

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**PAMUK (*Gossypium hirsutum* L.) ANTERLERİNDEN
IN VITRO KOŞULLARDA KALLUS ve EMBRİYO
REJENERASYONLARININ SAĞLANMASI**

Begüm AKYOL

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Aynur GÜREL

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 612.01.00

Sunuş Tarihi : 20.01.2015

Bornova-İZMİR

2015

Begüm Akyol tarafından **Yüksek Lisans** tezi olarak sunulan “**Pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) Anterlerinden In Vitro Koşullarda Kallus ve Embriyo Rejenerasyonlarının Sağlanması**” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 20.01.2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı

:

.....

Raportör Üye

:

.....

Üye

:

.....

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi / Doktora Tezi olarak sunduğum “**Pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) Anterlerinden *In Vitro* Koşullarda Kallus Ve Embriyo Rejenerasyonlarının Sağlanması**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

20 / 01/ 2015

İmzası

Adı-Soyadı

Begüm AKYOL

ÖZET**PAMUK (*Gossypium hirsutum* L.) ANTERLERİNDEN *IN VITRO*
KOŞULLARDA KALLUS VE EMBRİYO
REJENERASYONLARININ SAĞLANMASI**

AKYOL, Begüm

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Aynur GÜREL

Ocak 2015, 122 sayfa

Bu tezde *Gossypium hirsutum* L. türüne ait 2 farklı çeşitte (Özbek-100 ve Nazilli-143) haploit bitki elde etmek üzere gerçekleştirilen anter kültürlerinde 3 gün süreyle soğuk ön uygulamanın (+4°C’de) ve kültür koşullarının (fotoperiyot ve karanlık) kallus rejenerasyonu ve embriyogenez üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Çalışma kapsamında Özbek-100 ve Nazilli-143 pamuk çeşitlerine ait uygun dönemde mikrosporları bulunduran anterlerin farklı besin ortamlarında ve kültür koşullarında gelişimleri incelenmiş, 1 mg/L BA ve 1 mg/L NAA içeren MS besin ortamında en yüksek kallus ve embriyo rejenerasyonları belirlenmiştir. Özbek-100 çeşidinde karanlık kültür koşulunda (%95) fotoperiyot kültür koşuluna (%75) göre daha yüksek oranda kallus rejenerasyonu gözlenirken, ön uygulamanın %100 oranında kallus rejenerasyonu sağladığı belirlenmiştir. Nazilli-143 çeşidinde ise ön uygulamanın kallus rejenerasyonu üzerinde etkisi bulunmazken, karanlık koşulda %100 kallus rejenerasyonu gerçekleşmiştir. Embriyo rejenerasyonları açısından ise Özbek-100 çeşidinde ön uygulamanın gerçekleştirilmesi rejenerasyon oranını %24’ten %48’e yükseltirken, kültür koşullarının rejenerasyon üzerinde olumsuz etkisinin olduğu belirlenmiştir. Karanlık kültür koşulunda %31,67 oranında embriyo rejenerasyonu gerçekleşirken, fotoperiyot koşullarında embriyo gözlenmemiştir. Nazilli-143 çeşidinde ise ön uygulama embriyo rejenerasyonu üzerinde hiçbir etki göstermezken, sadece fotoperiyot koşulunda %25,33 oranında embriyo rejenerasyonu elde edilmiştir.

Elde edilen bu bilgiler ile pamuk bitkisinde *in vitro* koşullarda anter kùltürü ile ilgili şimdiye kadar gerçekleştirilen çalışmalara gùre daha hızlı ve daha başarılı olarak kallus ve embriyo rejenerasyonunu sağlayan yeni bir protokol geliştirilmiştir.

Anahtar sözcükler: Pamuk, *Gossypium hirsutum* L., *In Vitro*, Anter Kùltürü, Haploit

ABSTRACT**CALLUS AND EMBRYO REGENERATION THROUGH
ANTHER CULTURE AT *IN VITRO* CONDITION COTTON
(*Gossypium hirsutum* L.)**

AKYOL, Begüm

MSc in Bioengineer

Supervisor: Prof. Dr. Aynur GÜREL

January 2015, 122 pages

In this thesis, investigated effect of cold pre-treatment (+4⁰C) and culture conditions (photoperiod and dark) at anther cultures established in order to haploid plants on callus regeneration and embryogenesis at two different cultivars in *Gossypium hirsutum* L. (cultivar “Özbek-100” and “Nazilli-143”).

Within the scope of this thesis, callus and embryo regenerations of anthers belong to cotton cultivar Özbek-100 and Nazilli-143 which including microspore at suitable period investigated at different medium and different culture condition, determined maximum callus and embryo regeneration at MS medium with 1 mg/L BA and 1 mg/L NAA. Callus regeneration ratio at Özbek-100 cultivar, higher at dark condition (95%) than photoperiyod condition (75%) and 100% callus regeneration can be seen with applied of pre-treatment. At Nazilli-143 cultivar, callus regeneration 100% occur at dark condition when pre-treatment was ineffective,. From the point of embryo regeneration examined, while pre-treatment increase regeneration ratio from 24% to 48%, culture conditions shown negative effect on regeneration ratio for Özbek-100 cultivar. While embryo regeneration as 31,67% occurred at dark condition, any embryo seen at photoperiod condition. For Nazilli-143 cultivar, embryo regeneration can be seen at just photoperiod condition and pre-treatment is found ineffective.

With this finding which obtained from this research we improved a new protocol for anther culture *in vitro* conditions in cotton plant providing faster and having high ratio of callus and embryo regeneration.

Keywords: Cotton, *Gossypium hirsutum* L., *In Vitro*, Anther Culture, Haploid

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sırasında bana yol gösterici olan sayın danışmanım Prof. Dr. Aynur GÜREL'e, benden desteğini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Meltem BAYRAKTAR'a, Nazilli'den İzmir'e materyal teminini sağlayan Yüksek Ziraat Mühendisi Mehmet ÇOBAN'a, bana her zaman yardımcı olan laboratuvar arkadaşlarım Münire EKMEKÇİGİL, Berk ÜNAL ve Canan YILAN'a, manevi desteği ile yanımda olan Esra İLHAN, Arzu YILDIRIM ve Pınar NARTOP'a ve canım aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca çalışmamızın yürütülmesini destekleyen Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'ne (TAGEM-2013-1014 no'lu proje) ve Ege Üniversitesi İdari ve Mali İşler Daire Başkanlığı, Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü'ne (BAP-13MÜH005 no'lu proje) katkılarından dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT	x
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxv
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	4
2.1. Pamuk (<i>Gossypium hirsutum</i> L.) Hakkında Genel Bilgiler.....	4
2.1.2. Taksonomi	4
2.1.3. Ticari Kullanımlar	8
2.2. Morfolojik Özellikleri.....	10
2.3. Pamukta Çiçeklenme Aşamaları.....	13
2.4. Üreme Özellikleri	15
2.4.1. Polen	15
2.4.2. Tozlaşma.....	16

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.4.3. Döllenme.....	16
2.4.4. Meyve Gelişimi.....	16
2.5. Pamuk Biyokimyası	17
2.6. Üretim Şekilleri.....	18
2.6.1 Tarımsal Üretim	17
2.6.2. Doku Kültürü	20
2.6.2.1. Somatik Embriyogenez.....	21
2.7. Haploit Bitki Eldesi Teknikleri	22
2.7.1. Androgenesis Hakkında Temel Bilgi	26
2.7.2. Haploit Bitkilerde Kromozom Katlanması	39
2.7.3. Ploidi Belirleme	41
2.8. Pamuk Bitkisinde Gerçekleştirilen Çeşitli Doku Kültürü Uygulamaları...	43
2.8.1. Anter Kültürü Uygulamaları	43
2.8.2. Diğer Teknikler	47
3. MATERYAL METOT.....	55
3.1. Materyal	55

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.2. Metot.....	55
3.2.1. Uygun Tomurcuk Boyutunun Belirlenmesi	55
3.2.2. Anterlerin Kültüre Alınacağı Besin Ortamlarının Hazırlanması.....	56
3.2.3. Tomurcukların Sterilizasyonu	58
3.2.4. Anterlerin Kültüre Alınması	59
3.2.5. Gözlem Parametreleri	61
3.2.6. Kallusların Altkültüre Alınması	61
3.2.7.Sıvı Kültür Denemelerinin Kurulması.....	62
3.2.8. Verilerin Değerlendirilmesi	63
4. BULGULAR	64
4.1. Uygun Tomurcuk Boyutunun Belirlenmesi	64
4.2. Sterilizasyon Başarısının Belirlenmesi	64
4.3. Kallus Rejenerasyon Oranlarının Karşılaştırılması	64
4.3.1. Özbek-100 Çeşidinde Ön Uygulamanın Kallus Rejenerasyonu Üzerine Etkileri.....	67

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.3.2. Özbek-100 Çeşidinde Kültür Koşullarının Kallus Rejenerasyonu Üzerine Etkileri.....	70
4.3.3. Nazilli-143 Çeşidinde Kültür Koşullarının Kallus Rejenerasyonu Üzerine Etkileri.....	72
4.3.4. İki Çeşidin Farklı Besin Ortamları ve Ön Uygulamanın Yapılması Durumunda Kallus Oluşturan Anter Sayılarının Karşılaştırılması.....	75
4.4. Kararma Oranlarının Karşılaştırılması.....	79
4.4.1. Özbek-100 Çeşidinde Ön Uygulama Yapılmasının Kararma Üzerine Etkileri.....	80
4.4.2. Özbek-100 Çeşidinde Kültür Koşullarının Kararma Üzerine Etkileri.....	82
4.4.3. Nazilli-143 Çeşidinde Kültür Koşullarının Kararma Üzerine Etkileri	85
4.4.4. İki Çeşidin Farklı Besin Ortamları ve Ön Uygulamanın Yapılması Durumunda Kararan Anter Sayılarının Karşılaştırılması.....	87
4.5. Embriyo Oluşum Oranlarının Karşılaştırılması	91
4.5.1. Özbek-100 Çeşidinde Ön Uygulama Yapılmasının Embriyo Oluşumu Üzerine Etkileri.....	92
4.5.2. Özbek-100 Çeşidinde Kültür Koşullarının Embriyo Oluşumu Üzerine Etkileri.....	94
4.5.3. Nazilli-143 Çeşidinde Kültür Koşullarının Embriyo Oluşumu Üzerine Etkileri.....	96

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.6. Kallusların Alt Kültüre Alınması	98
4.7. Sıvı Kültür Denemeleri.....	99
5. TARTIŞMA	101
6. SONUÇ.....	107
7. ÖNERİLER	109
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	111
ÖZGEÇMİŞ.....	122

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Dünyada pamuk üretimi dağılım grafiği.....	6
2.2. Türkiye’de pamuk üretiminin yoğun olarak gerçekleştiği bölgeler ve üretimde sahip oldukları yüzde oranları.....	7
2.3. (a) Yaprakları dökülmüş pamuk bitkisi dalları 3/8 ardışık filotaksi özelliği gösterir. Her bir dal, gövde etrafında bir önceki dala göre 3/8’lik dönme gösterir. Dallar ana gövde üzerindeki aksilerden gelişim gösterir.	11
2.3. (b) Meyve veren dallarda nodlardan çiçeklenme zamanını genel özellikleri ile gösteren diagram.....	11
2.4. <i>G. hirsutum</i> çiçek yapısı.....	13
2.5. Pamuk Çiçek Gelişimi.	15
2.6. Pamuk çiçeğinin gelişim aşamaları.....	16
2.7. Haploit bitki üretim teknikleri.....	23
2.8. Büyüme ve morfogenez için gerekli oksin-sitokinin göreceli konsantrasyonları	37
3.1. Pamuk tomurcuğunun yan kesit görüntüsü.....	60
4.1. Ezme preparatlardan elde edilen mikroskop görüntüleri.	64
4.2. Kültüre alınan anterlerden kallusların gelişim aşamaları.....	65
4.3. Kallusların renklerine göre gruplandırılması.	66

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.4. Kallus renklerinin yüzde dağılım grafiği.....	67
4.5. Farklı kallus yapılarında görülen kırmızılıkları.....	67
4.6. Ön uygulanması ve uygulanmagöre fotoperiyotta farklı besin ortamlarında kallus oluşturan anter yüzdesi (%)	69
4.7. Özbek-100 çeşidinde ön uygulama durumuna göre elde edilen kalluslar.	70
4.8. Özbek-100 çeşidinde fotoperiyot ve karanlık kültür koşullarında farklı besin ortamlarında kallus oluşturan anter yüzdesi (%).....	72
4.9. Özbek-100 çeşidinde farklı kültür koşullarında kültüre alınan anterler	72
4.10. Nazilli-143 çeşidinde farklı kompozisyonlardaki besin ortamlarında kültür koşullarına göre kallus rejenerasyonu gerçekleşen anter yüzdesi (%)... 74	
4.11. Fotoperiyot ve karanlık koşullarda Nazilli-143 çeşidinin anterlerinden gelişen kalluslar	75
4.12. Ön uygulama durumuna göre farklı kompozisyonlardaki besin ortamlarına göre kallus rejenerasyonu gerçekleşen anter yüzdesi (%).....	78
4.13. Özbek-100 ve Nazilli-143 çeşitlerinde ön uygulamalı ve ön uygulamasız kültürlerde gelişen kalluslar	79
4.14. Kararan gösteren anterler.....	80
4.15. Özbek-100 çeşidinde ön uygulama durumuna göre farklı besin ortamı kompozisyonlarında kararma gösteren anter sayısı yüzdesi (%).....	82

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.16. Özbek-100 çeşidinde farklı besin ortamı kompozisyonlarında kültüre alınan fotoperiyot ve karanlık kültür koşullarında gözlenen kararan anter yüzdeleri (%).....	84
4.17. Nazilli-143 çeşidinde farklı besin ortamı kompozisyonlarında kültüre alınan anterlerde fotoperiyot ve karanlık kültür koşullarında gözlenen kararan anter yüzdeleri (%).....	87
4.18. Ön uygulama durumuna göre farklı kompozisyonlardaki besin ortamlarına göre kararan anter yüzdesi (%).....	90
4.19. Nazilli-143 ve Özbek-100 çeşitlerinde gelişen koyu renkli kallus yığınlarında farklı kültür koşulları ve çeşitlerde elde edilen embriyolar	91
4.20. Nazilli-143 ve Özbek-100 çeşidinde gözlenen açık renkli kalluslardan gelişen embriyolar.....	92
4.21. Ön uygulama durumuna göre farklı kompozisyonlardaki besin ortamlarında elde edilen embriyo sayılarının yüzdeleri (%).....	94
4.22. Özbek-10 çeşidinde farklı kompozisyonlardaki besin ortamlarındaki anterlerin fotoperiyot ve karanlık koşullarda kültürü alınmaları sonucu oluşan embriyo yüzdeleri (%).....	96
4.23. Nazilli-143 çeşidinde farklı besin ortamlarındaki anterlerin fotoperiyot ve karanlık koşullarda kültürü alınmaları sonucu oluşan embriyo sayılarının karşılaştırılması	97
4.24. Nazilli-143 çeşidinde PKB5 besin ortamında kallusların gelişimleri sırasında besin ortamında ve kalluslarda gözlenen renk değişimleri	99

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.25. Sıvı kültür denemeleri sonucunda elde edilen embriyolar.....	99
4.26. Sıvı kültürlerdeki renk değişimleri.....	100

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. MS besin ortamı bileşenleri	57
3.2. Anter kültürlerinin kurulduğu besin ortamları	58
3.3. Sıvı kültürlerde kullanılan besin ortamı kompozisyonları	62
4.1. Kallus renklerinin yüzde dağılımları.....	66
4.2. Özbek-100 çeşidinde ön uygulamaya göre anterlerin farklı kompozisyonlarda besin ortamlarında kültüre alınmasından 60 gün sonra gelişen kallus yüzdeleri (adet).....	68
4.3. Özbek-100 çeşidinde ön uygulamaya göre anterlerin farklı kompozisyonlarda besin ortamlarında kültüre alınması sonucunda kallus rejenerasyonu görülen anter yüzdeleriyle ilgili varyans analiz sonuçları	69
4.4 Özbek-100 çeşidinde farklı kompozisyonlarda besin ortamlarında kültüre alınmasından 60 gün sonra fotoperiyot ve karanlık kültür koşullarında kallus rejenerasyonu görülen anter yüzdesi (%)	71
4.5. Özbek-100 çeşidine ait anterlerin, karanlık ve fotoperiyot koşullarında farklı besin ortamlarında kültüre alınması sonucunda kallus rejenerasyonu görülen anter yüzdeleriyle ilgili varyans analiz sonuçları	71
4.6. Nazilli-143 çeşidine ait anterlerin farklı besin ortamlarında kültüre alınmasından 60 gün sonra fotoperiyot ve karanlık kültür koşullarında kallus gelişimi görülen anter yüzdesi (%)	73

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

Çizelge

Sayfa

4.7. Nazilli-143 çeşidine ait anterlerin, karanlık ve fotoperiyot koşullarında farklı kompozisyonlarda besin ortamlarında kültüre alınması sonucunda kallus rejenerasyonu görülen anter yüzdesiyle ilgili varyans analiz sonuçları....	74
4.8. Nazilli-143 ve Özbek-100 çeşitlerine ait anterlerin ön uygulama durumuna göre farklı besin ortamlarında kültüre alınmaları sonucunda kallus rejenerasyonu görülen anter yüzdesi (%)	77
4.9. Nazilli-143 ve Özbek-100 çeşitlerine ait anterlerin ön uygulama gerçekleştirilen ve gerçekleştirilmeyen anterlerin farklı besin ortamlarında kültüre alınmaları sonucunda kallus rejenerasyonu görülen anter yüzdeleri ile ilgili varyans analizi sonucu	78
4.10. Özbek-100 çeşidinde ön uygulama durumlarına göre anterlerin farklı kompozisyonlarda besin ortamlarında kültüre alınmasından 60 gün sonra gözlenen kararın anter yüzdeleri (%).....	81
4.11. Özbek-100 çeşidinde ön uygulamaya maruz bırakılan ve bırakılmayan anterlerin farklı kompozisyonlarda besin ortamlarında kültüre alınmasından sonra kararma gösteren anter yüzdeleri ile ilgili varyans analizi sonucu	81
4.12. Özbek-100 çeşidinde anterlerin farklı kompozisyonlarda besin ortamlarında fotoperiyot ve karanlık kültür koşullarında kültüre alınmasından 60 gün sonra gözlenen kararın anter sayıları (%)	83
4.13. Özbek-100 çeşidine ait anterlerin farklı kompozisyonlardaki besin ortamlarında fotoperiyot ve karanlık koşullarda kültüre alınmasından sonra kararma gösteren anter sayıları ilgili varyans analizi sonucu.....	84

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

Çizelge

Sayfa

- 4.14. Nazilli-143 çeşidinde anterlerin farklı kompozisyonlarda besin ortamlarında fotoperiyot ve karanlık kültür koşullarında kültüre alınmasından 60 gün sonra gözlenen kararan anter yüzdesi (%) 86
- 4.15. Nazilli-143 çeşidine ait anterlerin farklı kompozisyonlardaki besin ortamlarında aydınlık ve karanlık koşullarda kültüre alınmasından sonra kararma görülen anter sayıları ile ilgili verilerin varyans analizi sonucu 86
- 4.16. Nazilli-143 ve Özbek-100 çeşitlerine ait anterlerin ön uygulama gerçekleştirilen ve gerçekleştirilmeyen anterlerin farklı besin ortamlarında kültüre alınmaları sonucunda kararma görülen anter yüzdeleri (%)..... 89
- 4.17. Nazilli-143 ve Özbek-100 çeşitlerine ait anterlerin ön uygulama gerçekleştirilmesi durumunda farklı besin ortamlarında anterlerin kültüre alınmaları sonucunda kararma gözlenen anter yüzdeleri ile ilgili varyans analizi sonucu..... 90
- 4.18. Özbek-100 çeşidinde ön uygulama gerçekleştirilmesi durumuna göre anterlerin farklı besin ortamlarında fotoperiyot koşullarında kültüre alınmasından 60 gün sonra gözlenen embriyo yüzdeleri (adet)..... 93
- 4.19. Özbek-100 çeşidine ait ön uygulama durumuna göre anterlerin farklı besin ortamlarında kültüre alınmaları sonucunda gelişen embriyo yüzdeleri ile ilgili varyans analizi sonucu..... 94
- 4.20. Özbek-100 çeşidine ait anterlerin farklı besin ortamlarında fotoperiyot ve karanlık koşullarında kültüre alınmasından 60 gün sonra gözlenen embriyo sayısı (%)..... 95

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

Çizelge

Sayfa

4.21. Özbek-100 çeşidine ait anterlerin farklı besin ortamlarında fotoperiyot ve karanlık koşullarda kültüre alınmaları sonucunda gelişen embriyo yüzdeleri ile ilgili varyans analizi sonucu	96
4.22. Nazilli-143 çeşidine ait anterlerin farklı besin ortamlarında fotoperiyot ve karanlık kültür koşullarında kültüre alınmasından 60 gün sonra elde edilen embriyo yüzdesi (%).....	97
4.23. Nazilli-143 çeşidine ait ön anterlerin farklı besin ortamlarında fotoperiyot ve karanlık koşullarda kültüre alınmaları sonucunda gelişen embriyo sayıları ile ilgili varyans analizi sonucu	98

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
μ	Mikron
M	Mol
N	Normalite
g/l	gram/litre
mg/l	miligram/litre
ml	mili-litre
$^{\circ}\text{C}$	Santigrad derece
<u>Kısaltmalar</u>	
MS	Murashige & Skoog (1962)
NAA	Naftelen Asetik Asit
BA	Benzil Amino Purin
IAA	İndol Asetik Asit
2iP	2-izopenten Adenin
2,4-D	2,4–Dichlorofenoksi Asetik Asit

1. GİRİŞ

Dünya üzerinde yaklaşık 70 ülkede üretimi yapılan ve ekonomik öneme sahip bir lif bitkisi olan pamuk (*Gossypium hirsutum* L.), tohumlarındaki yağ ve protein içerikleri nedeniyle, değerli bir yağ bitkisi ve hayvan beslenmesinde yaygın olarak kullanılan bir besin kaynağıdır. Lifi ile tekstil, çiğiti ile yağ sanayine hammadde sağlamakta, küspesi ile yem sanayi ve hayvancılığa katkı yapmakta, tarım ve endüstride çalışanlara istihdam yaratmakta, pamuğa dayalı tekstil ürünlerinin ihracatı ile döviz geliri sağlamaktadır. Tüm bu özellikleri pamuğu katkı değeri yüksek önemli bir stratejik ürün haline getirmektedir. Giyim ve tekstil endüstrisi Türkiye ekonomisinde önemli bir kısmı oluşturmaktadır. Türkiye Birleşmiş Milletler ülkeleri içerisinde Çin'in ardından ikinci büyük giyim ve tekstil ülkesi olmasının yanı sıra, dünyanın sekizinci tekstil ithalatçısıdır. Türkiye'de 2013 yılında önemli pamuk üretim alanı 330,000 hektar ve üretim miktarı 2,2 milyon balya olarak belirlenirken, 2014 yılında bu değerlerin 420,000 hektarda 2,8 milyon balyalık üretim olarak belirtildiği bildirilmiştir. 2013 yılında iç pazarda pamuk tüketimi 6,3 milyon balya olarak tespit edilmişken, bu değer 2014 yılında 6,4 milyon balyaya yükselmiştir (Sırtıoğlu, 2014).

