalandıktan sonra 3 kez steril saf sudan geçirilmiştir. Dezenfeksiyonunda etil alkol kullanılması gerektiğinde ise çelikler % 70'lik etil alkol çözeltisinde 5 veya 15 sn tutulmuştur. Ardından 3 kez steril saf sudan geçirilerek 100 ml'sinde 2 damla Tween 20 bulunan % 0.6 veya % 0.75'lik sodyum hipoklorit çözeltisinde 15 dk çalkalandıktan sonra 3 kez steril saf sudan geçirilmiştir. Söz konusu eksplantlar içerisinde MS ortamı bulunan cam tüplere (150 x 25 mm) aktararak yukarıda belirtilen bitki büyütme odası koşullarında kültüre alınmıştır. Endojenik kontaminasyonların görülmesi durumunda 400 mg/L sefotaksim sodyum kullanılmıştır.

Yaprak rejenerasyonu çalışmalarında kullanılan ortamlar

Gerçek yaprakların rejenerasyonunda 30 g/L sakkaroz (Duchefa S0809.1000) ve aksi belirtilmediği takdirde 8 g/L agar (Duchefa P1001.1000) içeren MS ortamında 1) BA'nın 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.75, 1 mg/L ve Sefotaksim sodyumun 0, 400 mg/L kombinasyonları, 2) 0.1, 0.3, 0.5 mg/L BA ve 0, 0.05, 0.1 mg/L GA₃ kombinasyonları ile 3) BA'nın 0, 0.5, 1, 1.5 mg/L ile NAA'nın 0, 0.5, 1, 1.5 mg/L kombinasyonları denenmiştir.

Sürgün ucu ve tomurcuk rejenerasyonu çalışmalarında kullanılan ortamlar

Rejenerasyon çalışmalarında, MS ortamı temel besin ortamı olarak kullanılmıştır. Bitkilerin yaprak koltuğunda bulunan tomurcuklar ve sürgün uçlarının rejenerasyonunda 1) 0, 0.1, 0.3, 0.5 mg/L BA konsantrasyonları, 2) BA'nın 0, 0.5, 0.75, 1 mg/L ve GA₃'ün 0, 0.5 mg/L kombinasyonları, 3) BA'nın 0, 0.5, 0.75, 1 mg/L ve sefotaksim sodyumun 0, 400 mg/L kombinasyonları araştırılmıştır. Sürgün oluşturma ortamında en iyi sonuç veren 0.5 ve 0.75 mg/L BA'nın 0 veya 0.5 mg/L GA₃ ile kombinasyonlarının sürgün oluşturma üzerine etkisini belirlemek için 400 mg/L sefotaksim sodyum içeren MS ortamı kullanılarak bir deneme daha kurulmuştur. Tomurcuk ve sürgün uçlarının rejenerasyonu sonucu oluşan sürgünler, en az 2-3 cm olduğunda köklendirme ortamına (Bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS) alınmıştır. Bu ortamda köklenme yüzdesi düşük olduğundan; 1) 0, 0.1, 0.2 mg/L NAA, 2) 0, 0.5, 1 mg/L NAA, 3) 0, 0.01, 0.05 mg/L NAA ve NAA'sız 400 mg/L sefotaksim sodyum, 4) 0, 0.03, 0.05, 0.07 mg/L NAA içeren MS ortamlarının denendiği 4 farklı deneme kurulmuştur.

Sürgün ucu ve tomurcuk rejenerasyonu ile üretilen bitkilerin aklimatizasyonu, ploidi düzeyinin belirlenmesi ve serada yetiştirilmesi

Alınan tomurcukların *in vitro* kültürü sonucu rejenere olan bitkilerin dış ortama alıştırılması için 1 hafta süreyle kültür kabının kapakları kademeli olarak açılmıştır. Bu şekilde dış koşullara kısmen adapte edilen bitkiler, önce içinde torf:perlit karışımı (2:1) bulunan viyolde veya 0.5 L'lik saksıda fide haline getirilmiştir.

Dikenli Kabağın *In Vitro* Rejenerasyonu Üzerine Çalışmalar

Bu bitkilerin ploidi düzeyi Partec firmasının PI kiti ile Partec protokolü kullanılarak, Flow Sitometri ile belirlenmiştir (Tuna, 2014). Dış koşullara alıştırılan bitkiler, 5 L'lik saksılara aktararak serada büyütülmüştür. Söz konusu bitkiler burada belli bir büyüklüğe ulaştığında, cam serada bulunan ve yukarıda belirtildiği gibi hazırlanan torf:perlit karışımı ile doldurulan 25 L'lik saksılara 30 Kasım 2017 tarihinde dikilerek, 1.90 x 1.25 m aralıklarla yerleştirilmiştir. Bitkilerin sulanması, saksılardaki toprak gözlenerek ihtiyaç halinde damla sulama sistemi ile yapılmıştır. Bitkilere, 4 farklı tarihte suda çözülerek toplam 21:7:28 kg/da N:P₂O₅:K₂O verilmiştir.

Yapılan ölçümler ve izlenen parametreler

Dezenfeksiyon ve rejenerasyon denemeleri kurulduktan 1-2 hafta içinde kontamine olan eksplant oranı (%), 3-4 hafta sonra canlı kalan ve süren eksplant oranı (%) belirlenmiştir. Daha sonra kardeşlendirme ortamında eksplant başına oluşan kardeş sayısı (adet) tespit edilmiştir. Köksüz sürgünler, köklendirme ortamına alındıktan 1 ay sonra kök oluşturan bitki oranı (%), her bitkide kök uzunluğu (cm) ve kök sayıları (adet) belirlenmiştir. Saksılara yapılan dikimden 3 hafta sonra saksıda yaşayan bitki oranı (%) tespit edilmiştir. Her tekerrürde rejenere olan bitkilerin 2-3'ünde ploidi düzeyi Flow Sitometri ile belirlenmiştir. *In vitro* rejenerasyon sonunda üretilen ve serada yukarıda belirtildiği şekilde yetiştirilen bitkiler, bitki morfolojisi, meyve oluşumu ve ploidi seviyesi dikkate alınarak somaklonal varyasyon açısından incelenmiştir.

Verilerin değerlendirilmesi

Denemeler faktöriyel düzende tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuş, denemelerden elde edilen verilere varyans analizi uygulanmıştır. *In vitro* çalışmalarda, sürgün ucu ve tomurcuk rejenerasyonu ile yaprak eksplantı kullanılarak yapılan rejenerasyon çalışmaları 4 tekerrürden oluşmuştur ve her tekerrürde 5-7 eksplant bulundurulmuştur. Sürgün ucu ve tomurcuk rejenerasyonu sonucu oluşan köksüz bitkilerin köklendirme denemeleri 3 tekerrürlü, her tekerrürde 5-6 bitki olacak şekilde kurulmuştur. Elde edilen % verilere açı transformasyonu uygulanmıştır ve eksplant başına düşen bitki gözlemlerinde elde edilen

rakamlar 10'dan küçük olduğundan rakamlara 0.5 eklenerek karekök transformasyonu uygulanmıştır. Bu değerlerin varyans analizinde % 5'te önemli çıkan parametrelerin ortalamaları Tukey (HSD) testine göre karşılaştırılmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Yaprak eksplantı kullanılan rejenerasyon çalışmaları