Uzun yıllardır sürdürülen klasik ıslah yöntemleri ile pamukta verim ve verim özelliklerini geliştirmek için çalışmalar yapılarak birçok pamuk çeşidi geliştirilmiştir. Günümüzde yaygın olarak tarımı yapılan çeşitler, klasik ıslah yöntemleri ile geliştirilen çeşitlerdir. Ancak klasik ıslah yöntemlerinde sağlanan genetik iyileştirmeler; kullanılan varyasyonların daralma eğiliminde olması, uzun zaman alması ve yüksek maliyetler gibi faktörler nedeni ile kısıtlanmaktadır.

Geleneksel ıslah metotları ile her ne kadar önemli başarılar elde edilmişse de, bu yöntemler ile bir çeşit geliştirmek için 8 – 10 yıl kadar bir süre gerekmede, zaman kaybı ile birlikte yüksek maliyetler ortaya çıkmaktadır. Ayrıca bu teknikte dar bir gen havuzu mevcuttur. Bu darboğazların aşılması bitki biyoteknolojisinin katkılarıyla mümkün olabilecektir (Zhang et al., 2000). Özellikle pamuk biyoteknolojisi, yüksek lif kalitesi ve veriminin arttırılmasında günümüzde etkin şekilde kullanılmaktadır (Pathi and Tuteja, 2013).

Bitki hücre ve doku kültürü teknikleri kullanılarak; ender rastlanılan belirli bitki genotiplerinin veya ticari öneme sahip bitki türlerinin kısa sürede klonal çoğaltımları, hastalıksız materyallerin üretilmesi, ekonomik değeri yüksek olan bazı bitkisel sekonder metabolitlerin elde edilmesi, bitkilere yeni özelliklerin aktarılması gibi çeşitli avantajlar sağlanabilmektedir. Ayrıca, bitki hücre ve doku kültürü teknikleri ile çok sayıda rejenerantın elde edilmesi durumunda, özellikle biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı dayanıklı veya tolerant bireylerin seleksiyonları *in vitro* koşullarda oldukça kolaylaşmaktadır (Babaoğlu vd., 2002).

Anter kültürü, haploit bitki üretimi için en etkili yöntemlerdendir (Slama Ayed et al., 2010) ve haploit bitkilerden kromozom katlanması yolu ile kararlı ve genetik olarak homozigot diploit bitkiler elde edilebilmektedir. Bu teknik, seleksiyon ıslah programı süresinin etkili bir şekilde kısaltılmasında kullanılmaktadır. Haploit bitkilerin elde edilmesinde temel yaklaşım, bu bitkilerin kromozom setlerinin iki katına çıkartılması ve %100 homozigot saf hatların hızla geliştirilmesidir (Ellialtıoğlu vd., 2002). Çeşitli yöntemler uygulanarak, haploitlerin kromozom sayısı iki katına çıkartılmakta ve homozigot hatlar elde edilebilmektedir. Bu hatlara, elde ediliş yöntemlerinden dolayı “doubled haploitler” adı verilmektedir (Emiroğlu, 1982). Doubled haploit bitkiler, bitki kalıtımının teorik olarak araştırılmasında olduğu kadar, pamuk mikrosporlarının farklılaşmasının ve somatik embriyo oluşum mekanizmasının çalışılmasında da önemlidirler (Zhu et al., 2011).

Dihaploit tekniği gerek kalitatif, gerekse kantitatif özelliklere göre yapılan seleksiyonu kolaylaştırmaktadır. Seleksiyon homozigot hatlara dayandığından kantitatif özelliklerin fiksasyonunun sağlanması, hatları çevrenin seleksiyon baskısına maruz bırakmadan homozigotluğa ulaşılması, istenilen genlerin birikimine yol açan tekrarlamalı seleksiyon gibi ıslah prosedürlerini kolaylaştırması, üstün melezlerin belirlenmesi, kendine uyumsuz alleller gibi gerçekleştirilmesi zor genler için homozigotluğun elde edilmesi bu konudaki diğer önemli avantajlar olarak sayılabilir. Haploidinin ıslahtaki etkin kullanımı için; birçok genotipin gametlerinden çok miktarda haploitlerin üretilmesi, kromozom katlanmasının başarılı olması ve iyi agronomik performanslı doubled haploitlerin elde edilmesi gereklidir (Gürel vd., 1992).

Bu tez kapsamında, Özbek-100 ve Nazilli-143 pamuk çeşitlerine ait uygun dönemde mikrosporları bulunduran anterlerin farklı besin ortamlarında *in vitro* koşullarda kültüre alınması sonucunda kallus ve embriyo rejenerasyonlarının sağlanarak, üstün verim ve lif kalitesine sahip %100 homozigot bitkilerin eldesi için kullanılabilinecek protokollerin oluşturulması amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. PAMUK (*Gossypium hirsutum* L.) HAKKINDA GENEL BİLGİLER

Pamuk bitkisi, yaygın ve zorunlu kullanım alanıyla insanlık açısından, yarattığı katma değer ve istihdam olanaklarıyla da üretici ülkeler açısından büyük ekonomik öneme sahip bir üründür. Pamuk, işlenmesi açısından çırçır sanayisinin, lifi ile tekstil sanayisinin, çekirdeği ile yağ ve yem sanayisinin, linteri ile de kağıt sanayisinin hammadde durumundadır. Petrole alternatif olarak pamuğun çekirdeğinden elde edilen yağ, giderek artan miktarda biyodizel üretiminde de hammadde olarak kullanılmaktadır. Bunların yanında nüfus artışı ve yaşam standardının yükselmesi, pamuk bitkisine olan talebi de artırmaktadır. Bu yönleriyle pamuğa olan ihtiyaç, tüm dünyada artış göstermekte ve geçtiğimiz dönemde hissedilen ekonomik kriz sebebiyle azalan üretim ve tüketim değerlerinin önümüzdeki dönemde artacağı beklenmektedir. Dünyada az sayıda ülke ekolojisinin pamuk tarımına elverişli olması nedeniyle, dünya rekoltesinin (tarımda bir yılda toplanan ürünlerin tümü) %80'ine yakını Türkiye'nin de içinde bulunduğu bir grup ülke tarafından üretilmektedir. Uluslararası Pamuk Danışma Kurulu'nun 2006–2013 arası 8 yıllık döneme ait verileri incelendiğinde; dünyada ortalama 33 milyon hektar alanda pamuk ekimi yapıldığı ve bu ekimden ortalama 25 milyon ton lif pamuk elde edildiği görülmektedir (KGM, 2013).

Pamuk günümüzde 50'den fazla ılıman ve tropik bölgede ticari olarak üretimi her geçen gün artan, dünyada en çok kullanılan lif bitkisidir. Dünyadaki ekilebilir arazinin yaklaşık olarak %2.4'ü pamuk tarımı için kullanılmaktadır (OGTR, 2008).

2.1.2. TAKSONOMİ

Gossypium sınıfı, 18. Yüzyılın ortalarında Linneaus tarafından isimlendirilmiştir. Malvaceae (ebegümeciler) ailesinden, *Malvales* takımının bir üyesidir. *Gossypium hirsutum* L. adını yapısında bulunan tüylerden alır. Genellikle Upland pamuk, Amerikan pamuğu ya da Meksika pamuğu olarak bilinir. Pamuğa genel olarak verilen "cotton" kelimesi, tohum kabukları etrafında

eğrilebilir (bükülebilir) lif (pamuk tiftiği) üreten anlamında kullanılan arapça “*quotn*” kelimesinden köken almaktadır. Pamuk için kullanılan en eski tabir Sanskrit dilindeki “*karparsa-i*” ve ilk incil el yazmalarındaki “*Karapas*” ifadeleridir (OGTR, 2008).

Gossypium'un taksonomisi günümüzde hala önemli çalışma konularından birisidir (OGTR, 2008). *Gossypium* sınıfı 5 tetraploit ($2n=4x=52$) ve 45'in üzerinde diploit ($2n=2x=26$) türü içermektedir (Zhu et al., 2014; Zülkadir ve Bölek, 2014). Pamuk Dünya'da, “*PAMUK KUŞAĞI*” (Cotton Belt) denen kuzey yarı küre içinde 37° N ve Asya Ukrayna'da 47° N ile Güney yarı kürede 35° S enlem dereceleri arasında yetişmektedir (Gürel vd., 2000).

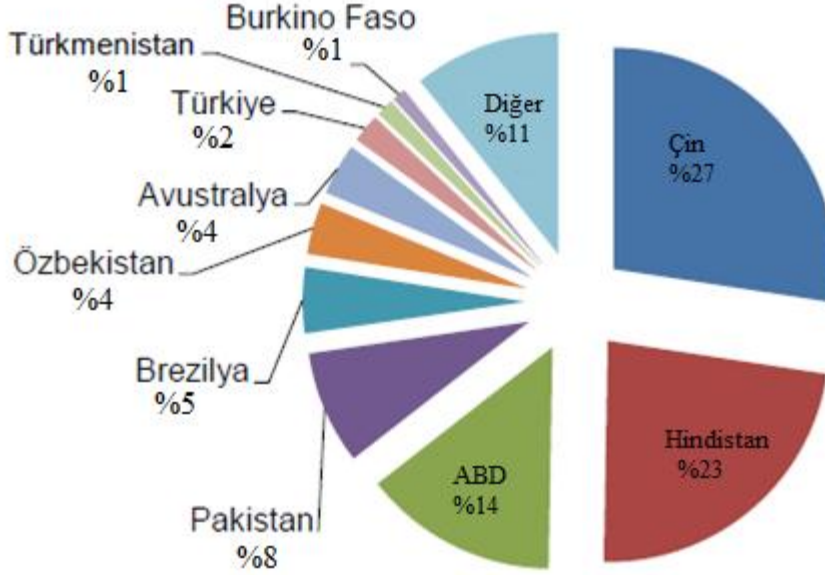
“Pamuk” terimi genellikle *G. hirsutum* ve *G. barbadense*'yi ifade etmek için kullanılıyor olsa da, toplamda 4 türü kapsamaktadır: *G. hirsutum* L., *G. barbadense* L., *G. arboreum* L., *G. herbaceum* L. (OGTR, 2008). Günümüzde en fazla kullanılan tür olan *G. hirsutum*, dünya pamuk üretiminin %90'ından fazlasını oluşturmaktadır. Ekonomik değerinin yanı sıra pamuk, poliploidizasyon, hücre uzaması ve hücre duvarı biyosentezinin çalışılmasında mükemmel bir model sistem olmaktadır (Zhu et al., 2014).

Dünya lif üretiminin %5'lik kısmı ise *G. barbadense* ile sağlanmakta ve bu üretimler ise Mısır, Peru, Sudan, ABD ve eski Sovyet ülkelerinde gerçekleştirilmektedir (OGTR, 2008).

2.1.2.1.Dünyada pamuk bitkisinin durumu

Dünyada, pamuk üretim alanının en geniş olduğu ülke Hindistan'dır. Ardından sırasıyla Çin, ABD, Pakistan, Özbekistan ve Brezilya gelmektedir. En çok pamuk üreten ilk 7 ülke sırasıyla; Çin, Hindistan, ABD, Pakistan, Brezilya, Avustralya, Özbekistan ve Türkiye'dir (**Şekil 2.1**). Tüketimde ise ilk üç sırayı yine; Çin, Hindistan ve Pakistan almakta, onları sırasıyla Türkiye, ABD ve Brezilya izlemektedir. Son 10 yılda birim alandan elde edilen verimlerin ortalamasına göre ilk yedi ülke; Avustralya, İsrail, Brezilya, Meksika, Çin, Türkiye, Suriye ve Yunanistan'dır. Son beş yılın ortalamasına göre en çok pamuk ithalatı yapan ilk yedi ülke; Çin, Türkiye, Bangladeş, Endonezya, Vietnam,

G.Kore ve Tayland'dır. En çok ihracat yapan ilk yedi ülke sıralaması ise; ABD, Hindistan, Brezilya, Avustralya, Özbekistan, Pakistan ve Yunanistan şeklindedir (KGM, 2013).



Şekil 2.1. Dünya pamuk üretimi dağılım grafiği. Dünya pamuk üretiminin yarısını Çin (%27) ve Hindistan (%23) gerçekleştirmektedir. Üçüncü sırada ABD %14 üretim payı ile yer alırken, Pakistan %8 ile dördüncü sıradadır (Çetin ve Karadeniz, 2013).

2.1.2.2. Türkiye’de pamuk bitkisinin durumu

Uluslararası Pamuk Danışma Kurulu’nun verilerine göre, Türkiye, pamuk ekim alanı yönünden dünyada dokuzuncu, birim alandan elde edilen lif pamuk verimi yönünden altıncı, pamuk üretim miktarı yönünden yedinci; pamuk tüketimi yönünden dördüncü, pamuk ithalatı yönünden üçüncü ülke konumundadır. GDO’suz pamuk üretimi yapan ülkeler göz önüne alındığında, Türkiye bu alanda en verimli pamuk üretimi gerçekleştiren ülkedir. Ülkemiz için önemi yüksek olan pamuğun üretimi ve kullanımı, diğer bir ifade ile pamuk politikası, izlenen tarım, sanayi ve ticaret politikaları ile uluslararası gelişmelerden yoğun bir şekilde etkilenmektedir. Türkiye’de pamuk tarımı genelde Ege Bölgesi, Güneydoğu Anadolu Bölgesi ile Çukurova ve Antalya yörelerinde yapılmaktadır (KGM, 2013) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Türkiye’de pamuk üretiminin yoğun olarak gerçekleştiği bölgeler ve üretimde sahip oldukları yüzde oranları (Gürel ve Sezener, 2012)

Türkiye’de, tarımı yapılan pamukların hepsi, *Gossypium hirsutum* L. türüne ait pamuk çeşitleridir. Ekolojik farklılıklar yanında uygulanan pamuk üretim tekniklerindeki farklılıklar, pamuk üretim bölgelerimizde yetiştirilen çeşitlerin, birbirlerinden oldukça farklı genetik yapıya sahip olmasına neden olmuştur. Günümüzde pamuk üretimindeki temel amaçlar, yüksek verim yanında, lif teknolojik özelliklerinin geliştirilmesi, erkencilik, çırçır randımanının yükseltilmesi, hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılık ve üretim masraflarının azaltılabilmesi şeklinde özetlenebilir. Türkiye’de pamuk üreticileri, hasat ettikleri kütlü pamuklarını üyesi oldukları kooperatiflere ya da özel çırçır fabrikalarına vermektedirler. Depo olanakları olan çiftçiler, pamuklarını, piyasa fiyatlarını izleyerek, daha sonra da satabilmektedirler (Gençer vd., 2005).

Geliştirilecek çeşitlerin yüksek verim ile birlikte hastalık ve zararlılara tolerant olması, lif kalite özellikleri bakımından da tekstil sektörünün istediği kriterlere sahip olması gerekmektedir. Antalya ve Çukurova pamuk ekim alanlarındaki en büyük problem zararlılardır. Bunlar; pamuk yaprak biti (*Aphis gossypii*), yaprak piresi (*Empoasca spp.*), beyaz sinek (*Bemisia tabaci*), kırmızı örümcek (*Tetranychus spp.*), pembe kurt (*Pectinophora gossypiella*) ve yeşil kurttur (*Heliothis armigera*). Pamuk tarımında zararlıların olumsuz etkileri, yaygın olarak tarımı yapılan çeşit özellikleri yanında, iklim koşulları ve uygulanan tarımsal mücadele ile yakından ilgilidir. Bir çeşidin ıslahında dayanıklılık ile ilgili genlerin arttırılması verime negatif yönde etkide bulunmaktadır. Ege bölgesinde bu zararlılar doğal olarak kontrol altındadır. Bununla birlikte, Ege ve Hatay

pamuk ekim bölgelerinde *Verticillium solgunluk* hastalığı yıllara ve mevsime göre büyük zararlara neden olabilmektedir (KGM, 2013).

Hastalıkla mücadelede en emin yol dayanıklı çeşit elde etmek ve yetiştirmektir. Melezleme ıslahı ve Biyoteknoloji disiplinlerinin ortaklaşa çalışması ile solgunluk hastalığına halen kullanılmakta olan yaygın çeşitlere göre daha tolerant pamuk çeşitleri elde edilebilir ise milli gelire küçümsenmeyecek derecede katkı sağlanabilecektir. Genel olarak değerlendirildiğinde; pamuk toplama işçiliğindeki yüksek fiyat ve işçi bulmada yaşanan sıkıntıların devam etmesi nedeniyle makineli hasada uygun kültürel işlemler (defoliant uygulaması gibi) ve çeşit ıslahına ağırlık verilmeli, ana ürün çalışmalarının yanı sıra, ikinci ürün pamuk tarımı yapılabilecek erkenci pamuk çeşitleri çalışmalarına da ivme kazandırılmalıdır (KGM, 2013).

Pamuk lifi; doğal olması, sağlam yapısı ve hava geçirgenliği gibi özellikleri ile bitkisel ve sentetik elyaflara göre daha fazla tercih edilmektedir. Türkiye, dünyada tekstil ürünleri üretiminde giderek daha büyük önem kazanmakta ve her yıl önemli miktarda pamuk elyafı üretimi gerçekleştirilmektedir. Ancak üretilen miktar ihtiyacı karşılayamamakta ve büyük miktarda elyaf ithal edilmektedir. Bu eksikliği gidermek adına, ülkemizde pamuk üretim verimi ve lif kalitesinin artırılması adına planlı çalışmalar yapılmasına gerek duyulmaktadır (Sezener vd., 2008).

2.1.3. Ticari Kullanımlar

Pamuk günümüzde 50'den fazla ılıman ve tropik bölgede ticari olarak üretimi her geçen gün artan, dünyada en çok kullanılan lif bitkisidir. 2005-2006 yılları arasında dünyada üretilen pamuk miktarı yaklaşık olarak 24.88 Mt (megaton) iken, 2011-2012 yılında bu değer 28.04 Mt değerine ulaşmıştır (OGTR, 2008).

Yıllık bir bitki olan pamuk, lifi, çiğidi ve küspesiyle birçok sanayii sektörünün hammaddesi olarak dünyadaki önemli tarımsal ürünlerden biridir. Pamuk bitkisi öncelikli olarak tekstil sanayisinin ana hammaddesi olan pamuk lifi

(elyaf) için yetiştirilmektedir. Diğer bitkisel ve sentetik maddelere göre daha sağlam bir lif yapısına sahip olduğu ve insan terini hapsedtiği için tekstil ürünlerinde daha çok tercih edilmektedir. Geniş bir kullanım alanına sahip olan pamuk lifi tekstil sanayisinin dışında barut ve film malzemesi yapımı gibi yaklaşık 50 civarında değişik sanayi kolunda kullanılmaktadır (Alkaya, 2010).

Pamuk, en çok üretilen lif bitkisidir. Öncelikle çekirdeği ile birlikte hasat edilir ve daha sonra çekirdeğinden ayrılarak tohum ve hav elde edilir. Uzun hav lifleri, dokuma ve örgü için kullanılan pamuk ipliğinin elde edilmesi için eğrilerek işlenmektedir. Pamuk havından elde edilen kumaşlar; giyim, döşemecilik, havlular ve diğer ev ürünlerinin üretiminde kullanılmaktadır (OGTR, 2008).

Pamuk tohumları sahip oldukları ortalama %20 oranında çiğit yağı ile bitkisel yağ, linterleri ile selüloz sanayinin hammaddesini teşkil etmekte, kalan aminoasitlerce zengin küspesi ise hayvan beslenmesine katkıda bulunmaktadır. Pamuk bitkisi dünyada soya fasulyesinden sonra ikinci önemli bitkisel yağ kaynağıdır. Dünya pamuk yağı üretimi 3,8-4,3 milyon ton arasında değişirken, ülkemizde 130-150 bin ton arasında olup bitkisel yağ ihtiyacımızın %25'ini karşılamaktadır (KGM,2013).

Tohumlar yağ eldesi ya da tekrar tarlaya ekim için kullanılmadan önce üzerindeki elyaf tabakalar uzaklaştırılmalıdır. Elyaf lar da iki kesim halinde tohumdan uzaklaştırılırlar. İlk-kesim elyaf, daha uzun liflere sahiptir ve döşek, mobilya kaplama ve paspas yapımı gibi amaçlarla kullanılır. İkinci-kesim elyaf daha kısa liflere sahiptir, kimyasal ve gıda amaçlı kullanılan selülozun temel kaynağıdır. Yüksek lif içerikli diyet ürünleri, dondurmalarda kıvam azaltıcı, salata sosu ve diş macunu gibi selüloz bazlı ürünlerde kullanılır. Kimya endüstrisinde ise selüloz asetat ya da nitroselüloz gibi çeşitli selüloz türevlerinde kullanılır (OGTR, 2008). *G. hirsutum*'un en son kalan tohumu %15-33 oranında işlenmemiş yağ, %33-45 küspe, %5-10 elyaf ve %24-34 kabuktan oluşur (Anonim, 2014e).

Üzerinde hav ve elyaf bulunmayan pamuk tohumlarının yağ, un ve kabukları çeşitli işlemlerden geçirilir. Pamuk tohumunun yağı; ısıtma, sodyum hidroksit ekleme, kil ile beyazlatma, filtreleme ve vakum altında buharda bekletme gibi çeşitli işlemlerden geçer. Pamuk yağı 19.yy'ın ortalarından beri

sıklıkla kullanılmaktadır ve Birleşmiş Milletler Federal Gıda, İlaç ve Kozmetik Yasası (United States Federal Food Drug and Cosmetic Act) kapsamında 1958'den itibaren sıklıkla kullanımı nedeniyle GRAS (Generally Recognised As Safe) olarak adlandırılmıştır. Kullanımı sindirilebilir sebze yağı ve margarin, sabun ve plastikler gibi geniş çeşitliliğe sahiptir (OGTR, 2008). Pamuk yağı %13-44 oleik ve %33- 58 linoleik asit içeriği ile oleiklinoleik asit grubu yağlar arasında bulunmaktadır. İçerdiği en önemli doymuş yağ asidi ise %17- 29 oranındaki palmitik asittir (Alkaya, 2010).

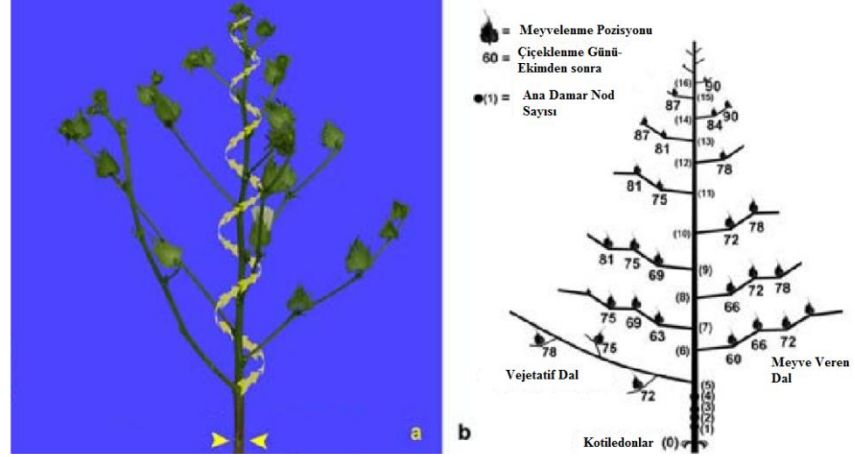
Pamuk tohumu unu, yağ uzaklaştırıldıktan sonra %40 oranında protein içeren kısımdır. Hayvan beslenmesinde kullanılır; ancak bu kullanım toksik madde içeriği ile sınırlandırılır (gossipol ve siklopropenoit yağ asitleri) (Anonim, 2014e). Avustralya ve Yeni Zelanda'da pamuk tohumu unu insan tüketiminde kullanılmıyor olsa da, gossipol içermeyen ürünlerin tüketimine ABD ve diğer ülkelerde izin verilmektedir. FAO ve WHO'ya göre sindirilebilir pamuk tohumu ürünlerinde 0.6 µg/mg (600 ppm) gossipol bulunmasına izin verilirken, FDA tarafından belirlenen şart 450 ppm'in altında olmasıdır. Bu ürünlerin tüketimi, düşük maliyetle yüksek kaliteli protein içeriği sağlaması nedeniyle, Orta Amerika ülkeleri ve Hindistan'da gerçekleşmektedir (OGTR, 2008).

Pamuk artıkları, hayvan gübrelerinde hacim arttırıcı ajan olarak kullanılabilir. ABD'de, pamuk artıkları dizel üretiminde değerlendirilmektedir. Pamuk bitkisinin saplarının ağaç ile eş değer spesifik enerjiye sahip oldukları (17.1- 18.1 mJ/kg), bu nedenle endüstriyel dizel üretiminde ya da fındık kabukları ile birlikte barbekü biriketlerinde kullanılabilecekleri önerilmiştir. Ayrıca pamuk artıklarının etanol üretimi için fermente edildiği farklı çalışmalar da mevcuttur (OGTR, 2008).

2.2. Morfolojik Özellikleri

Pamuk bitkilerinin kararsız büyüme yapıları vardır. Bitkide aynı anda yapraklar, çiçekler, meyveler (kozalar) ve tohumların gelişimi gerçekleşebilir. Bitki üzerindeki dallar vejetatif özellik gösterirken, aynı zamanda da meyve verebilirler. Vejetatif dallar tek bir meristeme sahiptirler ve bu yüzden uzun ve

düz bir büyüme gösterirler. Fakat meyve veren dallar çok sayıda meristeme sahip oldukları için, her bir meristem bir önceki meyve gelişiminin ardından başladığı için zigzag bir yapı gösterirler. İlk beş ana gövde meristemi birincil vejetatif büyümeyi başlatır ve meyve verecek olan dalların gelişimi bunun ardından başlar. Bu şekilde dallar $3/8$ birbirini izleyen filotaksi hareketi ile yayılım gösterirler (Şekil 2.3) (OGTR, 2008).



Şekil 2.3. (a) Yaprakları dökülmüş pamuk bitkisi dalları $3/8$ ardışık filotaksi özelliği gösterir. Her bir dal, gövde etrafında bir önceki dala göre $3/8$ 'lik dönme gösterir. Dallar ana gövde üzerindeki aksilerden gelişim gösterir (b) Meyve veren dallarda nodlardan çiçeklenme zamanını genel özellikleri ile gösteren diagram (OGTR, 2008)

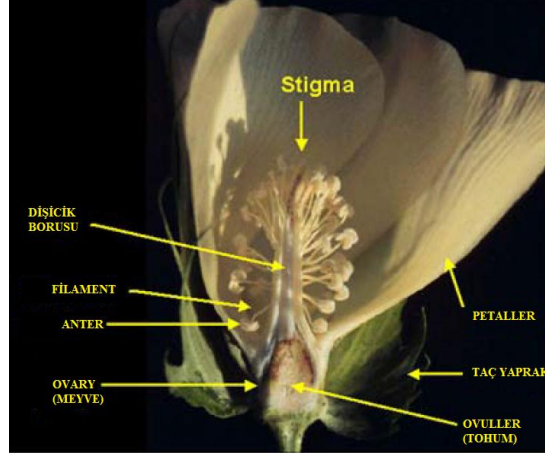
Normal koşullarda çiçek tomurcuğu ilk görüldükten 21 gün sonra çiçek açar. Bir pamuk bitkisinde çiçeklerin açılışı ve buna bağlı kozaların gelişmesi ve kapsüllerin açılması oldukça düzenli bir akış içinde gerçekleşir. Pamuk bitkisinde merkezden çevreye doğru büyümenin bir eseri olarak: ilk açan çiçek en alt dalın ana sapa en yakın olan boğum (nodium) üzerinde görülür. Bunu izleyen çiçekler: ya bir üst dalın ana sapa en yakın olan boğumunda, ya da aynı dalın onu izleyen boğumunda açarak gelişirler. Böylece alttan yukarı ve içten dışarı doğru bir çiçeklenme spirali meydana gelir. Bu spiralde birbirini izleyen iki daldaki çiçekler arasındaki açılışta genellikle 3 günlük bir zaman farkı vardır (Anonim, 2014d).

Orta uzunluktaki bir meyve dalında yaklaşık 6-8 çiçek tomurcuğu bulunur. Daha uzun dallar, daha fazla çiçek tomurcuğu taşıyabilirler. Tomurcuklar, ilk olarak piramit şeklinde ve yeşil renkte görünürler. Bunlara tarak (square) adı verilir. Her bir tarak, üç yaprakçık ile asıl tomurcuğu oluşturur. Bu yapraklara

aynı zamanda dış çanak “brakteol” veya “brakte” olarak da adlandırılmaktadır. Brakte yaprakları, büyümekte olan tomurcuğu örterek dış etkenlerden korur. Bu yaprakların alt kısmı meyvenin (koza) dibine yapışıktır. Brakte yapraklarının kenarı derin yırtmaçlıdır. Hasat zamanına kadar kozaya yapışık olarak kalır. Hasat zamanında kurur, pamuk elyafının arasına girerek kirliliğe neden olur. Brakte yapraklarının şekli ve yırtmaç sayısı türlerin belirlenmesinde önemlidir (Anonim, 2014d).

G. hirsutum heliotropik özellik gösterir, yaprakları genellikle düzdür ve gün içerisinde güneşten ışık adsorbsiyonunu arttıracak şekilde güneşi takip eder. *G. barbadense*'ye göre daha az sayıda stoma içerir, ancak; *G. barbadense*'de bulunan stomalar daha küçük yapıda olduğu için yaprak alanı başına düşen stoma yüzeyi oranı *G. hirsutum*'da fazladır. Ana gövde üzerindeki yapraklar beş lob içerirken, meyve veren dallardaki yapraklar üç lob içermektedir (OGTR, 2008).

Pamuk çiçekleri, vejetatif uzamayı sonlandırır. Bunun ardından floral meristem, kaliks, korolla, anterleri içeren androecium ve 3-5 karpel içeren dişi organ (gynoecium) gelişimini devam ettirir (Oosterhuis and Cothren, 2012). Pamuk çiçekleri büyük ve beşli yapıdadırlar. Genellikle simpodiyal dallarda 1-4 cm uzunluktaki çiçek sapı üzerinde tekli olarak bulunurlar. Floral ve ekstra-floral bez dokunun her ikisine de sahiptirler. 2-5 cm uzunluğundadırlar ve 0.5-1 cm uzunluğunda stigma içerirler. Ovaryum her 3-5 lokusunda 5-10 ovul içerir. Kapalı formda bulunan erkek organ, 0.5-1 cm uzunluğunda, çok sayıda kendine döllen normal polen içeren stamen içerir. Çiçek başına yaklaşık olarak 20,000 polen mevcuttur. *G. hirsutum* çiçekleri ve polenleri krem renklidir ve çok az miktarda nektar salgırlar (Şekil 2.4) (OGTR, 2008; Anonim 2014f).



Şekil 2.4. *G. hirsutum* çiçek yapısı (OGTR,2008)

2.3. Pamukta Çiçeklenme Aşamaları

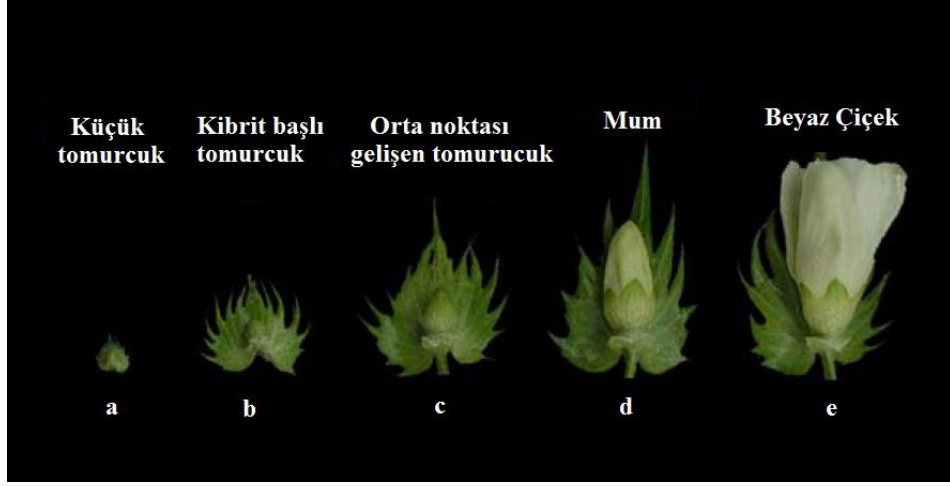
Pamukta çiçeklenme, yaz döneminde artan sıcaklıkla başlar ve gelişme süresince devamlılık gösterir. Pamukta çiçeklenme dallar itibariyle aşağıdan yukarıya ve içten dışa doğru bir seyir izlemektedir (Ayaz ve Emiroğlu, 2003). Pamuk bitkisinin gelişimi üzerinde iklim koşullarının etkisi önemlidir. Pamuk bitkisinin gelişiminin iklim koşullarından etkilenmesini daha iyi açıklayabilmek üzere yaşam döngüsü dört grupta toplanmıştır (Özkan ve Kaynak, 2009);

- a) çiçeklenme- ilk gerçek yaprak çıkışı
- b) İlk gerçek yaprak çıkışı-ilk taraklanma
- c) ilk taraklanma-ilk çiçek açma
- d) ilk çiçek açma-koza açma sonu

Her bir dönem sıcaklık, transpirasyon (terleme), yağış (ya da sulama), ışıklanma süresi gibi birçok iklim faktörlerinden etkilenmektedir. Her bir yetiştirme dönemi sırasında bitkilerin gelişim miktarı iklim faktörlerine bağlı olarak değişmektedir (Özkan ve Kaynak, 2009).

Brakte yaprakların altında belirsiz “kaliks” ve “çiçek tomurcuğu” bulunur. Bu kaliks yapraklarına “asıl çanak” adı verilir. Asıl çanak birbirine birleşerek yeşil bir halka meydana getiren çanak yapraklarından oluşmaktadır. Asıl çanak içerisinde 5 adet çan şeklinde taç yaprakları bulunur. Taç yaprakların kenarı düz (truncate) veya dalgalı (undulate) şeklindedir. Çiçek rengi, çeşitli pamuk türlerinde değişiktir. Amerikan tipi upland pamuklarında krem renginde oldukları halde; yerli pamuklarda tam sarı renktedir. Mısır pamukları (*G. barbadense*) ile yerli pamuklarda (*G. herbaceum*) petal yapraklarının iç temel kısmında kırmızı veya mor renkte bir benek bulunur. Oysa ki, upland (*G. hirsutum*) pamuklarında benek bulunmaz. Bazı yabani çeşitlerde ise bütün petal kırmızı renktedir (Anonim, 2014d).

Pamuk bitkisinin kararsız gelişim gösteren birkaç yıllık bir bitki olması sebebiyle, gelişimi bir stres faktörü ile karşılaşana kadar devam eder. Pamuk filizinin gelişimi sırasında, birincil dal yapraklardan bir sinyal alır ve vejetatif dallanmanın gerçekleşmesini başlatmak üzere nodların gelişimini sağlar. Bu dalların her biri çiçeklerle tamamlanır. Ana gövdeden ya da vejetatif gövdeden meyve oluşturacak dalın büyümesi başlar ve tarak ya da yaprak ile son bulur. İlk tarak oluşumu, tohum çimlenmesi başladıktan yaklaşık 35-40 gün kadar sonra belirlenebilmekte, 20-25 gün kadar sonra da açık çiçek gelişimi gözlenmektedir. Çiçeklenmeler yaklaşık olarak 3 günlük aralıklarla gerçekleşir. Çiçeğin açılmasının hemen ardından anterler açılır ve polenleri yayılımı gerçekleşir (Oosterhuis and Cothren, 2012) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Pamuk çiçek gelişimi. Tomurucukların kibrit başlı yapı (a)'dan çiçeğe (e) kadar gelişimi sırasında hem boyut hem de petal gelişimi gerçekleşmektedir (OGTR, 2008).

2.4. Üreme Özellikleri

2.4.1. Polen

Pamuk polenleri, büyük, küre biçimli, dikenli ve büyük porlar içeren bir yapıya sahiptirler. Her bir çiçek ortalama 30.000-40.000 arası polen tanesi içermektedir (Jones and McCurry, 2012).

Çiçeklenmenin hemen ardından anterler yarılr ve polenler dışarı atılır. *G. hirsutum*'da korolla açıklığı polinatörlerin erişimine izin verecek düzeye ulaştıktan sonra polenlerin dağılımı gerçekleşir. Bundan sonra da stigmalar tutunurlar. Çiçekler, çoğunlukla kendine tozlaşma özelliği gösterirler (OGTR, 2008).

Polenlerin canlılığı sekiz saat sonunda hızlıca azalır. Bütün gün yoğun ışık altında bekleyen çiçeklerde, yüksek sıcaklıktan dolayı polen tanelerinin *in vitro* çimlenmesinde azalmalar görülmüştür (OGTR, 2008).

2.4.2. Tozlaşma

Pamuk bitkisinde, polenler büyük, ağır ve yapışkan oldukları için rüzgarla kolay bir şekilde yayılamazlar ve öncelikle kendine tozlaşma gerçekleşir. Çiçeklenmeler yaklaşık olarak 3 günlük aralıklarla gerçekleşir. Çiçeğin açılmasının hemen ardından anterler açılır ve polenlerin yayılımı meydana gelir. Polinasyon, stigma ve anter birbirine çok yakın olduğu için, herhangi bir böcek yardımı olmadan gerçekleşebilir (Oosterhuis and Cothren, 2012).

2.4.3. Döllenme

Pamuklarda çiçekler şafak vaktinde açar ve güneş doğduktan birkaç saat sonra da polen tozları serbest hale geçer. Bu zamanda, tepelik döllenmeyi kabul edecek bir durumdadır. Balls'ın Mısır pamuklarında yaptığı araştırmalara göre: kendine döllenme %90-95 olup; yabancı döllenme %5-10 arasındadır. Bazı durumlarda yabancı döllenme %50'ye çıkabilmektedir. Döllenme pamukta çiçek açtıktan 26-36 saat sonra tamamlanmaktadır. Birinci gün akşamına doğru beyaz renk pembeleşmeye başlar. İkinci gün ise uçuk pembe bir renk alır. Üçüncü gün solar ve dökülür (Anonim, 2014d) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Pamuk çiçeğinin gelişim aşamaları (Anonim, 2014d)

2.4.4. Meyve Gelişimi

Koza, çiçek döllenmesinden sonra hızla gelişme göstermektedir. Gelişme koşulları uygun gittiği hallerde bir kozanın normal büyüklüğüne kavuşması yaklaşık olarak 24 günde gerçekleşir. Bu dönemde kozalar henüz yeşildir. Koza

24 günde normal büyüklüğünü kazanmasına rağmen, içindeki liflerin olgunlaşması için 30-40 günlük periyoda ihtiyaç duyar. Tomurcukları görünmesinden itibaren çiçek açıp, kozaların gelişmesi ve liflerin olgunlaşması 75-85 günü bulmaktadır (Anonim, 2014d).

Çiçek, oluştuktan yaklaşık 5-7 gün sonra kuru yaprak düşer, böylece pamuk meyvesi ya da kozasının oluşumu başlar. Gelişim aşamasında kozalar yuvarlak ve açık yeşil renkli olarak gelişir. Koza gelişimi üç aşamada gerçekleşir. Başlangıç olarak pamuk lifleri uzar ve koza maksimum hacime ulaşır. Üç hafta sonunda, boş pamuk liflerinin içinde selüloz depolanmasının başladığı dolgu fazı başlar. Bu süreçten yaklaşık altı hafta sonra ise koza olgunlaşma fazı başlar ve koza tamamen kurur (OGTR, 2008).

Döllenmeden sonra koza içerisindeki çenetlerde kütlü (lifleri ile birlikte tohumlar) gelişmeye başlar. Pamuk tohumlarına “*Çiğit*” adı verilir. Pamuk lifleri, bu çiğitlerin üzerinde oluşur. Koza içerisinde sayıları yaklaşık 20-40 arasında değişen olgun pamuk tohumu bulunur. Dar olan sivri ve sert kısmına mikropil denir. Tohumun geniş olan taban kısmı (şalaza) ise yumuşak ve süngerimsi bir yapıya sahiptir. Çimlenme öncesinde su tohuma bu kısımdan girmektedir (Anonim, 2014d)

2.5. Pamuk Biyokimyası

Pamuk bitkisi, lifleri ile tekstil endüstrisinin olduğu kadar; tohumlarında içerdiği %17-24 oranındaki yağı ile gıda sanayisinin, elde ediliş yöntemine bağlı olarak küspesinde içerdiği %35-45 oranındaki proteini ve %0.5-6.0 oranındaki yağı ile hayvan yem sanayisinin en önemli ham maddelerinden birisidir (Anonim, 2014f).

Pamuk, insan, hayvan ya da bitkilerde herhangi bir hastalığa sebep olmamakla birlikte, insan ve hayvan sağlığında etkili çok sayıda bileşik içermektedir. Bunların içinde en önemlisi ise gossipol (*1,1',6,6',7,7'-hekzahidroksil-5,5'-diisopropil-3,3'-dimetil-(2,2-binaftalen)-8,8'-dikarboksiadehit*) alkoloididir. Bu metabolit; tohum, yaprak ve köklerde bulunan,

pamuk tohumları tüketilmeden önce uzaklaştırılan sarı renkli bir polifenolik bileşiktir. Gossipol, ayrıca erkekler için kontraseptif etki (doğum kontrolü) göstermekle birlikte, antikanser ilaç ve anti-hipersentif (tansiyon düşürücü) olarak da kullanılmaktadır. Pamuk, ayrıca tohumlarında siklopropanoid yağ asitleri ve yapraklarında tanen içermektedir (OGTR, 2008).