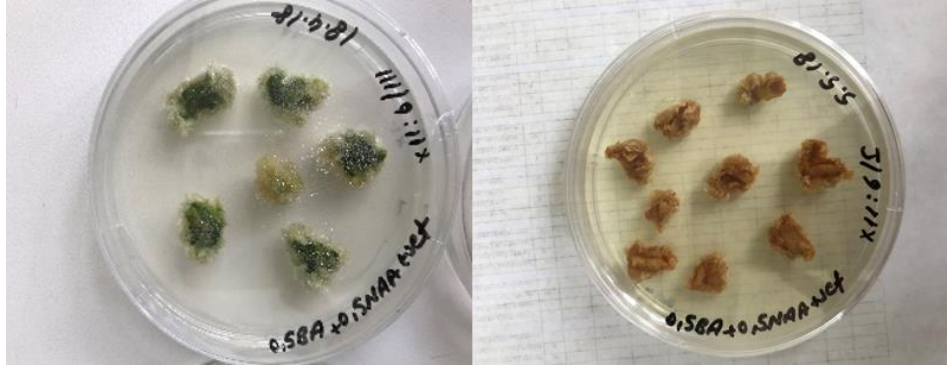
Araştırmanın bu bölümünde, gerçek yapraklar kullanılarak kurulan 1. denemede, % 0.50 sodyum hipoklorit konsantrasyonunun serada yetiştirilen bitki yapraklarına 15 dk uygulanmasının dezenfeksiyonda etkinliği, farklı sefotaksim sodyum ve BA konsantrasyonlarının rejenerasyon üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Bu dezenfeksiyon uygulaması ve ortama 400 mg/L sefotaksim sodyum eklenmesi sonucu ortalama % 10.07 oranında kontaminasyon gerçekleşmiştir (Çizelge 1). Kallus oluşturan eksplant oranı bakımından, denenen faktörlerin ikili interaksiyonları önemli bulunmuştur. En yüksek kallus oluşturan eksplant oranı (% 79.17), sefotaksim sodyum içeren ortamda 0.5 mg/L BA konsantrasyonu uygulanması sonucu oluşmuştur. Sefotaksim sodyumun etkisi değerlendirildiğinde incelenen gözlemlerden kontamine olan eksplant oranına etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Sefotaksim sodyumun uygulanmadığı ortamda kontaminasyon oranının % 5.56'dan % 14.58'e yükseldiği görülmektedir. Böylece denemede sefotaksim sodyumun kontaminasyon oranını azalttığı değerlendirilerek olumlu etki yaratmasının yanında, yapraklarda kararma gibi olumsuz etkisinin olduğu da gözlenmiştir. Özellikle sefotaksim sodyum içeren ortamlarda söz konusu kararmanın daha fazla olduğu değerlendirilmiştir (Şekil 1). Dolayısıyla bu denemede hiçbir uygulamada sürgün meydana gelmemiştir.

Gerçek yaprakların kullanılmasıyla kurulan 2. rejenerasyon denemesinde yaprak eksplantları, % 0.60 sodyum hipoklorit konsantrasyonunda 15 dk süreyle dezenfekte edilmiştir. Bu denemede sodyum hipoklorit konsantrasyonunun % 0.5'ten % 0.6'ya yükseltilmesi sonucu oluşan kontaminasyon oranı (% 0.40) (Çizelge 2), 1. denemeye (% 10.07) (Çizelge 1) göre çok azalmıştır. Ayrıca,

Dikenli Kabağın *In Vitro* Rejenerasyonu Üzerine Çalışmalar

Cruz-Martínez ve ark. (2017) dikenli kabakta bildirdiği gibi yapraklarda çizikler oluşturmak suretiyle rejenerasyon elde edilmeye çalışılmıştır. Bu denemeden elde edilen ortalama değerler Çizelge 2’de sunulmuştur. Denenen faktörlerin, incelenen özellikler üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Bununla birlikte, 0.5 mg/L BA ve 0.05 mg/L GA₃ içeren sürgün oluşturma ortamından gelen bitki yaprak eksplantlarının kallus oluşturma oranının (% 21.43) diğer uygulamalara kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu denemedeki uygulamalarda sadece beyaz kallus oluşumu gerçekleşmiş olup, kallusların kararmasına (Şekil 1) bağlı olarak sürgün elde edilememiştir. Ancak, Cruz-Martínez ve ark. (2013) yaptığı bir çalışmada, dikenli kabak embriyolarının çimlendirilmesi sonucu oluşan *in vitro* bitkilerin gerçek

yapraklarının MS + 0.1 mg/L BA + 0.5 mg/L GA₃ veya MS + 0.1 mg/L BA + 0.1 mg/L GA₃ ortamlarında kültüre alınması sonucu bitki elde ettiklerini bildirmişlerdir. Yine Cruz-Martínez ve ark. (2017) yapmış oldukları benzer çalışma sonunda yaprak eksplantlarında çizikler oluşturarak MS ortamında 0.1 mg/L BA ve 0.05 mg/L GA₃ kombinasyonundan organogenesis ile bitki elde etmişlerdir. Fakat çalışmamızda yapılan gözlemler sonucunda, yaprakların yapılan çiziklerden zarar görmüş olduğu belirlenmiştir. Çiziklerin derin ve yoğun olması nedeniyle, daha önce olumlu sonuç alınmış olmakla birlikte dezenfeksiyon işleminde kullanılan sodyum hipoklorit konsantrasyonu ve süresine (% 0.6, 15 dk) bağlı olarak bu zararın ortaya çıkmış olabileceği değerlendirilmiştir.



Şekil 1. Dikenli kabakta yaprak rejenerasyonu sonucu oluşan beyaz kallus (solda) ve bu kallusların daha sonra kararmasıyla oluşan eksplant görüntüsü (sağda)

Dikenli Kabağın *In Vitro* Rejenerasyonu Üzerine Çalışmalar

Çizelge 1. Dikenli kabak meyvelerinden gelen serada yetiştirilen sürgünlerin gerçek yapraklarına uygulanan farklı BA ve sefotaksim sodyum uygulaması sonucu elde edilen ortalama değerler

BA (mg/L)	Sefotaksim sodyum (mg/L)	Kontamine olan eksplant oranı (%)	Canlı kalan eksplant oranı (%)	Kallus oluşturan eksplant oranı (%)
0	400	16.67	83.33	0.00 ^c
0.1	400	16.67	83.33	0.00 ^c
0.3	400	0.00	100.00	50.00 ^{abc}
0.5	400	0.00	100.00	79.17 ^a
0.75	400	0.00	100.00	58.33 ^{abc}
1	400	0.00	100.00	16.67 ^{abc}
0	0	4.17	95.83	0.00 ^c
0.1	0	8.33	91.67	25.00 ^{abc}
0.3	0	0.00	100.00	41.67 ^{abc}
0.5	0	8.33	91.67	6.25 ^{bc}
0.75	0	62.50	37.5	31.25 ^{abc}
1	0	4.17	95.83	75.00 ^{ab}
Tukey HSD (% 5)		Ö.D	Ö.D	11.04
BA (mg/L)				
	0	10.42 ^{ab}	89.58	0.00 ^b
	0.1	12.50 ^{ab}	87.50	12.50 ^{ab}
	0.3	0.00 ^b	100.00	45.83 ^a
	0.5	4.17 ^b	95.83	42.71 ^a
	0.75	31.25 ^a	68.75	44.79 ^a
	1	2.08 ^b	97.92	45.83 ^a
Tukey HSD (% 5)		21.05	Ö.D	33.21
Sefotaksim sodyum (mg/L)				
	0	14.58 ^a	85.42	29.86
	400	5.56 ^b	94.44	34.03
Tukey HSD (% 5)		8.19	Ö.D	Ö.D