Ekstraksiyon pamuk tohumu küspesinde; %91.7 kuru madde, %84.6 organik madde, %7.1 ham kül, %40.0 ham protein, %1.9 ham yağ, %12.7 ham selüloz, %30.0 azotsuz öz maddeler bulunmaktadır. Ancak, kökleri dışında bitkinin her yerinde, özellikle tohumlarında bulunan, insanlar, tek mideli çiftlik hayvanları ve kümes hayvanları için toksik etkili bir alkaloid olan gossipol nedeniyle gıda ve hayvan yemi sanayisinde birçok ekonomik sorunlar ortaya çıkmaktadır (Anonim, 2014f).

Olumlu yanlarının dışında pamuk tohumunun içerdiği gossipol ve yağ asitleri (dihidrosterkülik, siterkülik ve malvalik asit) toksik özellikler de göstermektedir. Bu sebeple, pamuk tohumlarının kullanımı hayvan beslenmesi ile sınırlı kalmaktadır. Ruminantlar, rumen sistemlerinde gerçekleştirdikleri detoksifikasyon ile bu bileşiklerden daha az oranda etkilenirler (OGTR, 2008).

Pamuk polenleri alerjenik değildir. Genellikle büyük, yapışkan ve ağırdır, rüzgar ile kolayca yayılmaz. Bu sebeple, polenlerin hava yoluyla alerjik reaksiyon gösterme ihtimali düşüktür. Pamuk elyafı, ev tozuna sebep olan en önemli faktörlerdendir ve bu sebeple alerjen olarak bilinir (OGTR, 2008).

2.6. Üretim Şekilleri

2.6.1. Tarımsal Üretim

Günümüzde pamuk üretimindeki temel amaçlar, yüksek verim yanında, lif teknolojik özelliklerinin geliştirilmesi, erkencilik, çırçır randımanının yükseltilmesi, hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılık ve üretim masraflarının azaltılabilmesi şeklinde özetlenebilir. Türkiye’de pamuk üreticileri, hasat ettikleri kütlü pamuklarını üyesi oldukları kooperatiflere ya da özel çırçır fabrikalarına

vermektedirler. Depo olanakları olan çiftçiler, pamuklarını, piyasa fiyatlarını izleyerek, daha sonra da satabilmektedirler (Gençer vd., 2005).

Pamuk, genellikle tohum ile çoğaltılır. Ekim için hazırlanan tohumlar, hav ve elyafından uzaklaştırılmış haldedir. Bunun için uygulanan çeşitli ön işlemler mevcuttur. Sülfirik asit uygulaması en sık uygulanan tekniktir. Asit uygulaması tohumu ısıtır ve tohum kabuğunun aşınmasına yol açarak tohum dormansisini kırar ve çimlenme oranını artırır (OGTR, 2008).

Pamuk üretiminin özellikle çapalama ve hasat yönünden büyük oranda insan işgücüne dayanması ve üretim girdilerinin aşırı kullanılması, üretim maliyetinin yüksek olmasında başlıca etkenlerdir. Üretim maliyetinin yüksek olması, pamuğun karlılığı ve diğer ürünlerle olan rekabet gücünü azaltmaktadır (Gençer vd., 2005).

Pamuk tarımının karlılığının korunması, üretim maliyetinin azaltılması, uygulanması gereken zorunlu bir politika olmalıdır. Ülkemiz koşullarında pamuk üretim maliyetinin azaltılabilmesi (Gençer vd., 2005);

- Polikültür pamuk tarım alanlarının genişletilmesi,
- Minimum toprak işleme, insan gücüyle yapılan işlemlerin azaltılması, üretim girdilerinin (tohum, gübre, su, ilaç, alet-ekipman, enerji vb.) optimum düzeyde ve etkili kullanımı, hasatın makine ile yapılması ve bu konularda üreticilerin eğitilmesi,
- Zararlılara, hastalıklara ve su azlığı başta olmak üzere gelişimi olumsuz etkileyen faktörlere karşı dirençli pamuk çeşitlerinin geliştirilmesi,
- Kültürel işlemlerin, tarımsal savaşı azaltıcı şekilde seçilmesi,
- Başlıca zararlıların, bunların biyo-ekolojilerinin ve ekonomik zarar eşiklerinin tespit edilmesi ile olanaklıdır.

G. hirsutum ve *G. barbadense* tetraploit genom yapısına sahiptirler ve büyük kromozomal farklılıklar ile birbirlerinden ayrılmazlar, bu sebeple fertil F1 dölünü oluşturabilirler. Ayrıca devam eden generasyonlarda F2 dölünde görülen letal gen kombinasyonları buna delil olarak gösterilebilmektedir. İki tür; farklı ribosomal DNA sekansları ve kloroplast genomlarına sahip olsalar da, kloroplast genom sekansları büyük benzerlikler göstermektedir. İki türde genetik ve fizyolojik izolasyon mekanizmaları birbirlerinden farklı şekilde evrimleşmelerine neden olmuş; “corky” lokusunda uyuşmazlıklar gerçekleşmiş, polen saçılma zamanlarında ve selektif fertilizasyonda farklılıklar meydana gelmiştir. Bu durum yönlendirilmiş ıslah ile çözülebilmektedir. Yapılan çalışmalarda, lif uzaması, lif inceliği, lif uzunluğu ve gelişmiş lif yapısı ve agronomik özelliklerin benzerliklerin haritalanmasında QTL (quantative trait loci) analizi için *G. hirsutum* ve *G. barbadense* melezlenmiş ve ardından tersine ıslah ile *G. hirsutum* ile yeniden melezlenmiştir (OGTR, 2008).

2.6.2. Doku Kültürü

Pamukta doku kültüründe rejenerasyon ile ilgili ilk yayın 1983 yılında Davidson ve Hamilton tarafından gerçekleştirilmiştir. O zamandan itibaren pamukta transformasyon çalışmaları yapıyor olsa da, araştırmalar genel olarak rejenere edilebilen pamuk çeşidi olan *G. hirsutum* Coker’in ticari çeşitlerle melezlenmesiyle ilgili olmuştur. Birçok çeşide ait yapılan çalışmalarda elde edilen kalluslar somatik embriyolara dönüşmüş olsalar bile, pek çoğu başarılı şekilde olgun bitkilere rejenere olamamışlardır (OGTR, 2008).

Bitki biyoteknolojisi; biyolojik bilimlerdeki gelişmelerin, teknolojiye gelişmeler yardımıyla uygulanması ve ticari amaçlara yönelik kullanılması şeklinde tanımlanabilir (Kaya, 2001). Bitki biyoteknolojisinin amacı, bitkisel üretimde bilinen klasik yöntemlerle çözülemeyen veya çözümü güç olan problemlere çözüm getirerek, daha ekonomik, kalite ve kantite yönünden daha yüksek bitkisel üretimin gerçekleştirilmesine yardımcı olmaktır (Hatipoğlu, 1997). Islah sürecinde istenen amaç doğrultusunda genetik yapının değiştirilerek daha verimli ya da daha dayanıklı hale getirilmesi gibi zaman alan süreçlerde bitki

biyoteknolojisi iyi bir alternatif yol olmuş, daha kısa zamanda başarılı sonuçlar alınmasına katkıda bulunmuştur (Ata, 2011).

Klasik ıslah yöntemleri ile yeni çeşitlerin geliştirilmesi uzun yıllar gerektirmekte ve çok fazla zamana ve emeğe ihtiyaç duyulmaktadır. Günümüzde bu süreyi kısaltmak ve daha kalıcı sonuçlar elde etmek için doku kültürü tekniklerinden faydalanılmaktadır (Alremi vd., 2014). Doku kültürü teknikleri içerisine giren haploit bitki üretim tekniği, bitki ıslahında önemli bir yere sahiptir (Heiser, 1976; Andrews, 1985). Haploit bitkilerin en önemli kullanım alanı kendine uyumsuz türlerde bile tamamen homozigot katlanmış dihaploit hatların hızlı üretimidir. Geleneksel yöntemlerle de saf hatlar elde edilebilir. Fakat bu işlem yabancı tozlanan bitkilerde 10-12, kendine tozlanan bitkilerde 6-7 yıl sürmektedir. Dioik türlerde ise kendileme olanaksızdır. Haploidi yöntemleri ile bu süre 1-2 yıla inmektedir (Ata, 2011).

Anter kültürü, haploit bitkilerin elde edilmesinde yaygın olarak kullanılan tekniklerden birisidir. Anter kültüründe başarıyı etkileyen faktörleri anter verici bitkiden kaynaklanan faktörler (genotip ve donör bitkinin yetiştirme koşulları) ve anter kültürü tekniğinden kaynaklanan faktörler (anterlerin gelişme dönemi, anterlere yapılan ön uygulamalar, besin ortamının bileşimi ve yapısı, inkübasyon koşulları) olarak iki grupta değerlendirmek mümkündür. Bu faktörler içerisinde, besin ortamı ve genotip büyük önem arz etmektedir. Anter kültüründe başarı genotiplere göre değişmekte ve her genotipin gelişim gösterdiği besin ortamları da farklılaşabilmektedir (Alremi vd., 2014).

2.6.2.1. Somatik Embriyogenez

Bitki doku kültürü tekniklerinde tam bitkinin rejenerasyonu ile sonuçlanan somatik embriyogenez önemli bir adımı oluşturmaktadır. Başarılı ve stabil bir transformasyon tek bir hücreden bitkinin oluşması ile sağlanabilmektedir. Kallus yığınlarındaki her bir hücrenin tam bir bitki oluşturabilme potansiyeli olduğu için, bitki eldesi tekniklerinde uygun prosedürlerin oluşturulmasında somatik embriyogenez önemli bir basamağı oluşturmaktadır. Birçok bitkide gerçekleştirilen somatik embriyogenez ve ardından gerçekleşen bitki

rejenerasyonu uygulamalarının özellikle pamuk ve soya fasulyesi gibi bitkilerde sağlanması zordur. Trolinder ve Xhixian (1989) 38 farklı pamuk genotipinde gerçekleştirdikleri çalışma sonucunda, hücre kültürlerinden bitki rejenerasyonunu sağlamışlar ve elde ettikleri kallusları dört farklı sınıfta toplamışlardır: yüksek, orta, düşük ve embriyonik olmayan kalluslar. Firoozabady ve DeBoer (1993)'in gerçekleştirdiği çalışmada ise Coker çeşidinde somatik embriyogenezin hızlı (10-12 haftalık sürede), Coker haricindeki çeşitlerde ise daha yavaş meydana geldiğini bildirmişlerdir (Rao et al., 2006).

Embriyogenezi teşvik eden önemli faktörler sıcaklık ön uygulamaları, sükröz ve azot eksikliği, osmotik stres olarak belirlenebilmektedir (Murovec and Bohanec, 2012). Uzun yıllardır devam eden çalışmalar sonucunda somatik embriyogenez ile bitki rejenerasyonunun sağlanması konusundaki çalışmalarda ilerlemeler kaydedilmiş olmasına rağmen, bazı sorunlar devamlılığını sürdürmektedir. Sınırlı sayıda çeşitte somatik embriyo eldesi ve bitki rejenerasyonu gerçekleştirilebilmiştir. Bu çeşitlerin çoğu ise artık yetiştiriciliği gerçekleştirilmeyen Coker çeşitleridir. Pamuk biyoteknolojisinin, pamuk ıslahı ve üretiminde uygulanmasında kısıtlar olmasının en önemli nedeni genotipe bağımlı cevap alınmasıdır. Bitki doku kültürü teknikleri ile bitki rejenerasyonunun sağlanmasına yönelik çok çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiş ve az sayıda da başarılı sonuç alınmıştır. Gerçekleştirilen çalışmalarda, 2,4-D'nin pamuk ve diğer bitkilerde somatik embriyogenezin başlatılmasında önemli rol oynadığı belirtilmiştir. Ayrıca sık altkültürlemenin embriyogenezin başlatılması için gerekli olduğu bildirilmiştir (Zhang et al., 2001).

2.7. Haploit Bitki Eldesi Teknikleri

Somatik hücrelerdeki kromozom sayısı, ait oldukları bitki türünün gamet hücrelerinde bulunan kromozom sayısına eşit olan bitkilere, *haploit bitkiler* adı verilmektedir. Haploit sayıda kromozoma sahip hücrelerin (polen/mikrospor veya megaspor) veya bu hücreleri içeren bitki kısımlarının (anter veya ovül) doku kültürü yoluyla kültüre alınmalarıyla elde edilen yeni hücrelerin ya da rejenerantların çeşitli yöntemlerle kromozom katlanması sonucunda homozigot

bitkiler elde edilebilmektedir. Bu tekniğin tümüne, “*in vitro* haploit bitki eldesi tekniği” adı verilmektedir (Şekil 2.7) (Babaoğlu vd., 2002).



Şekil 2.7. Haploit bitki üretim teknikleri (Babaoğlu vd., 2002)

Haploit bir bitkinin, kromozom sayısının (n) bazı kimyasal maddelerle katlanması yoluyla normal kromozom sayısına ($2n$) yeniden kavuşturulması ve mutlak homozigot bitkilerin elde edilmesi işlemine “*dihaploidizasyon*” adı verilmektedir (Ellialtıoğlu vd., 2001).

Haploit bitki üretimi teknikleri, çalışmalarda birçok avantaj sağlamaktadır. Bu avantajlar ise genel olarak şu şekilde sıralanabilir (Babaoğlu vd., 2002):

- Tam bir homozigotiye çok kısa sürede elde etmek mümkündür.
- Resesif mutasyonların açığa çıkartılmasında başvurulan en etkin yöntemdir.
- Haploitler ve bunların katlanması ile geliştirilen dihaploitler sitolojik, fizyolojik ve genetik açıdan önemli deneysel materyallerdir.
- Dioik türlerde veya klasik yöntemlerle homozigotiye ulaşmanın zor olduğu türlerde dihaploidizasyon yöntemi kullanılarak bu sorun bir generasyonda giderilebilir.
- Çok yıllık meyve ağaçları ve orman bitkileri gibi tohumdan çiçeklenmeye kadar oldukça uzun bir gençlik kısırlığı olan türlerde de haploidizasyon önem kazanmaktadır.

- Haploit bitkiler, farklı patojenlere karşı *in vitro* seviyede seçime olanak vermekte, hastalıklara dayanıklılık çalışmalarında yer, zaman ve maddi kazanç sağlamaktadır.

Haploit bitkiler, diploit bir bitkideki tüm organlara sahip olmalarına rağmen hücreleri daha küçük olduğundan morfolojik olarak zayıf, güçsüz, bodur yapılı bitkiler olup gelişimleri daha yavaştır. Yaprakları dar ve küçük, gövde ve dallarda boğum araları kısa ve çiçeklenme süresi daha uzundur. Küçük çiçek açarlar, ancak sterildirler ve tohum bağlamazlar. Polenleri küçük, anormal şekilli ve içleri boş olup, bu polenlere sahip anterler çatlama göstermezler. Plastid sayıları az, stomaları daha küçüktür ve birim alanda daha fazla stoma taşırlar. Bu özelliklerinden dolayı normalde hiçbir tarımsal değer taşımayan haploit bitkiler; bitki ıslahı genetik, sitolojik, fizyolojik, biyolojik ve biyokimyasal çalışmalar için son derece önemli ve değerli materyallerdir. Dioik türlerde veya kendileme depresyonu nedeniyle klasik yöntemlerle homozigotluğa ulaşmanın zor olduğu lahana, çilek, anemon gibi türlerde, bu sorun tek bir generasyonda çözülebilirken, uzun gençlik kısırlığına sahip çok yıllık meyve ağaçları ve orman bitkilerinde homozigotluk elde etmede çok büyük avantaj sağlarlar (Arı, 2006).

Haploit kromozom sayısına sahip bitkilerin elde edilmesi ve bunların kolhisin gibi bazı maddelerle kromozom sayılarının iki katına çıkartılmasıyla, bir yıl içerisinde % 100 homozigot saf hatlar elde etmek mümkün olabilmektedir. Böylece uzun süren homozigotlaştırma işlemini 1 yılda, ıslah çalışmalarını da 3–4 yıl gibi bir sürede tamamlama olanağı ortaya çıkmaktadır. Doğada ortaya çıkış sıklığı az ve düzensiz olan haploit bitkiler yeterli miktarda olmadığı ve istenildiği zaman bulunamadığı için ıslah çalışmalarında kullanılabilme özelliğine sahip değildirler. Erkek veya dişi gamet hücrelerinden *in vitro* koşullarda haploit embriyo ve bitki elde etme olanağı sağlayan doku kültürü teknikleri birçok bitki türünde dihaploitlerin elde edilmesinde faydalıdır (Ata, 2011).

Bu çalışmaların etkin şekilde yürütülebilmesi için yeterli miktarda ve kolayca elde edilebilmeleri gereken haploit bitkiler üç farklı yolla üretilmektedirler (Arı, 2006):

1. Spontan yolla: İlk doğal haploit, Blakeslee et al. (1922) tarafından *Datura stramonium* bitkisinde keşfedilmiştir. Doğada androgenez, gynogenez, semigami, polyembriyoni veya kromozom eliminasyonu yollarından birisi ile oluşan spontan haploitlerin oluşum frekansı %0.001–0.01 gibi çok düşük düzeydedir ve bugüne kadar ancak 100 kadar türde rastlanmıştır.

2. In situ uyartımla: Uzak akrabalar arası melezlemeler, tozlaşmanın geciktirilmesi, abortif veya ışınlanmış polenlerle tozlama, sıcaklık şokları, değişik kimyasallar, hormon uygulamaları, “X” veya “UV” ışınları ile haploit bitki elde edilebilir.

3. In vitro uyartımla: Androgenez (anter veya mikrospor kültürü) veya gynogenez (ovül kültürü, ovaryum kültürü veya embriyo kurtarma) yöntemleriyle laboratuvar koşullarında da haploit bitki elde edilebilmektedir. *In vitro* uyartım metotlarından androgenezde bitkinin erkek üreme organları (anter veya mikrospor), gynogenezde ise bitkinin dişi üreme organları (ovül veya ovaryum) yapay ortamlarda kültüre alınmaktadır. Her iki yöntemde de temel prensip; normal koşullarda mikrospor veya megaspor hücresinin gametofitik gelişimini durdurarak, çeşitli uyartılar yardımıyla embriyogenik gelişmeye zorlamaktır. Androgenez ve gynogenezden başka, uzak akraba türleri arasındaki melezlemeler ve özel uygulamalara maruz bırakılmış polenlerin tozlaşmada kullanılması sonucunda embriyo kurtarma tekniği ile de haploit bitkiler elde edilebilmektedir (Bal, 2002).

Haploit bitki üretim tekniklerinin kullanımı ile 37 familyanın 88 cinsine ait 247 türde haploit uyartımının sağlandığı bildirilmektedir (Pierik, 1987). Ancak bu teknikler arasında en yaygın olarak kullanılan ve en fazla başarının sağlandığı yöntem anter kültürü olup, bu yöntemle 25 familyanın 134 türünden olumlu cevap alındığı kaydedilmiştir (Bhojwani and Razdan, 1996). Totipotent özellikteki binlerce mikrospora sahip bir anterden, uygun *in vitro* koşullarda çok sayıda haploit bitkinin elde edilebildiği bu teknikte; üretilen bitkilerin kromozom

sayılarının katlanmasıyla dihaploit hale getirilen bitkiler %100 homozigot karakter kazanmakta ve F1 hibrit çeşit ıslahında ebeveyn olarak kullanılabilme şansına sahip olmaktadır (Ellialtıoğlu vd., 2001).

2.7.1. Androgenez Hakkında Temel Bilgi

Bitkilerdeki doku kültürü çalışmalarının temeli, ilk olarak Schwann ve Schleiden'in 1838 yılında totipotensi teorisini öne sürmeleri ile atılmıştır (Pierik, 1987). Genel olarak bitkiler, hücrel totipotensi için olağanüstü bir potansiyele sahiptir. Çekirdeğini muhafaza ettiği sürece, herhangi farklılaşmış bir bitki hücresi, embriyogenik şartlara dönme ve tam olarak yeni bir bitki oluşturma yeteneğindedir. Hücrel totipotensinin en çarpıcı örneklerinden birisi androgenezdir (Reynolds, 1997).

Haploit üretim teknikleri konusundaki ilk çalışma, 1922 yılında Blakeslee ve ark. tarafından *Datura stroamonium* bitkisinde yapılmıştır. Daha sonra, pek çok bitki türünde haploit bitki elde etme amacıyla gerek dişi, gerekse erkek gamet hücreleri kullanılmıştır (Ata, 2011).

Anter kültürü; olgunlaşmamış polenleri içeren anterlerin, tomurcukların içerisinden çıkarılarak, *in vitro* koşullarda yapay besin ortamlarında kültüre alması ve kültür sonucunda olgunlaşan polenlerden haploit embriyolar elde edilmesi işlemidir. Anter kültürü sayesinde, normal koşullarda iki çekirdekli yapıya dönüşmek üzere planlanmış polen tanesinin gametofitik gelişme yönünün; henüz tek çekirdekli dönemdeyken somatik gelişme yönüne doğru çevrilerek 'androgenez' olarak adlandırılan oluşumun gerçekleşmesi işlemidir (Ellialtıoğlu vd., 2012).

Bitkinin erkek üreme organları olan anter veya mikrosporların yapay ortamlarda kültüre alındığı androgenez çalışmalarında ilk başarılı çalışma, Guha ve Maheswari (1964)'nin *Datura innoxia*'nın anter kültüründen embriyo benzeri yapılar belirlemeleri ve iki yıl sonra da bu embriyoidlerin polenlerden meydana geldiğini tespit etmeleri ile gerçekleşmiştir. İlk haploit bitki eldesi ise Nitsch ve Bourgin (1967) tarafından *Nicotiana glauca* ve *N. tabacum* anterlerinde yapılan çalışma sonucunda elde edilmiştir. Androgenez çalışmaları ilk olarak sadece anter

kültürü çalışmaları ile sınırlı iken, ilerleyen yıllarda Nitsch ve Norrel (1973) tarafından ilk kez izole mikrospor kültürü çalışmalarına başlanmıştır. Otuz yılı aşkın bir süredir devam eden androgenez çalışmalarının sonucunda bugün haploit embriyo oluşumunun sağlandığı bitkilerin uzun bir listesi oluşturulmuş, *Nicotiana tabacum*, *Brassica napus*, *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa*, *Triticum aestivum* ve *Zea mays* üzerinde en fazla çalışılan türlerden olmuşlardır (Arı, 2006).