Varyans analizi önemli bulunan uygulamaların aynı sütundaki ortalamaları arasındaki farklılıklar, Tukey testiyle $P \leq 0.05$ 'e göre belirlenmiştir. ÖD: Önemli Değil

Dikenli Kabağın *In Vitro* Rejenerasyonu Üzerine Çalışmalar

Çizelge 2. *In vitro* ortamdan gelen ve bitki büyütme odasında yetiştirilen bitki sürgünlerinin gerçek yapraklarına uygulanan farklı BA ve GA₃ konsantrasyonları sonucu elde edilen ortalama değerler

BA (mg/L)	GA ₃ (mg/L)	Kontamine olan eksplant oranı (%)	Canlı kalan eksplant oranı (%)	Kallus oluşturan eksplant oranı (%)
0.1	0	0.00	100.00	4.17
0.1	0.05	3.57	96.43	0.00
0.1	0.1	0.00	100.00	0.00
0.3	0	0.00	100.00	7.14
0.3	0.05	0.00	100.00	0.00
0.3	0.1	0.00	100.00	0.00
0.5	0	0.00	100.00	4.17
0.5	0.05	0.00	100.00	21.43
0.5	0.1	0.00	100.00	3.57
Tukey HSD (% 5)		Ö.D	Ö.D	Ö.D
BA (mg/L)				
	0.1	1.19	100.00	1.39
	0.3	0.00	100.00	2.38
	0.5	0.00	98.81	9.72
Tukey HSD (% 5)		Ö.D	Ö.D	Ö.D
GA ₃ (mg/L)				
	0	0.00	100.00	5.16
	0.05	1.19	100.00	7.14
	0.1	0.00	100.00	1.19
Tukey HSD (% 5)		Ö.D	Ö.D	Ö.D

Varyans analizi önemli bulunan uygulamaların aynı sütundaki ortalamaları arasındaki farklılıklar, Tukey testiyle $P \leq 0.05$ 'e göre belirlenmiştir. ÖD: Önemli Değil

Meyvelerin dikilmesiyle oluşan ve serada yetiştirilen bitki sürgünlerinin gerçek yapraklarının kullanılmasıyla kurulan 3. rejenerasyon denemesinden elde edilen ortalama değerler Çizelge 3'de verilmiştir. Bu denemede, yüzeysel dezenfeksiyon sırasında kullanılan sodyum hipoklorit konsantrasyonu % 0.6'dan % 0.5'e azaltılarak 15 dk olacak şekilde uygulanmıştır. Ayrıca denenen ortamlara 400 mg/L sefotaksim sodyum eklenmiştir. Bu denemede yaprak eksplantları, çizilmeden MS ortamında BA ve NAA'nın farklı konsantrasyonları kombine edilerek oluşturulan ortamlarda kültüre alınmıştır. 1. rejenerasyon denemesinde uygulanan aynı dezenfeksiyon süresi ve sefotaksim sodyum konsantrasyonu sonucu kontaminasyon oranı % 10.07'den % 6'ya düşürülmüştür. Denemede etkisi araştırılan

faktörlerin ikili interaksiyonlarının, incelenen özelliklerden kallus ve kök oluşturan eksplant oranı bakımından önemli olduğu saptanmıştır (Çizelge 3). Ortama BA ve NAA eklenmediği durumda kallus oluşmadığı belirlenmiştir. Yapılan gözlemler doğrultusunda denenen konsantrasyonlardan 1 mg/L BA içeren MS ortamında çok düşük oranda yeşil kallus oluştuğu gözlenmiştir. Ancak diğer kombinasyonlarda ağırlıklı olarak beyaz kallus elde edilmiş olmakla birlikte, oluşan beyaz ve yeşil kalluslar karardığı için bitki üretilmemiştir. Bununla birlikte, ikili interaksiyonlardan BA bulunmayan 0.5, 1 ve 1.5 mg/L NAA konsantrasyonlarını içeren ortamlarda kök oluşumu gerçekleşmiştir. Ancak eksplantlardan oluşan köklerden sürgün elde edilememiştir.

Dikenli Kabağın *In Vitro* Rejenerasyonu Üzerine Çalışmalar

Çizelge 3. Dikenli kabak meyvelerinden gelen serada yetiştirilen sürgünlerin gerçek yaprakları, 400 mg/L sefotaksim sodyum ve farklı BA ve NAA konsantrasyonu bulunan ortamlarda kültüre alınması sonucu elde edilen ortalama değerler

BA (mg/L)	NAA (mg/L)	Kontamine olan eksplant oranı (%)	Canlı kalan eksplant oranı (%)	Kallus oluşturan eksplant oranı (%)	Kök oluşturan eksplant oranı (%)
0	0	4.17	95.83	0.00 ^d	0.00 ^b
0	0.5	0.00	100.00	4.17 ^d	16.67 ^a
0	1	16.67	83.33	50.00 ^b	20.83 ^a
0	1.5	16.67	83.33	29.17 ^{bc}	16.67 ^a
0.5	0	0.00	100.00	16.67 ^{cd}	0.00 ^b
0.5	0.5	0.00	100.00	91.67 ^a	0.00 ^b
0.5	1	0.00	100.00	100.00 ^a	0.00 ^b
0.5	1.5	8.33	91.67	100.00 ^a	0.00 ^b
1	0	0.00	100.00	100.00 ^a	0.00 ^b
1	0.5	4.17	95.83	100.00 ^a	0.00 ^b
1	1	0.00	100.00	100.00 ^a	0.00 ^b
1	1.5	0.00	100.00	100.00 ^a	0.00 ^b
1.5	0	4.17	95.83	100.00 ^a	0.00 ^b
1.5	0.5	8.33	91.67	100.00 ^a	0.00 ^b
1.5	1	16.67	83.33	100.00 ^a	0.00 ^b
1.5	1.5	16.67	83.33	100.00 ^a	0.00 ^b
Tukey HSD (% 5)		Ö.D	Ö.D	4.19	3.22
BA (mg/L)					
	0	9.38	90.63	20.83 ^c	13.54 ^a
	0.5	2.08	91.67	77.08 ^b	0.00 ^b
	1	1.04	91.67	100.00 ^a	0.00 ^b
	1.5	11.46	95.83	100.00 ^a	0.00 ^b
Tukey HSD (% 5)		Ö.D	Ö.D	7.88	6.05
NAA (mg/L)					
	0	2.08	97.92	54.17 ^c	0.00
	0.5	3.13	96.88	73.96 ^b	4.17
	1	8.33	91.67	87.50 ^a	5.21
	1.5	10.42	89.58	82.29 ^{ab}	4.17
Tukey HSD (% 5)		Ö.D	Ö.D	7.88	Ö.D

Varyans analizi önemli bulunan uygulamaların aynı sütundaki ortalamaları arasındaki farklılıklar, Tukey testiyle $P \leq 0.05$ 'e göre belirlenmiştir. ÖD: Önemli Değil

Sürgün ucu ve tomurcuk rejenerasyonu çalışmaları

Dikenli kabağın *in vitro* çoğaltılmasında kullanılacak sürgün ucu ve tomurcukların dezenfeksiyonu için uygun bir yöntemin belirlenmesi amacıyla yürütülen ilk çalışmadan elde edilen sonuçlar Çizelge 4'de sunulmuştur. Dezenfeksiyon süresinin, incelenen gözlemler üzerine etkisi istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır. Ancak 15 dk uygulanan % 0.5'lik sodyum hipoklorit çözeltisinde

kontamine olan eksplant oranı (% 35), 10 dk'lık uygulama oranına (% 60) göre daha düşük olmuştur. Bununla birlikte 15 dk'lık sodyum hipoklorit uygulamasının, eksplantlarda sürme oranında azalmaya neden olduğu ve kontaminasyonun çoğunlukla endojenik bakterilerden kaynaklandığı değerlendirilmiştir. Bu nedenlerle, sonraki denemelerde dezenfeksiyon protokolünde değişikliğe gidilmiştir.

Dikenli Kabağın *In Vitro* Rejenerasyonu Üzerine Çalışmalar

Birinci dezenfeksiyon protokolü (% 0.5'lik sodyum hipokloritte 15 dk.) uygulanarak sürgün ucu ve tomurcukların rejenerasyonu üzerine BA'nın etkisi incelendiğinde, sürgün oluşturma ortamında sürme oranı ve kardeşlendirme ortamında eksplant başına oluşan kardeş sayısının istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 5). Bununla birlikte elde edilen sürgünler 0.5 mg/L BA içeren kardeşlendirme ortamına alınarak kardeş sayıları belirlenmiştir. En yüksek eksplant başına oluşan kardeş sayısı (3.75 adet), 0.3 mg/L BA uygulamasından gelen eksplantlarda belirlenmiştir. Bu denemde oluşan en yüksek

kardeş sayısı, Sweetly ve ark. (2018)'nin elde ettiği en yüksek kardeş sayısından (4.89 adet/boğum) düşük olmuştur.

Çizelge 4. Dikenli kabakta sürgün ucu ve tomurcuklara MS ortamında uygulanan farklı dezenfeksiyon sürelerinin etkisi

% 0.5'lik sodyum hipokloritte dezenfeksiyon süresi (dk)	Kontamine olan eksplant oranı (%)
15	35.00
10	60.00
Tukey HSD (% 5)	Ö.D

ÖD: Önemli Değil

Çizelge 5. Dikenli kabakta sürgün oluşturma ortamında farklı BA konsantrasyonu içeren MS ortamlarından gelen sürgünlerin 0.5 mg/L BA içeren kardeşlendirme ortamında elde edilen kardeş sayıları

Sürgün oluşturma ortamında BA içeriği (mg/L)	Sürgün oluşturma ortamında kontamin olmayan eksplantlarda sürme oranı (%)	Kardeşlendirme ortamında BA içeriği (mg/L)	Kardeşlendirme ortamında eksplant başına oluşan kardeş sayısı (adet)
0	8.33	0.5	0.00
0.1	25.00	0.5	0.33
0.3	50.00	0.5	3.75
0.5	5.00	0.5	1.00
Tukey HSD (%5)	Ö.D		Ö.D

ÖD: Önemli Değil

Sürgün ucu ve tomurcuk çalışmalarında birinci denemede uygulanan dezenfeksiyon protokolü sonucunda enfeksiyonun yüksek çıkması nedeniyle, kurulan ikinci denemede eksplantlar % 70'lik etil alkolde 15 sn ve ardından % 0.75'lik sodyum hipoklorit çözeltisinde 15 dk bekletilerek yüzeysel dezenfeksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca endojenik bakteri kontaminasyonunu önlemek için ortama 400 mg/L sefotaksim sodyum eklenmiştir. Bu denemede kontamine olan eksplant oranı (ortalama % 3.75), birinci denemede oluşan kontaminasyon oranından (ortalama % 47.5) oldukça düşük olduğundan, dezenfeksiyon protokolünün etkili olduğu görülmektedir. Ancak burada tüm ortamlara sefotaksim sodyum eklendiğinden kontaminasyon oranının düşük çıkması, sefotaksim sodyum kullanımıyla ilişkili olabileceği belirtilebilir. Ayrıca bu denemede oluşan sürgünlerde sararma olduğu görülmüştür. Bunun nedeninin dezenfeksiyon sırasında etil alkol ve sodyum hipoklorit konsantrasyonları ve uygulama

sürelerinden kaynaklanmış olabileceği değerlendirilmiştir. İkinci dezenfeksiyon protokolü uygulanarak kurulan 2. denemede, eksplantların rejenerasyonu için MS temel ortamında BA ve GA₃'ün etkisi incelenmiştir (Çizelge 6). İncelenen özelliklerin tümünde "BA x GA₃" ikili interaksiyonlarının etkisi, istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Ana faktörlerden BA konsantrasyon uygulamasının, canlı kalan eksplant oranına etkisinin önemli olduğu, sürme oranına etkisinin ise önemsiz olduğu belirlenmiştir. Ancak, dikenli kabağın bitkisinde yapılan çalışmada embriyoların 0.5 mg/L BA içeren ortamda kültüre alınması sonucu, sürgün elde edildiği bildirilmiştir (Abdelnour ve Engelmann, 2002a). Çalışmamızda ana faktör olarak GA₃'ün etkisi incelendiğinde ise istatistiksel olarak önemsiz olduğu bulunmuştur.

Dikenli Kabağın *In Vitro* Rejenerasyonu Üzerine Çalışmalar

Çizelge 6. Dikenli kabakta sürgün ucu ve tomurcuklara 400 mg/L sefotaksim sodyum içeren ortamda uygulanan farklı BA ve GA₃ konsantrasyonları sonucu elde edilen ortalama değerler

BA (mg/L)	GA ₃ (mg/L)	Canlı kalan eksplant oranı (%)	Kontamine olmayan eksplantlarda sürme oranı (%)
0	0	80.00	6.25
0.5	0	100.00	20.00
0.75	0	100.00	5.00
1	0	100.00	15.00
0	0.5	90.00	11.25
0.5	0.5	100.00	5.00
0.75	0.5	100.00	30.00
1	0.5	100.00	5.00
Tukey HSD (% 5)		Ö.D	Ö.D
BA (mg/L)			
0		85.00 ^b	8.75
0.5		100.00 ^a	12.50
0.75		100.00 ^a	17.50
1		100.00 ^a	10.00
Tukey HSD (% 5)		9.97	Ö.D
GA ₃ (mg/L)			
0		95.00	11.56
0.5		97.50	12.81
Tukey HSD (% 5)		Ö.D	Ö.D

Varyans analizi önemli bulunan uygulamaların aynı sütundaki ortalamaları arasındaki farklılıklar, Tukey testiyle $P \leq 0.05$ 'e göre belirlenmiştir. ÖD: Önemli Değil