Anter kültürü, kromozom katlaması tekniği kullanılarak haploit bitkilerden stabil ve genetik olarak homozigot diploit bitkilerin eldesinin sağlandığı önemli bir kültür tekniğidir. Pamuk bitkisinde anter kültürü çalışmaları ile ilgili çalışma sayısı sınırlıdır. Upland pamukta anter kültürü çalışmalarında anahtar nokta, anter içerisindeki polen ya da mikrosporların bölünmesidir. Genotip, mikrosporların gelişim aşaması, kültür koşulu gibi pek çok faktör anter kültüründe başarıyı etkilemektedir (Zhu et al., 2011).

Androgenez tekniklerinden olan anter kültürünün aşamaları ise kısaca şöyle özetlenebilir (Arı, 2006):

- Tek çekirdekli mikrospor safhası ve uygun tomurcuk büyüklüğünün tespiti,
- Uygun büyüklükte tomurcuk toplanması ve sterilizasyonu,
- Anterlerin steril koşullar altında kültüre alınması,
- Kültür kaplarının iklim odasına taşınarak kültür süresinin tamamlanması,
- Oluşan embriyoların çimlendirilmesi,
- Bitkiye dönüştürülen haploit bireylerin kromozom sayısının katlanması ve ploidi testlerinin yapılması, anter kültürünün aşamalarını oluşturmaktadır.

2.7.1.1. Haploit hücre yapısı

Androgenezin temeli, haploit hücre kaynağının (mikrospor) varlığına dayanmaktadır. Temel prensip; normal koşullarda erkek gameti oluşturacak olan

mikrospor hücresinin gametofitik gelişimini durdurarak, çeşitli uyarılar yardımıyla embriyogenik aşamada ilerlemeye teşvik edilmesidir. Polen gelişimindeki bu farklı aşamanın daha iyi anlaşılması için kısaca normal polen yapısı incelenmelidir (Arı, 2006).

Normal polen gelişimi iki aşamada gerçekleşir: *Mikrosporogenez* ve *mikrogametogenez*. Mikrospor ana hücresinin oluşumu ve ardından mayoz bölünme sonucunda haploit mikrosporların oluşmasına mikrosporogenez, mikrospordan çekirdek ve hücre bölünmeleri ile sperm hücrelerinin oluşumuna da mikrogametogenez adı verilmektedir (Emiroğlu, 1982). Haploit yapısını detaylı olarak inceleyen ilk araştırmacılar olan Sunderland ve Dunwell (1977)'e göre, mikrosporogenezde; anter lokusu içindeki diploit bir mikrospor ana hücresi, mikrospor tetradı oluşturmak üzere mayoz bölünmeye başlar. Mikrospor ana hücresine ait kalloz duvarının dağılmasıyla serbest hale gelen tetrat sporları; az çok küresel şekilli, ince duvarlı ve çekirdek oranı sitoplazma oranından daha fazla olan bir yapıya sahiptirler. Serbest hale geçen mikrosporlar, vakuol oluşumları nedeniyle hızlı bir şekilde büyür ve her biri dıştan eksin, içten ise intin adı verilen duvarla çevrilir. Vakuol büyüdükçe, merkezde bulunan çekirdek, spor duvarına doğru itilir. Çekirdek bu pozisyonda iken DNA replikasyonuna girer ve büyüklüğünde artış olur. Çekirdek büyüdükçe, RNA ve protein sentezi de gerçekleşir (Arı, 2006).

Mikrogametogenezde ise, her bir mikrosporum devam eden gelişimi ile asimetrik bölünmeye (I. polen mitozu = I. haploit mitoz) giren hücre içindeki tek çekirdek, hücrenin periferik yönüne doğru hareket eder. İki hücreli polen taneciğinin oluşumuyla sonuçlanan bu bölünme sayesinde her biri haploit çekirdeğe sahip ve farklı görevlerden sorumlu küçük bir generatif hücre ile büyük bir vejetatif hücre meydana gelir. Bunlardan vejetatif hücre içerisinde protein, karbonhidrat, lipid ve RNA birikimi gerçekleştirilerek hücrenin enerji deposu oluşturulur. Bu hücre polen tüpünün çimlenmesi ile uzamasını sağlayarak, erkek gametleri embriyo kesesine taşımakla görevlidir. Generatif hücre ise az miktarda depo maddesi taşır, ancak sitoplazması çoğunlukla yoğundur ve birçok çiçekli bitkide elipsoid veya biraz daha uzun şekilli olabilir. Bir tarafı intin tabakasına bitişik olan generatif hücre, diğer taraftan kavisli bir duvar ile vejetatif hücreden

ayrılır. Vejetatif hücredeki gelişim sonucu bu duvarın kalınlığının azalması ile birlikte, generatif hücre intin tabakasından ayrılarak tamamen vejetatif hücre içerisine gömülür. Böylece ‘cell within a cell’ adı verilen ‘hücre içinde hücre’ yapısı oluşur. Vejetatif hücre içindeki generatif hücre, 2 erkek gameti oluşturmak üzere bir kez daha bölünür (II. polen mitozu = II. haploit mitoz) (Arı, 2006).

II. Polen mitozu Gramineae ve Cruciferae gibi familyalarda, I. polen mitozundan hemen sonra gerçekleşirken, Solanaceae ve Ranunculaceae gibi bazı familyalarda ise gecikir ve polen stigma üzerinde çimlenmedikçe bölünme gerçekleşmez. Bundan dolayı polenler, anterden ya iki-hücreli ya da üç-hücreli durumdayken saçılmaktadır (Arı, 2006).

Mascarenhas (1990), normal polen gelişiminin mikrosporogenez aşamasında en az iki gen setinin aktive olduğunu bildirmiştir. Birinci ya da ‘erkenci’ gen seti mayozdan hemen sonra aktif duruma geçer ve polen gelişimi boyunca aktivitesini kaybeder. Bu genlerin ekspresyon yapısı, polen taneciğinin başlangıç gelişimi açısından gerekli olduklarını ortaya koymuştur. İkinci ya da ‘geçici’ genler ise I. polen mitozu aşamasında aktive olurlar ve bunlara ait mRNA’lar çiçeklenme (antesi) döneminde maksimum seviyeye ulaşırlar. Bu genlerin polen olgunlaşması ve çimlenmesinde görev aldıkları düşünülmektedir. Ancak I. polen mitozundan öncesi ve sonrası arasındaki kısa bir zaman diliminde, mikrosporlar potansiyel gametofitik gelişimleri yönünden kararsızdırlar. Polen taneciğinin bu kararsız gelişim periyodu sırasında uygulanacak çeşitli stres faktörleri gametofitik programı engelleyip, sporofitik genlerin ekspresyonunu başlatabilir. Dolayısıyla, polen tanecikleri gametofitik aşamasından, sporofitik gelişim aşamasına geçebilirler. Mikrospor daha sonra doğrudan embriyo oluşturabilmekte (direkt embriyogenez) veya kallus yardımıyla dolaylı şekilde sporofitleri meydana getirebilmektedir (indirekt embriyogenez) (Arı, 2006).

Androgenik embriyoların vejetatif hücreden kaynaklandığı *N. tabacum*’da, I. polen mitozundan sonraki belirli bir sürede büyüklüklerinde artış görülen, asetokarminle daha yoğun boyanan ve vejetatif hücrelerinde nişasta tanecikleri biriken normal polen taneciklerinden başka daha küçük, çekirdekleri daha az belirgin ve sitoplazmaları çok açık renkte boyanan az sayıda farklı taneciklere

rastlanmıştır. ‘Androjenetik tanecikler’, p-tanecikleri veya s-tanecikleri olarak adlandırılan bu taneciklerin sitoplazmalarında az sayıda ribozom bulunurken, mitokondri sayısı fazladır. Bir anter içindeki mikrospor taneciklerinin bu şekilde iki farklı gelişme yapısı göstermesi “polen çift-durumluluğu” olarak adlandırılmaktadır. Polen dimorfizmi olarak da adlandırılan bu durumdaki polenlerin bir bölümü gametofitik yönde gelişip normal polenleri oluştururken, diğer kısmı sporofitik yönde gelişerek embriyo oluşturma yeteneği kazanır. Herhangi bir polen canlılık testinde canlı sayılamayacak ve normalde fonksiyonel olmayan erkek gametofitler şeklinde gelişmesi gereken bu tanecikler, uygun *in vitro* şartların sağlanması durumunda embriyo oluşturmaktadır. İlk olarak *Nicotiana*’da saptanmış olan polen çift-durumluluğu *Paeonia hybrida*, *Hordeum*, buğday ve çeltikte de tespit edilmiştir (Arı, 2006; Ellialtıoğlu vd., 2001).

Horner ve Mott (1979) tarafından gerçekleştirilen çalışmada embriyo oluşturma yeteneğine sahip olduğu düşünülen p-polenlerinin oranı ile kültüre alınan anterlerden elde edilen embriyo sayılarını karşılaştırmışlar ve p-poleni sayısı ile haploid embriyo sayıları arasında çok yüksek oranda bir korelasyon belirlemişlerdir. Gerçekleştirilen başka bir çalışma sonucunda p-poleni oluşumunun bitkide cinsiyet dengesi ile ilişkili olduğu, yetiştirme koşullarının bitkide dişilik yönünden gelişmeyi arttırması durumunda p-poleni sayısının da arttığı ve bu durumun anter kültüründe embriyo rejenerasyonunu arttırdığı belirtilmiştir (Ellialtıoğlu vd., 2001)

Bazı bitkilerin doğal olarak olgunlaşmış anterlerindeki mikrosporlarda bile bu duruma rastlanırken, *Datura innoxia* ve *Hyoscyamus niger* gibi bazı bitkilerde polen embriyogenezi gerçekleşmesine rağmen, polen çift-durumluluğu görülmemektedir. Ancak Bal (2002)’a göre, sitoplazmadaki zayıflama anlamına gelebilecek bu değişimin, bu türlerde görülmemesi, polen çift-durumluluğunun meydana gelmediğinin değil, bunun yerine bu türlerde tespit edilemeyen türden değişimlerin gerçekleştiğinin göstergesi olmaktadır (Arı, 2006).

Raghavan (1978), *Hyoscyamus niger* bitkisinde embriyoid ve anter kalluslarının orijinlerini ve bunların gelişimini incelediği çalışmasında, embriyogenik polen tanelerinin anter lokusu içindeki tapetum çevresinde yer

aldığını, buna karşılık embriyogenik olmayan taneciklerin ise genellikle lokusun iç tarafında toplandığını tespit etmiştir. Ayrıca, tapetum hücrelerinin sahip oldukları bazı teşvik edici maddeler ve özellikler sayesinde gelişmekte olan embriyogenik polen taneciklerinin beslenmesinde ve hücre bölünmesinde çok önemli role sahip olduklarını bildirmiştir (Arı, 2006).

Kim et al., (2004) biber anter kültüründe yaptıkları sitoloji çalışmasında, hem çok hücreli polen tanecikleri ile embriyoların orijinlerini, hem de en uygun mikrospor safhasını belirlemişlerdir. Çalışmada embriyogenik oluşum için iki gelişim aşamasını takip eden mikrosporların ya simetrik bölündüğü ya da vejetatif hücre kaynaklı bölünmeler geçirdiği kaydedilmiştir. Ayrıca, biberde bir anter içindeki mikrospor gelişim aşamalarının güçlü bir asenkronizasyon gösterdiği, bununla birlikte optimum embriyo üretimi için en uygun anter safhasının, % 75’den fazla oranda erken-çift çekirdekli mikrosporları içeren safha olduğu tespit edilmiştir.

2.7.1.2. Androgenik oluşumu etkileyen faktörler

- **Genotip**

Genotip kallus indüksiyonu ve embriyogenezi etkileyen önemli faktörlerden biridir. Zhang et al. (1994), 50 Upland pamuk çeşidinde embriyogenez kapasitesi açısından büyük farklılıklar olduğunu belirlemişlerdir (Zhu et al., 2011).

Bhojwani ve Razdan (1996)’a göre; doğadaki haploidinin, ‘haploit önleyici gen’ olarak da bilinen tek bir gen tarafından kontrol edildiği bilinmekle birlikte, *in vitro* androgenezin de genetik kontrol altında olduğuna ve bu özelliğin androgenik klonlardan androgenik olmayan klonlara aktarılabilmesine dair yeterli kanıt bulunmuştur.

Bullock ve ark. (1982), buğdayda anter kültürüne cevap vermeyen bir seri çeşidin, iyi bir rejenerasyon kapasitesine sahip olan ‘Centurk’ çeşidi ile melezlendikten sonra; bu olumlu özelliğin F1 döllerine aktarılabilmesini ispatlamıştır (Arı, 2006).

Hatipoğlu (1999), buğdayda anterlerden haploit oluşumunun; embriyoid oluşumu, bitki rejenerasyonu ve yeşil/albino bitki oranı gibi birbirinden bağımsız üç kalıtsal karakterin etkisinde olduğunu bildirmiştir. Chupeau et al., (1998), *Solanum tuberosum*'da yaptıkları çalışmada ise androgeneze giriş özelliğinin en az 3 bağımsız gen tarafından kontrol edildiğini ve bu genlerin resesif olduğunu ortaya koymuşlardır.

Mityko et al., (1995), androgenik bitki oluşum sıklığının genotipe bağlı olduğunu ve bunun %0.5-75 arasında değişen oranlarda gerçekleştiğini, bununla birlikte gelişme koşullarının optimize edilmesinin genotip etkisini ortadan kaldırmadığını bildirmişlerdir.

- **Donör Bitkinin Yetiştirme Koşulları ve Fizyolojik Durumu**

Donör bitkilerin yetiştirme koşulları, mikrosporların verimi üzerinde büyük etkiye sahiptir. Sıcaklık, fotoperiyot ve ışık intensitesi değerlerinin uygun olması durumunda başarılı sonuçlar elde edilebilmektedir. Birçok araştırmacının gerçekleştirdiği anter kültürü çalışmalarında; serada yetiştirilen bitkilerin, arazide yetiştirilen bitkilere göre daha yüksek androjenetik performans gösterdiği kaydedilmiştir. Yapılan araştırmalar, erken çiçeklenen genç çiçek tomurcuklarının en fazla androgenik kapasiteye sahip polen taneciklerini içerdiğini ve tomurcukların çiçeklenme periyodunu başında toplanması gerektiğini göstermiştir (Arı, 2006).

Fiziksel faktörler incelendiğinde, somatik kültür için ideal sıcaklığın 28-30°C olduğu, 25°C'nin altındaki sıcaklıklarda kallus rejenerasyonunun çok yavaş gerçekleştiği ve somatik embriyoların eldesinin çok zorlaştığı belirlenmiştir. 30°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda kallusların hızla yaşlandığı da yapılan çalışmalar sonucunda belirlenmiştir (Zhu et al., 2011).

- **Mikrosporların Gelişim Safhası**

Androgenezi etkileyen faktörlerin en önemlilerinden birisi mikrosporların gelişim safhasıdır. Kültür koşulları ne kadar uygun olursa olsun, eğer kültüre alınan mikrospor safhası uygun değilse, gelişme gözlenmemektedir (Arı, 2006).

Anterlerin uygun bir polen gelişme aşamasında seçilmesi en önemli faktörlerden biridir. Tetratlardan iki çekirdekli safhaya kadar olan mikrosporları içeren anterleri kültüre almak daha uygundur. Ancak, mikrosporlar içerisinde nişasta depolanması başladıktan sonra, hiçbir sporofitik gelişme ve daha sonra hiçbir makroskobik yapı oluşumu meydana gelmemektedir. Veriler tek çekirdekli mikrosporların, sadece I. mitoz öncesi ya da I. mitoz süresince kültür için deneysel uygulamalara daha yatkın olduklarını göstermiştir (Chawla, 2002).

Birçok türde bu uygun safha ‘tek çekirdekli mikrospor safhası’ olarak genelleştirilmiş olsa da, farklı türlerde yapılan detaylı çalışmalar bu kritik noktanın; mayoz sonrası tetratların oluşumundan başlayan ve I. mitoz bölünme sonrasındaki nişasta depolanmasından hemen önceki döneme kadar süren bir zaman dilimi içinde olduğunu göstermiştir. Anter safhasını belirlemek için genellikle tomurcuk şekli ve büyüklüğü ile anterin gelişme safhası arasında bir ilişki kurulmaktadır (Arı, 2006).

Zamir et al., (1980)’na göre, mikrospor safhaları ile tomurcuk büyüklüğü arasındaki ilişki, bazı bitkilerde bir anter içindeki mikrosporların aynı gelişim safhasında olmaması nedeniyle her zaman doğru olmayabilir. ‘Asenkronize’ mikrospor gelişimi olarak adlandırılabilen bu yapıyı gösteren türlerde daha ileri dönemde bulunan mikrosporlar ortama toksik madde salgılayarak genç mikrosporların androgenik gelişimlerini baskı altına alabilmektedir (Zamir et al., 1980).

Kott et al., (1988), *Brassica napus*’da değişik mikrospor safhalarını aynı ortamda 24, 48 ve 72 saatten fazla süreyle birlikte kültüre aldıkları çalışmada, embriyogenik ve embriyogenik olmayan mikrosporların birlikte kültüre alınmasının, ortamda toksik etki oluşturduğunu ve embriyo oluşumuna olumsuz etkide bulunduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, bu durumda mikrospor izolasyonundan 24 saat sonra ortamın yenilenmesi önerilmiştir (Kott et al., 1988).

Summers et al., (1992) domates anter kültüründe yaptıkları bir çalışmada, anter uzunluğu ve farklı mikrospor gelişim safhalarının (leptotene, zygotene, metaphase-I, tek çekirdekli ve çift çekirdekli) 3 ayrı genotipteki anter kallus oluşumuna etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada, anter içindeki mikrosporlar ne

kadar erken safhada bulunurlarsa (profaz gibi), o kadar fazla oranda kallus oluştuğu bulunmuştur. Ayrıca, anter alım zamanının androgenik kallusların çap veya sayısına önemli bir etkide bulunmazken, anter veya tomurcuk uzunluğunun bu değerlerler üzerine önemli etkisi olduğu ve uygun mikrospor safhasını belirlemede, anter uzunluğunun tomurcuk uzunluğuna göre daha önemli bir kriter olduğu bildirilmiştir (Summer et al., 1992).

Capsicum annuum'da gerçekleştirilen *in situ* hibridizasyon çalışmalarında, embriyogenez için en uygun dönemin çekirdeğin aktif transkripsiyon özelliklerini gösterdiği zaman olduğu belirtilmiştir (Testillano et al., 1995). Tütünde yapılan bir çalışma, polen taneciklerinin uygulanan ön muameleye göre farklı mikrospor safhalarında embriyogeneze yönlendirilebildiğini ortaya koymuştur. Örneğin, Touraev et al., (1997) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, açlığa maruz bırakıldıklarında çift hücreli polen tanecikleri, sıcaklık şoku uygulandığında ise tek hücreli polen tanecikleri en yüksek androgenez oranını vermiştir (Arı, 2006).

Optimum mikrospor safhası türe, genotipe, donör bitkinin yetiştirme koşullarına veya kullanılan androgenez tekniğine göre değişiklik gösterdiğinden, her genotip için bu konuda bir ön çalışma yapılmalıdır. Bu çalışmalarda kullanılabilecek en basit yöntem, ezme preparatların aseto-karmen (Nitsch, 1981) ya da aseto-orsein ile boyanması yöntemidir. Bu yöntemin verimli olmaması durumunda ise feulgen yöntemi (Darlington and La Cour, 1963), parafinle kesit alma yöntemi (Stösser et al., 1985; Eti, 1987) veya DNA çekirdek boyama yöntemleri olan DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) veya EtBr (Etidium Bromide) ile boyama (Samancı vd., 1998) yöntemlerinden herhangi birisi de denenebilir (Arı, 2006; Ekici, 2006).

- **Kültür Öncesi Uygulanan Ön Uygulamalar**

Polen embriyogenezinin başlatılabilmesi için farklı türlerde birçok temel mekanizma ortaya konmuştur. Yapılan çalışmalara göre bunlar arasından stres uygulamaları, embriyogenezi başlatmada tetikleyici faktör olarak gözükmektedir. Bazı türlerde anterin tomurcuk içerisinden çıkartılarak kültür ortamına yerleştirilmesi bir stres faktörü olarak sayılabilmektedir. Bazı türlerde ise anter

veya polen taneciklerinin kültüre alınmadan önce farklı sürelerde ısı şokları, santrifüjleme, γ -ışınlaması, düşük atmosfer basıncı, yüksek ozmotik basınç, açlık uygulamaları gibi fiziksel veya antimikrotübül ajanları, hormonlar, herbisitler, etanol uygulaması gibi kimyasal stres faktörlerine maruz bırakılması, *in vitro* androjeniz başlatılmasında teşvik edici, hatta zorunlu olmaktadır. Bunlar arasında en yaygın uygulamalar, sıcaklık şokları olup farklı sürelerde düşük veya yüksek sıcaklıkların uygulandığı pek çok çalışma mevcuttur (Arı, 2006).

Bitki çeşidine ve genotipe göre düşük ya da yüksek sıcaklık uygulamaları tüm bitkiye olabileceği gibi sadece anterlere de uygulanabilmekte, birkaç saat ile birkaç gün arasında değişen sürelerde gerçekleştirilebilmektedir (Murovec and Bohanec, 2012).