Söz konusu 2. denemede, sürgün ucu ve tomurcuklarına uygulanan BA ve GA₃ kombinasyonlarından elde edilen bitkilerin kardeşlenme durumlarının incelenmesi amacıyla GA₃ içermeyen aynı BA konsantrasyonuna sahip MS ortamlarına aktararak, eksplant başına oluşan kardeş sayıları belirlenmiştir (Çizelge 7). Elde edilen sonuçlara göre farklı BA ve GA₃ kombinasyonlarından gelen eksplantlarda, eksplant başına meydana gelen kardeş sayısının istatistiksel olarak önemli olmadığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, 0.75 veya 1 mg/L BA içeren sürgün oluşturma ortamından gelen eksplantların yine aynı BA konsantrasyonuna alınması sonucu, diğer uygulamalara kıyasla daha yüksek kardeş sayısı olduğu belirlenmiştir. Bu denemede oluşan en yüksek kardeş sayısı (1.65 adet/eksplant), Sweetly ve ark. (2018)'nin elde ettiği kardeş sayısından

(4.89 adet/boğum) daha düşük olmuştur. İki deneme arasındaki farklılık, kullanılan genotipten ve/veya bitki büyüme düzenleyici kombinasyonunun farklılığından kaynaklanmış olabilir.

Çizelge 7. Dikenli kabakta sürgün oluşturma ortamında farklı BA ve GA₃ kombinasyonu ve 400 mg/L sefotaksim sodyum içeren MS ortamlarından gelen sürgünlerin, aynı konsantrasyon sefotaksim sodyumla birlikte farklı BA içeren kardeşlendirme ortamlarında elde edilen kardeş sayıları

Sürgün oluşturma ortamında BA ve GA ₃ içeriği	Kardeşlendirme ortamında BA içeriği (mg/L)	Eksplant başına oluşan kardeş sayısı (adet)
0	0	0.12
0.5 mg/L BA	0.5	1.10
0.75 mg/L BA	0.75	1.60
1 mg/L BA	1	1.65
0.5 mg/L GA ₃	0	0.00
0.5 mg/L BA + 0.5 mg/L GA ₃	0.5	0.10
0.75 mg/L BA + 0.5 mg/L GA ₃	0.75	1.50
1 mg/L BA + 0.5 mg/L GA ₃	1	0.45
Tukey HSD (% 5)		Ö.D

ÖD: Önemli Değil

Kurulan 2. denemede bitkilerin sararmasından dolayı, dezenfeksiyon sırasında uygulanacak % 70'lik etil alkolün uygulama süresi ve sodyum hipoklorit oranının azaltılması gerektiği değerlendirilmiştir. Buna uygun olarak kurulan 3. denemede eksplantlar, % 70 etil alkolde 5 sn ve % 0.60 sodyum hipoklorit çözeltisinde 15 dk bekletilmiştir. Ayrıca ortamlara 0 veya 400 mg/L sefotaksim sodyum eklenmiştir. Bu denemede sefotaksim sodyumun etkisi incelenmiştir ve MS temel besi ortamında BA'nın farklı konsantrasyonları denenmiştir. Uygulamadan elde edilen değerler Çizelge 8'de verilmiştir. Sefotaksim sodyumun, incelenen tüm özellikler üzerine etkisi istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur. Ortama sefotaksim sodyum eklenmediğinde eksplantların % 51.25'i kontamine olmuştur. Sefotaksim sodyum uygulaması sonucu ise kontamine olan eksplant oranı % 12.50'ye düşmüş ve süren eksplant oranı % 6.25'ten % 31.25'e yükselmiştir. *In vivo* ortamda yetiştirilen dikenli kabağın bitkilerinin

Dikenli Kabağın *In Vitro* Rejenerasyonu Üzerine Çalışmalar

dezenfeksiyonunda, endojenik bakteri kontaminasyonlarının makul düzeye indirilmesi için bu denemede uygulanan dezenfeksiyon protokolüne ek olarak, özellikle rejenerasyon besi ortamlarına 400 mg/L sefotaksim sodyum eklenmesinin uygun olacağı belirlenmiştir. Ayrıca, eksplant başına oluşan kardeş sayısı bakımından “sefotaksim sodyum x BA”

interaksiyonunun istatistiksel açıdan önemli olduğu belirlenmiştir (Çizelge 8). Burada 400 mg/L sefotaksim sodyum uygulaması ile BA'nın 0.5 veya 0.75 mg/L konsantrasyonları uygulandığında en yüksek kardeş sayısı (sırasıyla 1.45, 1.15 adet/eksplant) elde edilmiştir.

Çizelge 8. Dikenli kabakta sürgün ucu ve tomurcuklara, sürgün oluşturma ortamında uygulanan farklı BA ve sefotaksim sodyum konsantrasyonlarının kontaminasyon, sürme ve kardeşlenme üzerine etkisi

Sefotaksim sodyum (mg/L)	BA (mg/L)	Kontamine olan eksplant oranı (%)	Canlı kalan eksplant oranı (%)	Kontamine olmayan eksplantlarda sürme oranı (%)	Eksplant başına oluşan kardeş sayısı (adet)
0	0	30.00	70.00	0.00	0.00 ^b
0	0.5	75.00	25.00	25.00	0.00 ^b
0	0.75	60.00	40.00	0.00	0.00 ^b
0	1	40.00	60.00	0.00	0.00 ^b
400	0	0.00	100.00	15.00	0.10 ^{ab}
400	0.5	25.00	75.00	50.00	1.45 ^a
400	0.75	0.00	100.00	40.00	1.15 ^a
400	1	25.00	75.00	20.00	0.10 ^{ab}
Tukey HSD (% 5)		Ö.D	Ö.D	Ö.D	0.12
BA (mg/L)					
	0	15.00	85.00	7.50	0.05
	0.5	50.00	50.00	37.50	0.73
	0.75	30.00	70.00	20.00	0.58
	1	32.50	67.50	10.00	0.05
Tukey HSD (% 5)		Ö.D	Ö.D	Ö.D	Ö.D
Sefotaksim sodyum (mg/L)					
	0	51.25 ^a	48.75 ^b	6.25 ^b	0.00 ^b
	400	12.50 ^b	87.50 ^a	31.25 ^a	0.70 ^a
Tukey HSD (% 5)		20.94	20.94	14.95	0.17

Varyans analizi önemli bulunan uygulamaların aynı sütundaki ortalamaları arasındaki farklılıklar, Tukey testiyle $P \leq 0.05$ 'e göre belirlenmiştir. ÖD: Önemli Değil

Sürgün ucu ve tomurcuk eksplantlarının kullanıldığı son denemede en uygun dezenfeksiyon yöntemiyle, en başarılı BA konsantrasyonları ve GA₃ kombine edilerek rejenerasyon denemesi tekrar edilmiştir. Bu amaçla, serada yetiştirilen bitkilerin sürgün ucu ve yaprak koltuklarından alınan tomurcuk eksplantları, % 0.60 sodyum hipoklorit konsantrasyonunda 15 dk bekletilerek yüzeysel dezenfeksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Ve kullanılan besi ortamlarına 400 mg/L sefotaksim sodyum” eklenmiştir. Uygulanan dezenfeksiyon yöntemi ve ortamlara 400 mg/L sefotaksim sodyum eklenmesiyle

kontaminasyonun % 0.0 ila 5.0 arasında değiştiği saptanmıştır (Çizelge 9). Bu denemede uygulanan BA ve GA₃'ün, kallus oluşturan eksplant oranı hariç incelenen özellikler üzerine istatistiksel olarak etkili olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 9). Ayrıca, 0.5 mg/L GA₃ içeren ortamlara kıyasla GA₃'ün eklenmediği ortamlarda daha yüksek oranda (% 48.75) kallus oluştuğu tespit edilmiştir. Buradan elde edilen sonuca göre GA₃ uygulanan bitkilerde kallus oluşumunun daha az oranda (% 20.00) gerçekleştiği saptanmıştır. Yapılan gözlemler neticesinde bu ortamlarda 2 hafta kalan eksplantlarda GA₃'den dolayı sararma

Dikenli Kabağın *In Vitro* Rejenerasyonu Üzerine Çalışmalar

görüldüğünden (Şekil 2), eksplantlar yalnızca BA içeren ortamlara alınmıştır. Söz konusu eksplantlar (kısa sürgünler), bu ortamlarda

kültüre alındıktan sonra sararmasının azaldığı tespit edilmiştir.

Çizelge 9. Dikenli kabakta sürgün ucu ve tomurcuklara 400 mg/L sefotaksim sodyum içeren sürgün oluşturma ortamında uygulanan farklı BA ve GA₃ uygulaması sonucu elde edilen değerler

BA (mg/L)	GA ₃ (mg/L)	Kontamine olan eksplant oranı (%)	Canlı kalan eksplant oranı (%)	Kontamine olmayan eksplantlarda sürme oranı (%)	Kallus oluşturan eksplant oranı (%)
0.5	0	5.00	95.00	82.50	37.50
0.75	0	0.00	100.00	85.00	60.00
0.5	0.5	0.00	100.00	85.00	15.00
0.75	0.5	0.00	100.00	90.00	25.00
Tukey HSD (% 5)		Ö.D	Ö.D	Ö.D	Ö.D
BA (mg/L)					
0.5		2.50	97.50	83.75	26.25
0.75		0.00	100.00	87.50	42.50
Tukey HSD (% 5)		Ö.D	Ö.D	Ö.D	Ö.D
GA ₃ (mg/L)					
0		2.50	97.50	83.75	48.75 ^a
0.5		0.00	100.00	87.50	20.00 ^b
Tukey HSD (% 5)		Ö.D	Ö.D	Ö.D	13.25

Varyans analizi önemli bulunan uygulamaların aynı sütundaki ortalamaları arasındaki farklılıklar, Tukey testiyle $P \leq 0.05$ 'e göre belirlenmiştir. ÖD: Önemli Değil



Şekil 2. GA₃'den gelen sararmış bitki (solda) ve GA₃ eklenmeyen 0.75 mg/L BA içeren MS ortamında gelişen yeşil sürgün (sağda)

Sürgün ucu ve gövde tomurcukları kullanılarak kurulan 1., 2. ve 3. denemelerden elde edilen sürgünlerle birinci köklendirme denemesi kurulmuştur. Bu denemede, MS ortamında NAA'nın farklı konsantrasyonları denenmiştir. Kurulan köklendirme denemesinde kullanılan bitkiler, 0.5 mg/L BA içeren sürgün oluşturma ortamından gelen bitkilerdir. Denenen NAA konsantrasyonlarının, incelenen özelliklerden sadece kök uzunluğu üzerine olan etkisi istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur (Çizelge 10). Denenen NAA konsantrasyonlarından 0.2 mg/L konsantrasyonunda oluşan kökler,

kontrole göre daha uzun olmuştur. Kallus oluşturan bitki oranı özellikleri bakımından, 0.1 mg/L NAA içeren ortam ile 0.2 mg/L NAA'lı ortam arasındaki fark istatistiksel olarak önemli olmasa da, 0.1 mg/L NAA bulunan ortamda daha yüksek ortalama değerler elde edilmiştir. Elde edilen *in vitro* fidelerin dış koşullara aktarılması sırasında bitkilerin çok azı dış koşullara alışmış ve bitkiye dönüşmüştür. Ancak, oluşan rejenerantların nemli torbalara aktarılması ve kademeli olarak nemin azaltılması sonucu dış koşullara aklima olan bitkilerin oranı yükselmiş ve bazı uygulamalarda ortalama % 58.33'e yükselmiştir

Dikenli Kabağın *In Vitro* Rejenerasyonu Üzerine Çalışmalar

(Çizelge 10). Bu şekilde üretilen bitkilerde yapılan ploidi analizi sonucunda, rejenerantlar arasında ploidi açısından varyasyon

belirlenmemiş olup, üretilen bitkilerin diploid olduğu saptanmıştır.

Çizelge 10. Dikenli kabakta 0.5 mg/L BA içeren sürgün oluşturma ortamından gelen sürgünlerin 400 mg/L sefotaksim sodyum ve farklı NAA konsantrasyonu bulunan ortamlarda kültüre alınması ve oluşan bitkilerin saksıya aktarılması sonucu elde edilen ortalama değerler

NAA (mg/L)	Canlı kalan eksplant oranı (%)	Kallus oluşturan bitki oranı (%)	Kök oluşturan bitki oranı (%)	Ortalama kök uzunluğu (cm)	Ortalama kök sayısı (adet)	Saksıya aktarılan bitki oranı (%)	Saksıda tutan bitki oranı (%)	Poliploid bitki oranı (%)
0	100.00	36.67	36.67	7.88 ^b	2.53	63.33	58.33	0.00
0.1	93.33	71.11	71.11	9.86 ^{ba}	2.62	87.78	56.67	0.00
0.2	100.00	36.67	36.67	12.80 ^a	3.28	83.33	45.00	0.00
Tukey HSD (% 5)	Ö.D	Ö.D	Ö.D	3.92	Ö.D	Ö.D	Ö.D	Ö.D

Varyans analizi önemli bulunan uygulamaların aynı sütündeki ortalamaları arasındaki farklılıklar, Tukey testiyle $P \leq 0.05$ 'e göre belirlenmiştir. ÖD: Önemli Değil

Daha önce kurulan 2. ve 3. sürgün ucu ve tomurcuk denemelerindeki 0.75 mg/L BA içeren sürgün oluşturma ortamından gelen sürgünler, ikinci köklendirme denemesinde kullanılmıştır. Çizelge 11'den anlaşılacağı gibi denenen farklı NAA konsantrasyonlarının saksıya aktarılan bitki oranı ve saksıda tutan bitki oranı hariç diğer gözlemler üzerine etkisi

istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. En yüksek saksıya aktarılan bitki oranı (% 86.67) ve saksıda tutan bitki oranı (% 51.11) NAA'nın uygulanmadığı ortamda gerçekleşmiştir. Bu sonuçlar, uygulanan NAA konsantrasyonlarının köklenme üzerine etkili olmadığını göstermektedir.