Bazı bitkilerde düşük (3-7°C), bazı bitkilerde yüksek sıcaklıklar (28-32°C) etkili olurken; bazı bitkilerde ise hem sıcak, hem de soğuk uygulaması sporofitik bölünmeyi başlatabilir (Arı, 2006). Soğuk muamelesinin anter yaşlanmasını geciktirdiği ve anterlerdeki toplam serbest amino asitleri arttırdığı gösterilmiştir (Heberle-Bors, 1985). Bu tür değişiklikler muhtemelen anter duvarı içinde polenler için bir tür mikroklima ortamı sağlamaktadır. Ayrıca soğuk uygulamasının dolaylı etkiye sahip olduğu ve androjenizdeki artışın; yaşlanmayı geciktirmesinden, düşük sıcaklığın polen canlılığını daha uzun süre korumasından ve polenin absorpsiyonunu engelleyerek embriyo oluşturabilecek olan canlı polen sayısını arttırmasından kaynaklandığı ifade edilmiştir (Arı, 2006).

Brassica campestris'te gerçekleştirilen bir çalışmada, 35°C'de 24 saat bekletilen anterlerdeki polen embriyogenez etkinliğinin, kontrol ortamından 20 kat fazla olduğu ortaya konmuştur (Hamaoka et al., 1991).

Bazı bitkilerde düşük doz ışınlama uygulamalarının androjenizi teşvik ettiği bilinmektedir. Bu konuda sıcaklığın tek başına veya düşük doz (2-8 Gy) gama ışını ile birlikte uygulamasının etkilerini görmek için domateste gerçekleştirilen bir çalışmada, 4 Gy gama ışını ile birlikte 10°C de 9 gün sıcaklık uygulaması kombinasyonunun anterlerde en yüksek kallus oluşumunu (%72.7) sağladığı bildirilmiştir (Shtereva et al., 1998).

- **Besin Ortamının İçeriği ve Yapısı**

Normal bir mikrospor, polen aşamasına geçmeden önce 2 mitotik bölünme geçirirken, androjenetik mikrosporlarda tekrarlanan bölünmeler söz konusudur. Bu nedenle, fazladan gerçekleşen bölünmeleri teşvik etmek için besin ortamına eklenen çok sayıdaki bileşen ve bunların miktarı büyük önem taşımaktadır. Besin ortamındaki karbonhidrat ve azot kaynakları ve bunların konsantrasyonları, büyüme düzenleyicileri, katılaştırıcı maddenin tipi yanında, ortamın tipi (katı, sıvı veya 2 fazlı) ve pH'sı üzerinde önemle durulması gereken konulardır (Arı, 2006).

Besin ortamıyla ilgili en önemli faktörlerden biri ortamın ozmotik basıncıdır. *In vitro* androjeniz için besin ortamına eklenecek karbon kaynağının zorunlu olduğu, ilk kez Nitsch (1969)'in tütünde, daha sonra da Sunderland (1974)'in *Datura innoxia*'da yaptıkları çalışmalarla ortaya konmuştur. Androjeniz çalışmalarında besin ortamlarına, sükrozdan farklı olarak galaktoz, mannitol, maltoz, laktoz, glukoz, pikloram gibi maddeler de ilave edilmektedir (Arı, 2006).

Nicotiana tabacum ve *Datura innoxia*'da yapılan çalışmalarla, globular embriyo safhasına kadar sadece karbon kaynağı ve agardan oluşan bir ortamın bile yeterli olabileceği (bu aşamaya kadar gerekli besin elementleri ve hormonların muhtemelen anter duvarı veya polen taneciğinin kendisi tarafından sağlandığı), ancak embriyoların daha ileri gelişimi için besin ortamında mutlaka mineral tuzların bulunması gerektiği ispatlanmıştır (Arı, 2006).

Besin ortamlarındaki mineral maddeler arasında, hücre büyümesi ve morfogenez üzerinde en önemli etkiye sahip elementin büyük ihtimalle azot olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda, besin ortamındaki özellikle amonyum formundaki düşük inorganik azotun androjeniz ve bazı tahıllarda ise yeşil bitki oluşumunu teşvik ettiği belirlenmiştir (Ozias-Akins and Vasil, 1985).

Anter kültürü çalışmalarının büyük çoğunluğunda, kültür ortamlarına ilave edilen büyüme düzenleyicilerinin, embriyo oluşumunu teşvik ettiği bilinmektedir. Hormonlar, anter içerisindeki mikrosporların gametofitik safhadan sporofitik safhaya yönlendirilmeleri aşamasında etki göstermektedirler. İlk anter kültürü

çalışmalarında embriyo uyartımı için ortamlara sadece oksin ilave edilirken, zamanla ‘recalcitrant’ olarak da tanımlanan ‘inatçı’ türlerde yapılan çalışmaların olumsuz sonuçları, araştırmacıları oksinlerle beraber sitokinin kullanımına yöneltmiştir. Çünkü hücrel farklılaşma birçok yönden bu iki grup büyüme düzenleyiciler arasındaki interaksiyonla kontrol edilmektedir (Arı, 2006). Yapılan farklı çalışmaların sonucunda elde edilen bilgiler, embriyogenez başlangıcı için oksinlere ilave olarak sitokinin kullanımının da gerektiğini göstermiştir (Şekil 2.8) (George, 1996) .

Bitki büyüme düzenleyicileri, kallus indüksiyonu ve gelişimi üzerinde etkili olduğu kadar embriyogenez üzerinde de etkilidir. Oksinler incelendiğinde özellikle 2,4-D, kallus indüksiyonunda en etkili büyüme düzenleyici olmasının yanı sıra, embriyogenik kallusların farklılaşmasını da engellemektedir. Düşük konsantrasyonlarda 2,4-D varlığı bile kalluslardan embriyo eldesini zorlaştırmaktadır. Bu durumlarda embriyo eldesinin sağlanması için besin ortamlarına IAA ilave edilmelidir. IAA embriyogenik kalluslardan embriyoların eldesinde son derece etkiliyken, NAA çok düşük etki göstermektedir. Sitokininler incelendiğinde ise, kinetin BAP’a göre daha etkili olmaktadır. Ancak pamuk bitkisinin *in vitro* kültürlerinde kallus indüksiyonu ve somatik embriyogenezin sağlanabilmesi için oksin ve sitokininlerin kombinasyonlarının kullanılması daha uygun olmaktadır (Zhu et al., 2011).



Şekil 2.8. Büyüme ve morfogenez için gerekli oksin - sitokinin konsantrasyonları (George, 1996)

Son yıllarda anter kültürü çalışmalarında olumlu etkisi nedeniyle kullanımı yaygınlaşan bir diğer katkı maddesi ise bir etilen inhibitörü olarak bilinen gümüş nitrattır. Bilindiği gibi bitki doku kültürleri, eksplantın kesilip çıkartılması sırasındaki stres koşulları ve ortamda oksin bulunması nedeniyle etilen üretirler ve üretilen bu etilen somatik embriyogenez, sürgün oluşumu ve kallus gelişimi gibi farklı oluşumları engellemektedir (Arı, 2006).

Androgenez oluşumunu sağlamak için ön uygulamalarda veya normal besin ortamlarında yukarıdaki katkı maddelerinden başka; patates ekstraktı, hindistan cevizi sütü, asparagin, serin, prolin, tiamin hydrochloride, askorbik asit, phenylaseticacid (PAA), Ficoll, Percoll, polyethyleneglycol (PEG) gibi pekçok katkı maddesi de kullanılmaktadır (Arı, 2006).

- **Kültür Koşulları**

Anter veya mikrospor kültürlerinin inkübe edildiği ortamın ışıık tipi, değeri ve sıcaklığı kallus veya embriyo oluşumu üzerinde büyük öneme sahiptir (Arı, 2006). Biber anterlerinde gerçekleştirilen bir çalışmada, kültür öncesi düşük sıcaklık uygulaması yerine, 8 günlük kültürleri karanlıkta ve 35°C de bekletmenin embriyo ve bitki oluşumunu yüksek düzeyde teşvik ettiği ve bu şekilde 100 anterden elde edilen bitki sayısının bazı genotiplerde 50'ye kadar yükseltildiği bildirilmiştir (Abak, 1983). Anterler genellikle karanlıkta ve 20-30°C'ler arasında kültüre alınmakta, rejenere olan bitkiler ise 3.000-10.000 lux yoğunlukta aydınlatılmış koşullara aktarılmaktadır (Arı, 2006).

- **Altkültür sayısı**

Kallus indüksiyonu ve somatik embriyogenez üzerinde etkili parametrelerden birisi de altkültür sayısıdır. Zhang et al. (1993) tarafından pamukta gerçekleştirilen çalışma sonucunda, ilk altkültür süresinin 40 gün olduğu belirlenmiştir. 20 ile 30 günlük kültür süresi aralığında kalluslar çok küçük olduğundan dolayı altkültüre alınmaları durumunda canlılıklarını kaybettikleri bildirilmiştir. Somatik embriyoların kültürde uzun süre altkültüre alınmadan

birakılmaları durumunda ise rejenerasyon kabiliyetlerini yitirebileceklerini bildirmişlerdir (Zhu et al., 2011).

Wang et al. (1994) tarafından pamuğa ait embriyogenik kalluslarda gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise, kültür süresi arttıkça kallus yapısının açık yeşil ya da gri gevşek yapıdan, sarımsı sıkı forma dönüşmüş ve embriyogenez oranı artmış; ancak, kültür süresinin çok uzamasının ardından embriyogenez azalma göstermiştir. Çalışmaya başlanmasından iki buçuk yıl sonra üç farklı kallus gelişimi gözlenmiştir. Birinci tip kallusta yüksek oranda embriyogenez gözlenmiş, ikinci tipte embriyogenez oranı düşük olmuş ve üçüncü tip ise canlılığını kaybetmiştir (Zhu et al., 2011).

2.7.2. Haploit Bitkilerde Kromozom Katlanması

Haploit bitkilerin kromozom sayıları 2 yolla diploit hale getirilebilir:

- **Spontan Olarak:** Spontan olarak elde edilen doubled haploit bitkiler, kromozom katlanması işlemi sırasında gerçekleşme ihtimali olan istenmeyen mutasyonlara yol açmamak adına genellikle daha çok tercih edilir. Embriyo gelişiminin erken aşamalarında iki ya da daha fazla çekirdeğin senkronize bölünmesi sonucunda bir hücre uzantısı gözlenebilir. Bu aşamada kromozom katlanmasının çekirdek füzyonu teorisi ile gerçekleştiği düşünülmektedir. Bu durum hücre duvarının oluşması sırasındaki gecikme gerçekleşmektedir. Çekirdek füzyonu tekniği, triploit rejenerantların varlığı ile de desteklenmektedir. Diğer bir olası mekanizma endomitoz ihtimalidir (Murovec and Bohanec, 2012).

Nicotiana tabacum gibi bazı türlerde, vejetatif çekirdeğin ilk bölünmesi sonrasında, sitoplazmik organellerde dejenerasyon oluşabilir. Böyle durumlarda haploit hücreler genellikle kültür sırasında ‘endomitoz’ yoluyla, yani ‘hücre bölünmesi olmaksızın çekirdek bölünmesi ile hücredeki kromozom sayısının iki katına çıkması’ yoluyla kromozom sayılarını iki katına çıkartabilirler. (Arı, 2006).

- **Antimitotik Özellikli Kimyasal Maddeler Kullanılarak:** Mitoz bölünmenin metafaz safhasında iğ ipliklerinin oluşumunu engelleyen ve dolayısıyla

replikasyona uğramış kromozomların kutuplara çekilmesini önleyerek kromozom sayısının iki katına çıkmasını sağlayan antimitotik etkili kimyasalların, haploit kültür veya bitkiciklere göre değişen süre ve dozlarda uygulanması ile de haploitlerin kromozom sayısı katlanabilmektedir (Arı, 2006).

Kullanılan en yaygın kimyasal olan ve *Colchicum autumnale*'den ekstrakte edilen kolhisin, tubulinleri bağlayarak mikrotübül polimerizasyonunu engellemektedir. Kolhisin, yüksek oranda toksik olması, milimolar düzeyinde çok düşük konsantrasyonlarda kullanılması ve bitki hücrelerindense hayvan hücrelerinde daha etkili olduğu bilinmesine rağmen, en çok kullanılan ajandır. Bununla birlikte, kafein, kloral hidrat, asenaften, sulfinilamid, etil merkuriklorid, azot protoksit, heksaklorosikloheksan, amiprofos-methyl (APM), pronamid, fenridazonpottasium, 2-hidroksinikotinik asit, trifluralin ve oryzalin gibi mutagenler ve herbisitler ile, 2,4-D ve NAA gibi hormonlar da kullanılabilmektedir (Murovec and Bohanec, 2012).

Bu ajanlar, çalışmanın farklı aşamalarında uygulanabilmektedir. Uygulamanın konsantrasyonu ve süresine iki faktör göz önünde bulundurularak karar verilmelidir; doubled haploit bitki ve canlılık yüzdesi. Optimizasyonun gerçekleştirilmeye çalışıldığı durumlarda çok sayıda bitki ile çalışmak daha doğru sonuç vermektedir. Uzun süre uygulanan yüksek dozlar ise tetraploidizasyona yol açmaktadır (Murovec and Bohanec, 2012).

Antimitotik etkili bu kimyasalların uygulama şekli ise hücre süspansiyonuna, besin ortamına, veya eksplantın içinde bulunduğu ön besin ortamı gibi farklı ortamlara, kallus dokusu, aksiller tomurcuk, tepe tomurcuğu ya da *in vitro* bitkicik veya çelikler ve bitki kökü gibi bitkinin çeşitli organlarına göre değişmektedir (Arı, 2006). *In vitro* kültürlerde besin ortamına ilave edilen kolhisinin buğdayda embriyo gelişimi ve yeşil bitki rejenerasyonunu arttırdığı belirlenmiştir (İslam, 2010).

Androgenik tütünde gerçekleştirilen bir çalışmada, dihaploidleri elde etmek için anter kültürünün üç farklı döneminde kolhisin uygulaması gerçekleştirilmiştir. Anterler, kültür öncesi %0,4 kolhisin çözeltisi ile 0, 2, 4, 6, 8, 10 ve 12 saat süreyle muamele edilmiştir. Anterlerin kültüre cevabı, uygulama

süresinin artması ile (12 saat uygulama dışında) azalmış ve en yüksek dihaploidizasyon oranı %27,9 olarak 6 saat uygulamada elde edilmiştir. Kültür boyunca embriyoların gözle görüldüğü anterler, %0,2 kolhisin çözeltisinde ıslatılmış pamuk içerisinde üç gün süreyle bekletilmiş ve ardından taze besin ortamına aktarılmışlardır. Bu uygulamada %60 dihaploidizasyon oranı elde edilmiş, fakat embriyo eldesi oranı düşük olmuştur. 4-8 yapraklı bitkicikler %0,2 kolhisin çözeltisi ile çalkalayıcıda 0, 7, 24 ve 48 saat süreyle muamele edilmiş ve %4,3, %42,3, %37,8 ve %33,3 dihaploidizasyon oranları belirlenmiş ve muamele edilen bitkiler içinde haploit, tetraploit, anöloit, ve miksoploitler de saptanmıştır. Kromozom katlanma oranları ve bitkiciklerin canlılıkları incelendiğinde, denenen üç yöntem arasında bitkicik döneminde 7 saat süreyle %0,2 kolhisin uygulamasının daha avantajlı olduğu tespit edilmiştir (Bürün ve Emiroğlu, 2008).

2.7.3. Ploidi Belirleme

Başarılı bir haploidinin sağlanmasının ardından elde edilen haploitler ile istenmeyen heterozigot dihaploitlerin ayrışması gerekmektedir. Çalışmalar sırasında çeşitli istenmeyen heterozigot bitkilerin eldesi de gerçekleşebilir. Anter kültüründe, anter hücre duvarı gibi somatik hücrelerden yine somatik dokuların rejenerasyonu gözlenebilmektedir. Bu noktada saf haploitlerin güvenli ve hızlı bir teknik ile seçilmesi gerekmektedir. Ploidi seviyesinin belirlenmesinde kullanılan birçok farklı yöntem bulunmaktadır (Murovec and Bohanec, 2012).

Haploit bitki eldesi tekniklerinin uygulanması sonucu elde edilen haploit bitkilerin ploidi düzeylerini (kromozom seviyelerini) tespit etmek için yararlanılan yöntemler; fenotipik gözlemler, flow sitometri (akış sitometrisi), kromozom sayılarının belirlenmesi ve stomal gözlemler olarak sıralanabilmektedir (Arı, 2006).

• **Fenotipik Gözlemler:** Bitkilerin kromozom sayısı arttıkça, bitkilerin organlarında irileşme meydana gelirken, haploit bitkilerin organları da daha küçük yapıda olmaktadır (Babaoğlu ve ark., 2002). Uygulama sırasında ucuz ve masrafsız olan bu yöntemler, yeteri kadar güvenilir değildirler. Bu nedenle,

fenotipik gözlemlerin mutlaka farklı ploidi belirleme yöntemlerinden birisi ile de desteklenmesi gerekir (Arı, 2006).

Fenotipik olarak haploit bitkilerin ayrımının yapılması hızlı ve masrafsız bir yöntem olmasına karşın, güvenilirliği azdır. Bitkilerin fenotipik olarak görünüşlerine bakarak, erkek ve dişi organların gelişmesini, polen oluşup oluşmadığını veya meyve tutup tutmadığını belirleyerek, sadece o bitkinin haploit olma olasılığının yüksek olduğu yönünde bir görüş bildirmek mümkündür, bu görüşü kanıtlamak için mutlaka diğer yöntemlerden biri ile desteklemek gerekmektedir (Ellialtıoğlu vd., 2001).

• **Flow Sitometri (Akış sitometrisi):** Ploidi seviyesinin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerden birisi de akış sitometrisidir. Anter kültürü sonucunda elde edilen bitkiden alınan örnekler DNA içerikleri açısından akış sitometri cihazı ile ölçülürler ve ana bitki ile karşılaştırılırlar (Han and Niimi, 2005).

Hücrelerin tek tek floresans dedektörden geçerken emdikleri ışının analizine dayanan bu yöntemde, floresans boyalarla boyanan hücre çekirdeklerinde çekirdeksel DNA miktarı belirlenmektedir. Her bitki türü için yöntemin optimize edilmesi bir dezavantaj olsa da, kolay, hızlı ve güvenilir sonuçlar vermesi, bu yöntemi en fazla tercih edilen yöntem haline getirmiştir (Arı, 2006).

• **Kromozom Sayılarının Belirlenmesi:** Özellikle kök uçları gibi hızlı büyüyen doku ve organlarda yapılan kromozom sayımları en güvenilir yöntem olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, preparat hazırlığı sırasındaki hidroliz veya boyamaların zaman alması ve tecrübe gerektirmesi, yöntemin dezavantajlarıdır (Arı, 2006). Sağlıklı ve güçlü bir gelişme gösteren taze kök uçlarından, bölünmenin en hızlı olduğu sabah saatlerinde alınan örnekler, kromozom sayımları için en uygun materyallerdir (Ellialtıoğlu vd., 2001).

• **Stomatal İncelemeler:** Haploit bitkilerin stoma yoğunluğu ve bu stomalardaki plastidlerin sayısı diploit veya poliploit bitkilerden farklıdır. Ploidi düzeyi arttıkça, stoma uzunluğu ve plastid sayısı da artmaktadır Farklı bitki türlerinde

stomaların iriliği, dolayısıyla birim alanda bulunan stoma sayısı ile ploidi düzeyi arasında güvenilir ilişkilerin saptanması üzerine, bu yöntem ploidi tespitinde kullanılmaya başlanmıştır. Ancak çeşitli çalışmalar, bu gözlemlerin kesinlikle kromozom sayımı ile de desteklenmesi gerektiğini ortaya koymuştur (Arı, 2006).

Değişik bitki türlerinde stomaların iriliği, dolayısıyla birim alanda bulunan stoma sayısı ile ploidi düzeyi arasında güvenilir ilişkiler saptanmıştır. Ploidi ayırıcı, güvenilir bir yöntem olarak dünya literatüründe yer almıştır. Buna rağmen, çilek gibi poliploidi olgusu yaygın olan bitkilerde kloroplast sayımlarının ploidi belirlemek için yeterli olmadığı, mutlaka kromozom sayımlarıyla desteklenmesi gerektiği vurgulanmıştır (Ellialtıoğlu vd., 2001).

2.8. Pamuk Bitkisinde Gerçekleştirilen Çeşitli Doku Kültürü Uygulamaları

2.8.1. Anter Kültürü Uygulamaları

Baluch (1979), *Gossypium* türleri üzerinde gerçekleştirdiği anter kültürü çalışmasında; *G. hirsutum* L. türünde, *G. arboreum* L. x *G. anomalum* L. ve *G. arboreum* L. x *G. hirsutum* L. melezlerinde geç mayoz safhasından tetrat safhasına kadar farklı gelişme dönemlerinde mikrosporlar içeren anterleri, karbon kaynağı sükroz ve büyüme düzenleyicisi olarak ise 5 mg/L NAA ve 1 mg/L kinetin ilave edilmiş Gresshof ve Doy (1972) besin ortamında kültüre almıştır. Kültüre alındıktan üç hafta sonra beyazımsı kallus oluşumu gözlenmiş ve bu kallusun, mikrospor orijinli olduğu belirtilmiştir. Çalışmada kültüre alınan *G. hirsutum*, *G. arboreum* L. x *G. anomalum* L. ve *G. arboreum* L. x *G. hirsutum* L. melezlerinin anterlerinden kallus oluşumu elde edilirken, *G. herbaceum* L. ve *G. arboreum* L. türlerinin anterlerinden ise kallus elde edilememiştir (Türkoğlu, 2004).