Çizelge 11. Dikenli kabakta 0.75 mg/L BA içeren sürgün oluşturma ortamından gelen sürgünlerin 400 mg/L sefotaksim sodyum ve farklı NAA konsantrasyonu bulunan ortamlarda kültüre alınması ve oluşan bitkilerin saksıya aktarılması sonucu elde edilen ortalama değerler

NAA (mg/L)	Canlı kalan eksplant oranı (%)	Kallus oluşturan bitki oran (%)	Kök oluşturan bitki oran (%)	Ortalama kök uzunluğu (cm)	Ortalama kök sayısı (adet)	Saksıya aktarılan bitki oranı (%)	Saksıda tutan bitki oranı (%)	Poliploid bitki oranı (%)
0	100.00	73.33	66.67	9.77	2.00	86.67 ^a	51.11 ^a	0.00
0.5	100.00	33.33	33.33	9.56	2.11	33.33 ^b	0.00 ^b	0.00
1	100.00	38.89	45.56	8.42	1.67	75.56 ^{ab}	16.67 ^{ab}	0.00
Tukey HSD (% 5)	Ö.D	Ö.D	Ö.D	Ö.D	Ö.D	37.19	41.53	Ö.D

Varyans analizi önemli bulunan uygulamaların aynı sütündeki ortalamaları arasındaki farklılıklar, Tukey testiyle $P \leq 0.05$ 'e göre belirlenmiştir. ÖD: Önemli Değil

Bitkilerin köklendirilmesi için NAA'nın farklı konsantrasyonlarının denendiği 3. çalışmada; 1., 2. ve 3. sürgün ucu ve tomurcuk rejenerasyon denemelerinin 0.5 mg/L BA sürgün oluşturma uygulamasından gelen köksüz sürgünler kullanılmıştır. Bu denemede NAA'nın dozları, 2. köklendirme denemesine göre azaltılmıştır

(Çizelge 12). Ayrıca denemede MS temel besin ortamının kontrol olarak kullanıldığı ortamlardan birine sadece sefotaksim sodyum eklenmemiştir. Burada amaç, sefotaksim sodyumun köklenme üzerine olan etkisini gözlemlenmektedir. MS temel ortamı ile sadece sefotaksim sodyum eklenen temel MS ortamı

Dikenli Kabağın *In Vitro* Rejenerasyonu Üzerine Çalışmalar

arasında, istatistiksel açıdan önemli fark olmamakla birlikte; kök oluşturan bitki oranı, ortalama kök uzunluğu ve kök sayısı, saksıya aktarılan bitki oranı ve saksıda tutan bitki oranı bakımından ortama sefotaksim sodyum eklemenin olumlu etkileri görülmektedir. İncelenen özelliklerden kallus oluşturan ve kök oluşturan bitki oranı açısından, NAA/sefotaksim sodyum uygulamasının istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur (Çizelge 12). Denemeye alınan NAA dozlarının, incelenen diğer gözlemler üzerine etkisinin olmadığı görülmektedir. Kallus oluşturan bitki oranı (% 86.67), 0.01 veya 0.05 mg/L NAA içeren sefotaksim sodyumlu uygulamalarda daha yüksek olmuştur. En yüksek kök oluşturan bitki oranı (% 100) sefotaksim sodyum ve 0.05 mg/L NAA bulunan ortamdan elde edilmiştir (Çizelge 12). Köklenen bitki oranı, Wang ve ark. (1997)'nin dikenli kabakta bildirdiği köklendirme oranından daha yüksektir. Flow Sitometri analizi sonucu, çalışmamızdan elde edilen

rejenerantların hepsi diploid olarak belirlenmiştir. *In vitro* rejenerasyon sonunda üretilen ve serada yetiştirilen bitkiler, bitki morfolojisi, meyve oluşumu ve ploidi seviyesi dikkate alınarak, rejenere olan bitkilerde somaklonal varyasyon meydana gelmediği değerlendirilebilir. Sürgün ucu ve tomurcuk eksplantlarının kullanıldığı son rejenerasyon denemesinde oluşan köksüz bitkicikler kullanılarak 4. köklendirme denemesi kurulmuştur. Denemede 0.75 mg/L BA ile 0.75 mg/L BA ve 0.5 mg/L GA₃ içeren ortamdan gelen eksplantlar kullanılmıştır. Denemeden elde edilen ortalama veriler Çizelge 13'de verilmiştir. İncelenen özelliklerden kallus oluşturan bitki oranı gözlemlerinde en yüksek değer, 0.07 mg/L NAA konsantrasyonundan elde edilmiştir. Bu köklendirme ortamında bitkilerin % 100'ü kallus, % 53'ü kök oluşturmuştur. Bu denemede oluşan köklendirme oranı, 3. denemeden elde edilen orandan düşük olmuştur.

Çizelge 12. Dikenli kabakta 0.5 mg/L BA içeren sürgün oluşturma ortamından gelen sürgünlerin farklı NAA/sefotaksim sodyum konsantrasyonu bulunan ortamlarda kültüre alınması ve oluşan bitkilerin saksıya aktarılması sonucu elde edilen ortalama değerler

NAA/sefotaksim sodyum (mg/L)	Canlı kalan eksplant oranı (%)	Kallus oluşturan bitki oranı (%)	Kök oluşturan bitki oranı (%)	Ortalama kök uzunluğu (cm)	Ortalama kök sayısı (adet)	Saksıya aktarılan bitki oranı (%)	Saksıda tutan bitki oranı (%)	Poliploid bitki oranı (%)
0.0/0.0	100.00	0.00 ^b	73.33 ^{ab}	5.30	1.83	20.00	33.33	0.00
0.0/400	100.00	0.00 ^b	80.00 ^{ab}	11.84	3.25	66.67	38.89	0.00
0.01/400	100.00	86.67 ^a	46.67 ^b	8.78	1.83	40.00	25.00	0.00
0.05/400	100.00	86.67 ^a	100.00 ^a	3.72	3.00	20.00	33.33	0.00
Tukey HSD (% 5)	Ö.D	25.30	27.38	Ö.D	Ö.D	Ö.D	Ö.D	Ö.D

Varyans analizi önemli bulunan uygulamaların aynı sütundaki ortalamaları arasındaki farklılıklar, Tukey testiyle $P \leq 0.05$ 'e göre belirlenmiştir. ÖD: Önemli Değil

Çizelge 13. Dikenli kabakta 0.75 mg/L BA ile 0.75 mg/L BA ve 0.5 mg/L GA₃ içeren sürgün oluşturma ortamından gelen sürgünlerin 400 mg/L sefotaksim sodyum ve farklı NAA konsantrasyonu bulunan ortamlarda kültüre alınması ve oluşan bitkilerin saksıya aktarılması sonucu elde edilen ortalama değerler

NAA (mg/L)	Canlı kalan eksplant oranı (%)	Kallus oluşturan bitki oranı (%)	Kök oluşturan bitki oranı (%)
0	100.00	0.00 ^c	8.33
0.03	100.00	58.33 ^b	25.00
0.05	100.00	75.00 ^b	25.00
0.07	100.00	100.00 ^a	53.33
Tukey HSD (% 5)	Ö.D	11.32	Ö.D

Varyans analizi önemli bulunan uygulamaların aynı sütundaki ortalamaları arasındaki farklılıklar, Tukey testiyle $P \leq 0.05$ 'e göre belirlenmiştir. ÖD: Önemli Değil

Dikenli Kabağın *In Vitro* Rejenerasyonu Üzerine Çalışmalar

Sonuç

Yaprak eksplantlarının yüzeysel dezenfeksiyonu için eksplantların % 0.5 veya 0.60 sodyum hipoklorit çözeltisinde 15 dk bekletilmesinin uygun olacağı belirlenmiştir. Sefotaksim sodyum uygulamasının yaprak eksplantlarına zarar verdiği gözlemlendiğinden sefotaksim sodyum içermeyen ortamda, *in vitro* koşullarda büyütülen bitkilerin yaprakları kullanılarak denemenin kurulmasının daha uygun olduğu belirtilebilir.

Sürgün ucu ve tomurcuk eksplantlarının yüzeysel dezenfeksiyonu için denenen farklı konsantrasyon ve süreler arasında, Eksplantların % 70 etil alkolde 5 sn ve ardından % 0.60 sodyum hipokloritte 15 dk bekletmenin yeterli olacağı belirlenmiştir. Ancak bitkilerde endojenik bakteri infeksiyonu tespit edildiğinden, doku kültürü ortamlarına 400 mg/L sefotaksim sodyum eklenerek söz konusu bakteri gelişimi baskı altına alınabilir. Dikenli kabak meyvelerinin sürmesiyle oluşan ve *in vitro* sonucu elde edilen bitkilerin gerçek yaprak eksplantlarıyla kurulan rejenerasyon çalışmalarında, denenen ortamlarda sürgün rejenerasyonu gerçekleşmemiştir. Dikenli kabak yapraklarının hassas olmasından dolayı denemeye alınan bu konsantrasyonlarda değişikliğe gidilerek çalışmaların devam ettirilmesi gerektiği belirtilebilir. Sürgün ucu ve tomurcuk rejenerasyonu çalışmalarında denenen ortamlar arasında, sefotaksim sodyum uygulamalarıyla birlikte en uygun sürgün oluşturma ortamlarının 0.5 mg/L BA veya 0.75 mg/L BA içeren MS ortamları olduğu sonucuna varılmıştır. Sürgün ucu ve tomurcuk eksplantlarının rejenerasyonu sonucu süren ve kardeşlenen köksüz bitkileri köklendirmek amacıyla kurulan denemelerde, köklenmeyle ilgili gözlemler genel olarak değerlendirildiğinde; köklenme ortamı olarak 0.05 mg/L NAA ve 400 mg/L sefotaksim sodyum içeren MS veya sadece 400 mg/L sefotaksim sodyum eklenen MS ortamlarının kullanılması gerektiği belirlenmiştir. Araştırmada elde edilen bitkilerde yapılan Flow Sitometri analizine göre üretilen bütün rejenerantların diploid olduğu tespit edilmiştir. Ploidi açısından varyasyon meydana gelmemiştir. Bu sonuç, tomurcuk ve sürgün ucu

eksplantlarının dikenli kabakta çoğaltma amaçlı kullanılabileceğini ortaya koymaktadır.

Teşekkür

Çalışmamıza desteğinden dolayı MKÜ BAP birimine (Proje No: 16484), ayrıca Flow Sitometri analizinde yardımcı olan Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi, Tarımsal Genetik Mühendisliği Bölümü öğretim üyeleri Prof. Dr. Mehmet Emin ÇALIŞKAN ve Doç. Dr. Ahmet Latif TEK'e teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Abdelnour, A., Engelmann, F. (2002a) Cryopreservation of Chayote (*Sechium edule* Jacq. sw.) zygotic embryos and shoot-tips from *in vitro* plantlets. CryoLetters 23:281-282, c/o Royal Veterinary College, London NW1 0TU, UK.
- Abdelnour, A., Ramirez, C., Engelmann, F. (2002b) Micropropagación de chayote (*Sechium edule* Jacq. SW.) a partir de brotes vegetativos. Agron. Mesoam. 13(2): 147-151.
- Aung, L. H., Ball, A., Kushad, M. (1990) Developmental and nutritional aspects of chayote (*Sechium edule*, Cucurbitaceae) Econ. Bot. 44 (2):157-164.
- Cruz-Martínez, V. O., Castellanos-Hernández, O. A., Acevedo-Hernández, G. J., Rodríguez-Sahagún, A. (2013) Evaluation of different methods for *in vitro* plant regeneration of *Sechium edule*. XV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. 23-28 Junio, 2013 Cancún, México.
- Cruz-Martínez, V., Castellanos-Hernández, O. A., Acevedo-Hernández, G. J., Torres-Morán, M. I., Gutiérrez-Lomelí, M., Ruvalcaba-Ruiz, D., Zurita, F., Rodríguez-Sahagún, A. (2017) Genetic fidelity assessment in plants of *Sechium edule* regenerated via organogenesis. S. Afr. J. Bot. 112:118-122.
- Donato, M. D. and Cequea, H. (1994) A Cytogenetic study of six cultivars of the

Dikenli Kabağın *In Vitro* Rejenerasyonu Üzerine Çalışmalar

- Chayote, *Sechium edule* Sw. (*Cucurbitaceae*). J. Hered. 85 (3).
- Cadena-Iniguez, J., Arevalo-Galarza, L., Avendano-Arrazate, C. H., Soto-Hernandez, M., Ruiz-Posadas, L. D., Santiago-Osorio, E., Acosta-Ramos, M., Cisneros-Solano, V. M., Aguirre-Medina, J. F., Ochoa-Martinez, D. (2007) Production, genetic, postharvest management and pharmacological characteristics of *Sechium edule* (Jacq.) Sw. Fresh Produce 1 (1):41-53.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plan. 15:473-497.
- Newstrom, L. E. (1991) Evidence for the origin of Chayote, *Sechium edule* (*Cucurbitaceae*). Econ. Bot. 45 (3):410-428.
- Ordóñez, A., Gómez, J. D., Vattuone, M. A., Isla, M. I. (2006) Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts. Food Chemistry 97:452-458.
- Robinson, R.W. and Decker-Walters, D.S., (1997) Cucurbits. CAB International, Wallingford, U.K. pp:266.
- Rubatzky, V. E. and Yamaguchi, M. (1997) World vegetables (principles, production and values, second edition). International Thomson Publishing, New York, USA. pp: 842.
- Saade, R. L. (1996) Chayote, *Sechium edule* (Jacq.) Sw. promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 8. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetics Resources Institute, Rome, Italy.
- Sobti, S. N. and Singh, S.D. (1961) A chromosome survey of Indian medicinal plants. Part I. Proc. Indian Acad. Sci. 54:138-144.
- Sommaribas, G., Sandoval, J., Muller, L. (1997) Propagación vegetativa *in vitro* de Chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.) fase de establecimiento. Turrialba, 41:538-544.
- Sweetly, S., Vijaya Rani Asha, R., Ramesh Babu, N. G. (2018) Shoot reclamation of chayote from nodes through micropropagation. World. J. Pharm. Pharm. Sci. 7 (10):1104-1112.
- Tuna, M., Flow sitometri ve tarımsal araştırmalarda kullanımı. II. Flow Sitometri ve Tarımsal Araştırmalarda Kullanımı Eđitim Programı notları, 16-17 Ocak 2014, Tekirdađ.
- Wang, X., Li, B., Wang, G. (1997) Regeneration of plants from hypocotyl of *Sechium edule* Swartz. Cucurbit Genet. Coop. Rep. 20: 65.