Turaev ve Shamina (1985), pamukta anter kültürü için besin ortamı kompozisyonunu optimize etmek amacıyla gerçekleştirdikleri çalışmada, farklı üç pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) hattının tek çekirdekli dönemde mikrospor içeren anterlerini iki farklı konsantrasyonda (0.1 mg/L ve 2 mg/L) kinetin ve 2,4-D ve iki

farklı oranda (%1 ve %5) glukoz içeren Nitsch ortamlarında kültüre almışlardır. Çalışma sonucunda, kinetinin kallus oluşumu için gerekli olmadığı; ancak diğer faktörlerle kombinasyon halinde iken pozitif etkiler ortaya çıkardığı; 2,4-D'nin, tüm incelenen hatlarda kallus indüksiyonunu sınırlayan özellik gösterdiği, ancak 2 mg/L konsantrasyonunda kallus indüksiyonunda pozitif bir etkiye sahip olduğu; glukozun %3'ü geçmemek üzere gerekli olduğu ve %5-10 glukozda, tüm hatlarda, kallus oluşumunun engellendiği belirlenmiştir. Ayrıca, incelenen hatlar arasında androgenez açısından dikkate değer genotipik farklılık bulunduğu da bildirilmiştir (Türkoğlu, 2004).

Zhang et al., (1996) tarafından yabancı pamuk türü *Gossypium klotzschianum* Anderss'te yürütülen anter kültürü çalışmalarında, tek çekirdekli mikrosporlar içeren anterleri taşıyan tomurcuklara yüzey sterilizasyonu (1 dk %70'lik alkol, 7-10 dk %0.1'lik HgCl₂, 3 kez steril destile su ile yıkama) uygulanmış, anterler farklı besin ortamları içeren kültür kaplarında kallus indüksiyonu için karanlıkta kültüre alınmış ve 30 günlük kültür süresinin sonunda kallus oluşumları görülmüştür. 1 ve 3 mg/L zeatin içeren besin ortamında anterlerde kallus oluşumu gerçekleşmemiş, 7 mg/L zeatin içeren ortamda ise oluşan kallus yavaş gelişmiş ve daha sonra karararak ölmüştür. Anterlerden kallus indüksiyon ve kallus gelişimi için en iyi besin ortamının, 0.1 mg/L 2,4-D ve 0.5 mg/L kinetin içeren MS ortamı olduğu ve bu ortamda kallus indüksiyon oranının %2.45 olarak gerçekleştiği bildirilmiştir. Yüksek konsantrasyonda büyüme düzenleyicilerinin, mikrospor bölünmesi ve kallus gelişimi için avantajlı oldukları, kallusun yaşama şansı ve çoğalmasının büyüme düzenleyicisi çeşidi ve konsantrasyonlarından etkilendiği ve kültür süresinin uzamasının kallus indüksiyon oranını arttırdığı sonucuna varılmıştır.

Anterlerin kültüre alındıktan 50 gün sonra; gri veya kahverengi renkli, gevşek yapılı, yavaş gelişen ve yaşama şansı düşük olan kallus ve grimsi sarı renkli, biraz daha geç ortaya çıkan, ancak daha hızlı gelişen ve yüksek yaşama sansına sahip kallus olmak üzere iki farklı kallus tipi gözlenmiştir. İkinci tip kallusun embriyogenik olduğu ve uygun besin ortamında embriyo üretebildiği yapılan denemeler sonucunda belirlenmiştir. Üretilen embriyolar, MS anorganik maddeleri + B5 vitaminleri + 0.1 mg/L zeatin+0.1 mg/L IAA içeren ortamda kısa

süre içinde bitkiye dönüşmüşlerdir. Rejenerantların kromozom sayısı ile ilgili analiz, bu rejeneratif bitkilerin bazılarının haploit bitkiler olduğunu göstermiştir. Zayıf yapılı olan bu bitkiler kısa sürede ölmüştür (Zhang et al., 1996).

Mavromatis et al. (1998), *G. hirsutum* L. ve *G. barbadense* L. türlerinin çeşitleri ve bunların F1 melezleri ile sürdürdükleri araştırmada, tek çekirdekli dönemdeki mikrosporları içeren anterleri, modifiye edilmiş iki besin ortamının [B5 + 0.1 mg/L 2.4-D + 1 mg/L kinetin + 0.5 mg/L GA₃ ve MS + 0.2 mg/L NAA + 0.5 mg/L BA] üç farklı kültür tipinde (sıvı, katı ve çift fazlı) karanlıkta kültüre almışlardır. Sonuç olarak, kallus gelişiminin genotiplere bağlı olduğu, türler arası F1 melezlerinden elde edilen anterlerin daha iyi gelişen kırılğan kalluslar ürettikleri ve bu tip kallusun fazla sayıda haploit çekirdek içeren hücrelere (%60-72) sahip olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda, kallus gelişiminin, katı besin ortamında sıvı besin ortamına göre daha iyi olduğu, kallus oluşturma oranının %4 – 72.9 arasında değiştiği saptanmıştır. Diğer taraftan, Coker 310 ve Acala-Sindos çeşitlerinin anterleri 0.1 mg/L 2,4-D, 1mg /L kinetin ve 0.5mg/L GA₃ ilave edilmiş katı B5 besin ortamında kültüre alındıklarında embriyoid gelişimleri gözlenmiş, ancak bu embriyoidler daha fazla gelişmemiş ve bitkiye dönüşmemişlerdir.

Zhang et al. (1998a), pamukta anter kültürü yoluyla bitki rejenerasyonu amacıyla gerçekleştirdikleri çalışmada kültür ve yabani pamuk türlerinden 83 genotip üzerinde çalışmışlar, sadece *G. hirsutum* L.'nin Lumian No. 6, Coker 201 ve Siokra 1-3 çeşitlerinden ve yabani bir tür olan *G. klotzschianum* Anderss'ten embriyo ve rejeneratif bitkiler elde etmişlerdir. Araştırmada, *G. klotzschianum* Anderss anterlerinden, 0.1 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L kinetin içeren MS besin ortamında embriyogenik kallus oluşumu meydana gelmiş, *G. hirsutum* anterlerinden ise sükroz içermeyen besin ortamında embriyogenik kallus gelişimi belirlenmiştir. Çalışmada pamuk anter kültüründe hem haploit, hem de diploit hücrelerin oluştuğu, haploit hücre oranının %10 olarak belirlendiği ve rejeneratif bitkilerin bazılarının haploit bitkiler olduğu bildirilmiştir. Pamuk anter kültürlerinden embriyogenik kallus ve haploit bitki elde edilmesinde, genotipin çok önemli olduğu, altkültür sayısının fazlalığının embriyogenik kallus oluşumunu olumsuz yönde etkilediği vurgulanmıştır. Ayrıca, incelenen çeşitli

karbon kaynaklarının embriyogenezi teşvik etmek açısından farklılıklar gösterdikleri belirlenmiş, induksiyonun en kolay amylum (nişasta) kullanımında gerçekleştiği, daha sonra sırasıyla maltozun geldiği, sükroz, glukoz ve laktozun ise etkisiz kaldıkları bildirilmiştir.

Türkoğlu (2004) tarafından, *G. hirsutum* L. türüne ait bazı pamuk çeşitlerinin farklı eksplantlarından organogenez ve embriyogenez yoluyla bitki elde edilmesinde farklı besin ortamlarının etkisi araştırılmıştır. Yedi pamuk çeşidinde (Çukurova 1518, Coker 312, Nazilli 84, Erşan 92, Maraş 92, Adana 98 ve Sayar 314) anter kültürü, 3 pamuk çeşidinde (Çukurova 1518, Coker 312, Erşan 92) organogenez ve somatik embriyogenez çalışmaları yapılmıştır. Anter kültüründe sterilizasyon yöntemi olarak 1 dakika %70'lik alkol içinde çalkalanmış, daha sonra %25'lik sodyum hipoklorit ve birkaç damla Tween 80 içeren çözeltide 15 dakika boyunca sterilize edilmiş ve 5-6 kez steril destile su ile yıkama işlemi uygulanmıştır. Çalışma ilk kallus rejenerasyonları 2,5 aylık kültür sonucunda elde edilmiş ve çok yavaş gelişim gözlenmiştir. Anter kültürü çalışmalarında, Coker 312 dışında kullanılan çeşitlerde, genotiplere ve besin ortamlarına bağlı olarak farklı oranlarda kallus oluşumu gözlenmiştir. En iyi kallus gelişimi Adana 98 (%11.1) ve Ersan 92 (%9.1) çeşitlerinde 0.1 mg/L Kinetin ve 0.1 mg/L 2.4-D veya 0.1 mg/l Kinetin ve 0.5 mg/L 2.4-D içeren MS besin ortamlarında elde edilmiş, ancak kalluslar farklı rejenerasyon ortamlarına aktarıldığında bitki oluşmamıştır. Organogenez çalışmalarında, en yüksek sürgün sayılarının Çukurova 1518 ve Ersan 92 pamuk çeşitlerinde, sürgün ucu eksplantlarında ve 2 mg/L Kinetin ve 2 mg/L BAP içeren MSB (B5 ortamı vitaminlerini içeren MS ortamı) besin ortamında bulunduğu, ancak büyüme düzenleyicisi eklenmemiş MSB besin ortamında kültüre alınan eksplantlardan çoğaltma katsayısı düşük olmakla birlikte, sağlıklı ve kısa sürede köklenen sürgünlerin elde edildiği gözlenmiştir. Somatik embriyogenez çalışmalarında ise; Coker 312 ve Çukurova 1518 çeşitlerinde 0.1 mg/L Kinetin ve 2 mg/L NAA içeren MSB (MS tuzları ve B5 vitaminleri) besin ortamında embriyogenik kalluslar elde edilmiştir. Bu kallusların, büyüme düzenleyicisi içermeyen sıvı besin ortamında kültüre alınmasıyla Coker 312 çeşidinin hipokotil ve 28 günlük embriyolarından ve Çukurova 1518 çeşidinin hipokotillerinden somatik embriyolar oluşmuştur.

Senechal et al. (1994), upland pamuklarında somatik embriyogenezin kalıtımını inceledikleri araştırmalarında; pamukta embriyogenik potansiyel için ıslahın mümkün olduğunu ve bunun donör ebeveyn olarak Coker 312 ile tekrarlanan geri melezleme, kendileme ve seleksiyon döngüsü ile başarılabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca, geri melezlemeler sonucunda düşük frekanslı embriyogenik bitki elde edilmesi nedeniyle, böyle bir seleksiyon programının geri melez generasyonlarında geniş populasyonlar gerektireceği vurgulanmıştır.

2.8.2. Diğer Teknikler

2.8.2.1. Sıvı kültür denemeleri

Finer et al. (1983), pamukta somatik embriyogenez ile ilgili yaptıkları çalışmada, süspansiyon kültürlerinde somatik embriyoit oluşturan kallusların varlığında, 2,4-D konsantrasyonu 0.1 mg/l'den 1 mg/l'ye arttırıldığında, embriyoit gelişiminin arttığını belirtmişlerdir.

Trolinder and Goodin (1988a1), Coker 312 pamuk çeşidinin üç günlük fidelerinin hipokotilleri 0.1 mg/L 2,4-D ve 0.1 mg/L kinetin eklenmiş, 100 mg/L myoinositol, B5 vitaminleri, 30 g/L glukoz, 1.6 g/L gelrite ve 0.75 g/L MgCl₂ içeren MS besin ortamında kültüre almışlardır. Elde edilen embriyogenik kalluslar sıvı besin ortamına aktarılmış; elde edilen globular embriyolar toplanıp, temel besin ortamında yeniden süspansiyon edilmiştir. İçerikleri farklı yarı katı besin ortamları üzerinde tekrar kültüre alınarak, yüksek organik tuz (MS), düşük tuz (2/3 MS) ve ayrıca KNO₃, NAA, GA₃ ve kinetin somatik embriyo olgunlaşması üzerindeki etkileri incelenmiştir. Araştırmacılar, en iyi embriyo çoğalması ve olgunlaşmasının 1.9 g/L KNO₃ içeren MS besin ortamında sağlandığını belirtmişlerdir.

Mishra et al. (2003), gerçekleştirdikleri çalışmada kaliteli embriyogenik süspansiyon kültürlerinin, kirli grimsi yeşil renkli olduklarını ve mikroskop altında incelendiklerinde farklı gelişme aşamalarında bulunan somatik embriyolar içermeleri ile karakterize edildiklerini vurgulamıştır. Araştırmacılar, kallusta ve

embriyogenik kültürlerdeki az miktardaki antosiyanin (kırmızı pigmentasyon) birikiminin ise embriyogenik potansiyelin iyi bir indikatörü olduğunu, somatik embriyoların eş zamanlı gelişmediklerini ve embriyo olgunlaşması için petriye aktarılan hücre sıklığının çok yüksek olmasının embriyogenik olmayan kallus oluşumuna neden olduğunu belirtmişlerdir.

2.8.2.2. Besin ortamı kompozisyonu ile ilgili yapılan çalışmalar

Hemphill et al. (1998), farklı BA konsantrasyonlarının farklı eksplantlarda sürgün oluşumuna etkilerini incelemişler ve 28 günlük fidelerden izole edilen meristem, sekonder yaprak nodu, primer yaprak nodu ve kotiledon nodlarının sürgün oluşturma yeteneklerinin besin ortamındaki BA konsantrasyonuna bağlı olarak değiştiğini, farklı genotiplerden alınan meristemlerin 0.3 μ M BA içeren ortamda sürgün oluşturdıklarını saptamışlardır.

Morre et al. (1998), pamukta sürgün induksiyonu ve bitki rejenerasyonu üzerinde yaptıkları çalışmada, eksplant olarak embriyolar 3 mg/l BA içeren besin ortamında kültüre alındıklarında, ortalama 3,4 adet sürgün elde edildiğini; bu konsantrasyonun altında ve üstünde BA içeren besin ortamlarında ise çok az sayıda sürgün oluştuğunu belirtmişlerdir.

Trolinder and Goodin (1987) tarafından yürütülen bir çalışmada; embriyogenik potansiyel açısından 8 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) genotipi [Coker 312 ve 5110, T25, T169, Paymaster 303 ve 784, RQSX-1-1 (*G. hirsutum* L. x *G. barbadense* L. melezi), Stoneville 213] incelenmiştir. Genotiplere ve büyüme düzenleyicisi konsantrasyonlarına bağlı olarak farklı sayılarda somatik embriyoların elde edildiği çalışmada, Coker 312 genotipi model rejenerasyon sistemi geliştirilmesi için kullanılmak amacıyla seçilmiştir. Petri kutularında steril kurutma kağıdı üzerinde çimlendirilmiş olan 3 günlük *in vitro* fidelerin hipokotil kısımları iki farklı büyüme düzenleyicisinin farklı konsantrasyonlarda (0.1 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L kinetin ve 0.1 mg/L 2,4 D + 0.5 mg/L kinetin) eklendiği, 100 mg/l myo-inositol, B5 vitaminleri, 30 g/L glukoz, 1.6 g/L gelrite ve 0.75 g/L $MgCl_2$ içeren MS besin ortamında kültüre alınmışlardır. Çalışma sonucunda 0.5 mg/L kinetin içeren besin ortamında yüksek embriyogenik kallus oluşumu

gerçekleşmiş, ancak dokular kısa sürede kararmış ve kallus kırılabilirliği 0.1 mg/L kinetin kullanıldığında elde edilen kallustakinden daha az olmuştur. Bu nedenle, daha sonra somatik embriyogenezin induksiyonu için bir standart olarak 0.1 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L kinetin büyüme düzenleyici konsantrasyonu kullanılmıştır. Dört haftalık embriyogenik kalluslar (kırılabilir, açık gri yeşil) süspansiyon ortamına (büyüme düzenleyicileri ve jelleştirici ajan haricinde ilk kültür ortamı ile aynı içerikteki) aktarılmış, çalkalayıcı (120 rpm) üzerinde gelişmeye bırakılmışlardır. 1 aylık kalluslar, transfer edildiklerinde nadiren embriyo içerirlerken, 6 haftalık kallusların ise çok sayıda globular embriyo içerdikleri gözlenmiştir. Ayrıca, embriyogenik kalluslar sıvı kültüre aktarılmadan önce ilk kallus induksiyon ortamında 1 yıla kadar altkültüre alınarak ve hücre süspansiyon kültürleri ise her 3-6 haftada bir yeni sıvı kültüre geçirilerek devam ettirilmişlerdir.

Zimmerman and Robacker (1988), pamuk hipokotilleri ile gerçekleştirdikleri çalışmada; jelleştirici ajan olarak gelrite kullanılan ortamlarda, agar kullanılanlara göre fark edilir oranda fazla sayıda kallus oluşumu gerçekleştiğini belirlemişlerdir. Çalışma sırasında incelenen farklı genotiplerde kallus oluşumu ve çoğalması açısından en iyi besin ortamının MS tuzları, LS organik maddeleri, 0.1 mg/L 2,4-D ve 0.1 mg/L BA içeren ve 2 g/L gelrite ilave edilmiş ortam olduğu belirtilmiştir.

Li et al. (1989), 15 adet *G. hirsutum* çeşidinin hipokotil ve kotiledonlarını, farklı büyüme düzenleyici ilave edilmiş MS besin ortamında kültüre almışlardır. Çalışmada kallusların 6-10 günlük süre içerisinde oluşmaya başladıkları ve morfolojik özelliklerin, çeşitlere ve kullanılan büyüme düzenleyicilerine göre değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. Beyaz, yeşil ve beyaz yoğun kalluslardan embriyo elde edilemezken, 50-60 gün kültürde kalan gri veya yeşilimsi gri kırılabilir kalluslardan embriyoların oluştuğu saptanmıştır. En fazla sayıda embriyo oluşumunun 1.0 mg/L kinetin içeren besin ortamında gözlemlendiği ve embriyoidlerin katı besi ortamında altkültüre alındıklarında 7-10 günde çimlendikleri çalışma sonucunda belirlenmiştir.

Zhang et al. (2001) yaptıkları çalışmada embriyogenez kapasitesinin eksplant tipi ile ilişkili olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca çalışma sonucunda elde

edilen veriler, düşük konsantrasyonlardaki zeatinin embriyogenik kallus indüksiyonunda etkili olduğunu ve 2,4-D'nin embriyogenik kallus proliferasyonunu (çoğaltımını) gerçekleştirdiğini göstermiştir. Ancak 2,4-D, farklılaşma ve somatik embriyoların çimlenmesinde negatif etki de bulunmuştur. Buna ek olarak, aktif karbon ve zeatin ile 3-indolasetik asit (IAA)'ın uygun kombinasyonlarının üretim, olgunlaşma ve somatik embriyoların çimlenmesinde etkili olduğu belirtilmiştir. Embriyogenik kallus proliferasyonunda en etkili besin ortamı, 1 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L kinetin ve 0.5 mg/L zeatin içeren ZH besin ortamı (Zhang et al., 1996) olarak belirlenmiştir. Farklılaşma ve somatik embriyoların çimlenmesi için ise en uygun ortam 1 mg/L zeatin ve 2 g/L aktif karbon içeren MSB ortamıdır. Hipokotil, kotiledon ve kök eksplantlarından somatik embriyogenez ile tam bitki eldesi 3-4 ay sonucunda elde edilmiştir.

2.8.2.3. Kallus kültürleri

Davidonis and Hamilton (1983), Coker 310 pamuk çeşidinin kalluslarından bitki rejenerasyonu sağlanması üzerine yaptıkları çalışmada, eksplant olarak filtre kağıdı üzerinde çimlendirdikleri fidelerden elde ettikleri kotiledonları ve temel besin ortamı olarak ise LS (Linsmaier ve Skoog, 1965) ortamını kullanmışlardır. İlk kültür aşaması için 2 mg/L NAA ve 1 mg/L kinetin içeren besin ortamında kültüre alınan kotiledonlardan, 3 ay sonra yavaş büyüyen, kırılğan, gri renkli kallus gelişimi gerçekleşmiştir. Yavaş büyüyen kallus, 1 mg/L NAA ve 0.5 mg/L kinetin içeren besin ortamında 6-7 haftada bir altkültüre alınmış, granüler açık bej renkli kallus, hızlı büyüyen yeşil kallus, gri kallus olmak üzere üç tip kallus elde edilmiş; tüm kalluslarda az miktarlarda proembrioid oluşumu gözlenmiştir. 2 yıllık pamuk kallusları, büyüme düzenleyicisi içermeyen, 30 g/L glukoz içeren LS besin ortamında 13 hafta geliştirildikten sonra, NAA ve kinetin içeren ve içermeyen modifiye LS besin ortamlarına aktarılmışlardır. Sonuç olarak çalışmada, proembrioid oluşturan kallusların yüzdesinin, NAA ve kin içermeyen besin ortamında %30'a kadar arttığı saptanmıştır.

Finer (1988), Coker 310 pamuk çeşidinin kotiledonlarından elde ettiği kallusları, 0.5 mg/L picloram veya 0.1 mg/L 2,4-D içeren sıvı besin ortamlarında

kültüre almış ve daha sonra embriyogenik süspansiyonun çoğaltılması için 5.0 mg/L 2,4-D kullanmıştır. Embriyogenik doku, oksin içermeyen ve 15 µM glutamin içeren sıvı besin ortamına aktarıldığında embriyoların geliştiği, aynı zamanda erken embriyo gelişiminin oldukça eş zamanlı olarak ortaya çıktığı ve çok sayıda somatik embriyo üretildiğine dikkat çekilmiştir.

Patil and Khadi (1997) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, 10 mg/L NAA ve 1 mg/L BA içeren MS besin ortamının *G. hirsutum* L.'nin Abadhita çeşidinde anter kültürü çalışmalarında kallus indüksiyonu için ideal olduğu belirtilmiştir. 1 mg/L NAA ve 1 mg/L BA içeren besin ortamında altkültüre almadan kallusların devamlılığı 5-6 haftalık süre boyunca devam ettirebilmiştir.

Memon et al. (2010)'nın Reshmi, Rehmani ve TH-3/83 pamuk genotipleri ile gerçekleştirdikleri çalışmada 2,4-D, IAA, IBA ve kinetin 3 mg/L ve 4 mg/L konsantrasyonlarda MS besin ortamına ilavesinin kallus indüksiyonu üzerindeki etkileri incelenmiştir. Çalışma sonucunda 3 mg/L 2,4-D'nin ilave edildiği ortamda 4 mg/L kullanılan ortama göre daha iyi sonuç alınmıştır. 2,4-D'nin konsantrasyondaki artışın kallus indüksiyonunu azalttığı belirlenmiştir.

2.8.2.4. Eksplant tipine göre yapılan çalışmalar

Trolinder ve Goodin (1988b), pamukta eksplant kaynağı ve büyüme düzenleyicilerinin, somatik embriyogenez üzerindeki etkilerini inceledikleri çalışmalarında; Coker 312 pamuk çeşidinin, olgunlaşmış (serada yetiştirilmiş bitkilerden ilk çiçeklenmeden önce alınan yaprak kısımları) ve olgunlaşmamış (3 günlük *in vitro* fidelerden alınan hipokotil eksplantları ve olgun tohumlardan çıkarılan kotiledonsuz embriyolar) dokularından somatik embriyogenez indüksiyonu için uygun besin ortamlarını belirlemeye çalışmışlardır. Denemelerde; 100 mg/L myo-inositol, B5 vitaminleri (Gamborg, 1968), 30 g/L glukoz, 0.75 g/L MgCl₂ içeren ve jelleştirici ajan olarak 1.6 g/L gelrite kullanılmış MS besin ortamı ile büyüme düzenleyicisi olarak ise 2,4-D (0.1, 0.3, 0.5 mg/L), NAA (0.5, 1.0, 2.0 mg/L) oksinleri ve kinetin (0.1, 0.5, 1.0 mg/L), 2iP (0.1, 0.5, 1.0 mg/L) ve BA (0.1, 0.5, 1.0 mg/L) sitokininlerinin kombinasyonları kullanılmıştır. Çalışmada; üç günlük *in vitro* fidelerin hipokotillerinden elde

edilen olgunlaşmamış eksplantlar 0.1 mg/L 2,4-D ve 0.5 mg/L kinetin içeren besin ortamında kültüre alındıklarında, %100'ünde somatik embriyoların oluşabildiği; olgun dokuların olgunlaşmamış dokulara oranla daha zayıf reaksiyon gösterdiği; aynı besin ortamına yaprak dokusu için 1.0 mg/L NAA ve 0.5 mg/L 2iP, sap dokusu için ise 2.0 mg/L NAA ve 0.1 mg/L kinetin içeren ortamlarda somatik embriyolar elde edildiği saptanmıştır.

Sakhanokho et al. (2001), *G. hirsutum* L. çeşidi Deltapine 90 ve *G. barbadense* L. hattı GB-35B126 (P1-528306) ile gerçekleştirdikleri araştırmada; hipokotillerin kotiledonlardan daha fazla kallus ürettiklerini, potansiyel embriyogenik kallusun tanınması ve seleksiyonunun pamuk rejenerasyonunda kritik bir aşama olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmada; hem hipokotil, hem de kotiledonlardan oluşan kallusun, az bir kısmının embriyogenik potansiyel gösterdiği ve bu kallusların zamanında belirlenememesi durumunda sahip oldukları rejenerasyon potansiyellerini kaybedecekleri bildirilmiştir. Ayrıca sıvı kültürde kallus morfolojisi ve renginin sarımsı yeşilden siyaha kadar belirgin şekilde farklılık gösterdiğini ve sıvı kültür aşamasının kültür süresini azalttığını ve kültüre alınan her bir gram dokudan elde edilen embriyo sayısının da arttığını saptamışlardır. Çalışmada değişik tiplerde anormal embriyolar ve bitkicik gelişimleri (kök veya kotiledon taşımayan, sadece kök üretilen kotiledon oluşturmeyen) gözlenmiş, ancak bu tip embriyolardan sağlıklı bitki üretilenmemiştir. Anormal embriyo ve bitki oluşumunun, *G. barbadense* L. hattında (%5 civarında) *G. hirsutum* L. türündekine (%1'den az) oranla daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Hem bir gram embriyogenik kallus başına embriyo sayısı, hem de bir gram embriyogenik kallus başına rejenere olan bitki sayısı açısından, genotipler arasında önemli düzeyde farklılık bulunmuştur. Besin ortamları için, embriyo sayıları açısından önemli düzeyde farklılık bulunurken, bitki üretimi açısından farklılık saptanmamış, bu durumun aşırı kalabalık somatik embriyoların rekabet etkilerinin, somatik embriyolardan elde edilen bitki yüzdesine yansması nedeniyle ortaya çıkabileceği belirtilmiştir.

Zhang et al. (2001) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, Çin'de önemli bir pamuk çeşidi olan Simian-3'de doku kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Hipokotil, kotiledon ve kök eksplantları kullanılarak sadece

zeatin içeren MSB ortamı (MS tuzları ve B5 vitamini) ile kalluslar elde edilmiştir, ancak kallus eldesi yüzdeleri farklılık göstermiştir. Çalışma sonucunda, kotiledon ve kök kısımlarına göre hipokotil kısımlarından daha kısa sürede daha çok kallus elde edilmiştir. 3-5 mg/L zeatin konsantrasyonunun kallus indüksiyonu ve proliferasyonu için uygun olduğu çalışma sonucunda belirlenmiştir. Yetmiş günlük kültür sonucunda embriyogenik ve embriyogenik olmayan iki farklı kallus gelişimi gerçekleşmiştir. 20 günlük kültürde farklı aşamalarda embriyogenik kalluslardan somatik embriyoların gelişimi meydana gelmektedir. Embriyogenik kalluslar hızlı gelişmiş, açık yeşil renkli ve gevşek yapılıdır. Embriyogenik olmayan kalluslar ise yavaş gelişmiş, sıkı yapılı ve açık kahve, krem ya da koyu yeşil renklidir.

2.8.2.5. Genotipin etkilerinin incelenmesi ile ilgili çalışmalar

Trolinder and Xhixian (1989), Coker 312 çeşidi için geliştirilmiş protokol kullanarak, 38 pamuk genotipini somatik embriyogenez tepkisi yönünden incelemişler ve pamuğun *in vitro* rejenerasyonunda genetik komponentlerin kültür komponentlerinden daha fazla öneme sahip olduğunu saptamışlardır.

Gawel and Robacker (1990), pamukta petiol kallus kültürlerinde somatik embriyogenezin genetik kontrolüne yönelik gerçekleştirdikleri çalışmada, üç ticari *Gossypium hirsutum* L. pamuk çeşidi (Acala SJ-5, Coker 312 ve Paymaster 303) ve üç farklı hattın (T1, T25 ve T169) petiol parçalarını, 3 farklı besin ortamında kültüre alarak embriyogenez için değerlendirmişlerdir. Embriyogenik kallus oluşturduğu saptanan T25 ve Coker 312 çeşitlerini embriyogenik kallus oluşturmayan diğer çeşitler (Acala SJ-5, Paymaster 303, T1 ve T169) ile melezleyerek F1, F2 ve BC1 populasyonlarını üretmişlerdir. 4 mg/L NAA, 1 mg/L kinetin, 30 g/L glukoz, 100 mg/L myo-inositol, 2.0 g/L gelrite ve 0.75 g/L MgCl₂ içeren MS besin ortamında embriyogenez için kültüre alınmışlar ve sonuç olarak pamukta somatik embriyogenezin kalıtsal bir özellik gibi davrandığını ve multigenik bir özellik olduğu izlenimi verdiğini bildirmişlerdir.

Wu et al. (1992), farklı konsantrasyonlarda büyüme düzenleyicisinin eklendiği 11 besin ortamı ve 48 pamuk genotipini doku kültürü özellikleri

açısından incelemişlerdir. Çalışma sonucunda kallusların morfolojik özelliklerinin, genotiplere göre farklılık gösterdiği belirtilmiştir. Araştırmacılar, aynı besin ortamında doku kültürüne verilen cevabın 23 genotipte iyi, 17 genotipte oldukça iyi ve 8 genotipte ise zayıf olduğunu saptamışlardır. Aynı zamanda hipokotillerden kallus induksiyonu için optimum büyüme düzenleyicisi konsantrasyonunun 0.1–0.5 mg/L kinetin, 0.1–0.5 mg/L IAA, 0.05–0.1 mg/L 2,4-D ve 0–0.05 mg/l NAA olduğu belirtilirken, 6 genotipin kalluslarından bitki elde edilebilmiştir.

Ghaemi et al., (2011) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ise bazı İran pamuk çeşitlerine (Hashem abad, Kerman, Termez ve Sepid) ait hipokotil eksplantlarında kallus indüksiyonu ve somatik embriyogenez oranı Coker 312 ile karşılaştırılmıştır. Embriyogenik kallusların eldesi için en uygun ortamın B5 vitaminleri ile 0.5 mg/L kinetin ve 0.5 mg/L BA içeren MS besin ortamı olduğu, somatik embriyoların eldesi için ise B5 vitaminleri ile 40 g/L süktroz içeren, büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besin ortamının (NH_4NO_3 yerine iki kat KNO_3 ilave edilmiş) ideal olduğu belirlenmiştir. Genotiplere göre karşılaştırılma yapıldığında; Termez (%22,4-24,4), Hashem abad (%1,85-9,73) ve Sepid (%9,06-22,28) çeşitlerinde Coker312 (%66,66-94,33) çeşidine göre daha düşük embriyogenez oranı göstermiştir. Kerman çeşidinde ise embriyogenez belirlenememiştir. Çalışmada eksplantlar kültüre alındıktan 7-14 gün sonra kallus gelişimleri görülmeye başlanmıştır.

3. MATERYAL METOT

3.1. Materyal

Çalışmada Nazilli Pamuk Araştırma İstasyonu'nda tescil ettirilmiş Özbek-100 ve Nazilli-143 pamuklarına ait tomurcuklar kullanılmıştır.

3.2. Metot

Çalışmada kullanılan anterlerin bir kısmına ön uygulama gerçekleştirilmiştir. Toplanan tomurcuklardan bir kısmı +4°C'de 3 gün bekletilmiş, daha sonra kültüre alınmışlardır. Diğer kısım tomurcuklar ise hiçbir muameleye maruz bırakılmadan Nazilli Pamuk Araştırma İstasyonu'nda sabah saatlerinde toplanmış ve soğuk kalıplar ile taşınarak laboratuvara getirildikten sonra hemen çalışmaya başlanmıştır.

3.2.1. Uygun Tomurcuk Boyutunun Belirlenmesi

Mikroskop altında incelenen preparatlardan, uygun dönemde mikrosporları içerdiği belirlenen tomurcukların boyutu tespit edilmiş, bu boyuttaki tomurcuklardan kültüre alınan anter ile denemeler kurulmuştur.

Uygun mikrosporları içeren dönemi belirlemek üzere, 1 mm ile 7 mm arasındaki tomurcuklar arazide yetiştirilen bitkilerden toplanmış ve boyutlarına göre gruplandırılmıştır. Her bir gruptan alınan tomurcuklar öncelikle kaliks ve korolla kısımlarından ayrılmıştır. Bu şekilde dişi ve erkek organların açığa çıkması sağlanmıştır. Bunun ardından bir bistüri yardımı ile filamentlerin alınmamasına özen gösterilerek anterler bistüri ucuna toplanmış ve lam üzerine aktarılacak asetoorsain boyası yardımı ile ezme preparatlar hazırlanmıştır. Mikrosporların boyanarak bulunduğu dönemin saptanması için bir damla asetoorsein boyası örneğin üzerine damlatılmış ve lam, lamel ile kapatılmıştır. Boyanın fazlasını almak üzere en üste peçete konduktan sonra ince ve sert bir çubuk ile (kibrit çöpü arkası) hızlı ve hafif kuvvetli bir şekilde preparata vurulmuştur. Bu işlem ile anter keselerinin açılarak mikrosporların açığa çıkarak

boyanması sağlanmıştır. Hazırlanmış olan preparat, mikroskop altında incelenmiştir.

Eğer mikroskopta gerçekleştirilen inceleme sonucunda olgun polenlerin varlığı gözlenirse daha küçük boyutlu, tetrat aşamasından önceki aşamaların gözlemlendiği durumlarda ise daha büyük tomurcuklar ile preparat hazırlama işlemine devam edilmesi önemlidir. Tetrat yapının gözlemlendiği tomurcuk boyutu çalışmanın devamında kullanılabilir. Yapılan gözlemler sonucunda 4 mm'lik tomurcuk boyutunda tetrat yapı gözlenmiş ve anter kültürü denemelerine bu boyuttaki tomurcuklar ile devam edilmiştir.

Bu şekilde elde edilen tomurcuk boyutu bilgisi genellenebilmekte ve her çalışma öncesinde yeniden ezme preparat hazırlanmasına gerek duyulmamaktadır.

3.2.2. Anterlerin Kültüre Alınacağı Besin Ortamlarının Hazırlanması

Çalışmada $MgCl_2$, BA ve NAA'nın kallus gelişimleri üzerine etkilerini incelemek amacıyla farklı büyüme düzenleyicisi kompozisyonları içeren MS besin ortamları hazırlanmıştır.

3.2.2.1. Stok çözeltilerin hazırlanması

MS besin ortamının (Murashige & Skoog, 1962), laboratuvarında hazırlanmasını kolaylaştırmak için birbiri ile uyumlu kimyasallar gruplandırılarak stok çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltiler “1 litre besin ortamı için 5 ml stok çözelti” prensibine göre hesaplanmış ve besin ortamları bu kural göz önünde bulundurularak hazırlanmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. MS besin ortamı bileşenleri

MS besin ortamı bileşenleri	Ortamdaki miktarları (mg/L)	100 ml stokta bulunması gereken miktar (g/100 mL)	Stok No
KNO ₃	1900	*	*
NH ₄ NO ₃	1650	33	Stok 1
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	7,4	Stok 2
MnSO ₄ .H ₂ O	16,9	0,338	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	0,172	
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,0005	
H ₃ BO ₃	6,2	0,124	Stok 3
KH ₂ PO ₄	170	3,4	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,005	
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	8,8	Stok 4
KI	0,83	0,0166	Stok 5
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,0005	Stok 6
myo-inositol	100	*	*
Tritriplex (Na ₂ EDTA)	37,3	0,746	Stok 7
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	0,556	
Nikotinik Asit	0,5	0,01	Stok 8
Pridoksin-HCl	0,5	0,01	
Tiamin-HCl	0,1	0,002	
Glisin	2	0,04	Stok 9

*Stok hazırlanmadan tartılarak besin ortamına ilave edilecekler.

3.2.2.2. Besin ortamlarının hazırlanması

Çalışmada, anter kültürü kullanılacak besin ortamı kompozisyonları Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Anter kültürlerinin kurulduğu besin ortamları

Deneme	Ortam Kodu	Büyüme Düzenleyicisi Kompozisyonları
Magnezyum Klorür Denemesi	PTD	0,1 mg/L 2,4-D + 0,1 mg/L KIN
	PTDM	0,1 mg/L 2,4-D + 0,1 mg/L KIN + 1,6 mg/L MgCl ₂ .6H ₂ O
	PT	0,5 mg/L 2,4-D + 0,1 mg/L KIN
	PTM	0,5 mg/L 2,4-D + 0,1 mg/L KIN + 1,6 mg/L MgCl ₂ .6H ₂ O
NAA Denemesi	PN1	0,1 mg/L NAA+ 1 mg/L BA
	PN2	1 mg/L NAA+ 1 mg/L BA
	PN3	5 mg/L NAA+ 1 mg/L BA
	PN4	10 mg/L NAA+ 1 mg/L BA
BA Denemesi	PB1	0,1 mg/L BA + 1 mg/L NAA
	PB2	1 mg/L BA + 1 mg/L NAA
	PB3	5 mg/L BA + 1 mg/L NAA
	PB4	10 mg/L BA + 1 mg/L NAA

Genellikle bitkisel dokuların gelişimi için optimum pH değeri 5.8'dir. Bu sebeple, besin ortamının pH değeri düşük ise 1 N NaOH, yüksek ise 1 N HCl kullanılarak 5.8'e ayarlanmıştır. Jelleştirici ajan olarak kullanılacak olan gelrite besin ortamına %0.3 oranında ilave edilmiş ve ısıtıcılı manyetik karıştırıcı ile ortam tamamen homojen olana kadar kaynatılmıştır. Kaynadıktan sonra besin ortamı kültür tüplerine 10 ml olacak şekilde paylaştırılarak besin ortamı kodlarına göre etiketlemeler yapılmıştır.

Besin ortamlarının sterilizasyonu 121°C'de 1 atm basınçta 15 dakika süreyle otoklavlama ile gerçekleştirilmiştir. Otoklav işleminin ardından steril olan besin ortamları kullanılabilecek kadar uygun şekilde saklanmıştır.

3.2.3. Tomurcukların Sterilizasyonu

3.2.3.1. Hazırlık aşaması

Kabin içerisinde gerçekleştirilen çalışmalarda gerekli ekipmanların sterilizasyonu etüvde gerçekleştirilmiştir. Kullanılan tüm malzemeler alüminyum folyo ile sarıldıktan sonra 170°C'de bir saat süreyle steril edilmişlerdir. Ayrıca

sterilizasyonda durulama amacıyla kullanılan steril sular ise otoklavda 121°C'de 15 dakika'da hazırlanmışlardır.

Sterilizasyonda kullanılmak üzere %70'lik etil alkol ve %0.1'lik HgCl₂ çözeltileri hazırlanmıştır. Ticari olarak satılan etil alkol çözeltisi %100 olduğu için, 70 birim etil alkolün üzerine 30 birim ters osmoz su ilave edilerek sterilizasyon için yeterli %70'lik etil alkol çözeltisi hazırlanmıştır. Toz formunda bulunan HgCl₂'den ise 1 g tartıldıktan sonra 1 L'ye tamamlanarak %0,1'lik çözeltisi hazırlanmıştır. HgCl₂'nin tartım işlemi çeker ocak altında gerçekleştirilmiştir ve eldiven ile çalışılmaya özen gösterilmiştir. Geç çözüldüğü için manyetik karıştırıcı üzerinde iyice karıştırılmış, daha sonra özel olarak işaretlenmiş bir şişede muhafaza edilmiştir.

Sterilizasyona başlamadan önce, arazi koşullarından toplanan tomurcukların en dışta bulunan ve el ile koparmanın mümkün olduğu brakte yaprakları uzaklaştırılmıştır. Laminer akışlı kabin içerisine, %70'lik etil alkol, %0.1 HgCl₂ ve 3 adet saf su ile bistüri ve peçete yerleştirilmiş ve yüzey sterilizasyonunu sağlamak amacıyla 15 dakika süreyle UV altında bekletilmişlerdir.

3.2.3.2. Sterilizasyon aşaması

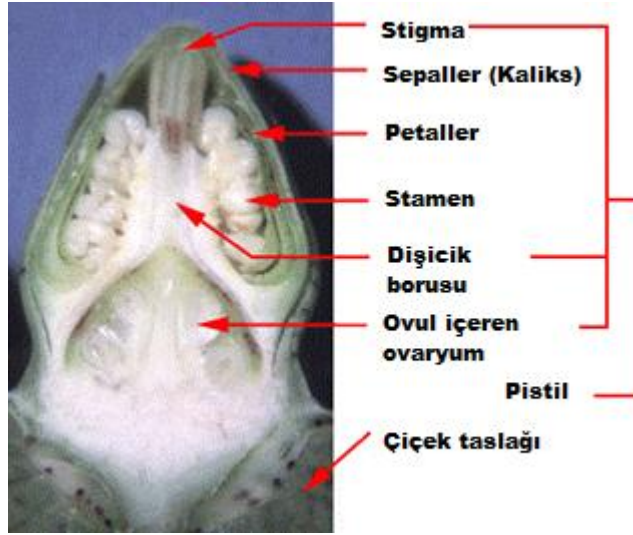
UV sterilizasyonunun bitmesinin ardından tomurcuklar öncelikle %70'lik etil alkolde 1 dakika süreyle çalkalanmış ve ardından steril peçete üzerine alınmışlardır. Bu işlemin ardından tomurcuklar %0.1'lik HgCl₂ solüsyonunda 10 dakika boyunca çalkalanmışlardır. 10 dakika sonucunda tomurcuklar 3 kez steril sudan geçirilerek durulanmış ve en son suyun içinde bırakılmışlardır. Durulama boyunca steril suda yaklaşık olarak bir dakika bekletilmişlerdir.

3.2.4. Anterlerin Kültüre Alınması

Sterilizasyon işleminin tamamlanmasının ardından, etüvde steril edilmiş pens, bisturi, petri kabı, ve peçete ile daha önce hazırlanmış ve otoklavlanmış besin ortamlarının yanı sıra, stereo mikroskop, %70'lik etil alkol ile dış yüzeylerin

spreylenerek kabin içerisine alınmış ve 15 dakika boyunca UV ile sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Çalışma sırasında kabine çok yakın çalışılması gerektiğinden maske, bone ve eldiven kullanılmıştır. Ayrıca kabin içerisinde kullanılan pens ve bistüriler, sık sık %70'lik etil alkole batırılıp alev ocağında yakılmıştır. Bu şekilde düzenli olarak kullanılan ekipmanların sterilizasyonunun devamlılığı sağlanmaya çalışılmıştır.

Steril su içerisinde bekletilen tomurcuklar, öncelikle üzerlerindeki fazla suyu almak için bir steril peçete üzerine alınmışlardır. Daha sonra tomurcuklar, stereo mikroskop altına yerleştirilen steril petri içerisinde, steril bir bistüri yardımıyla sepal ve petallerinden uzaklaştırılmışlardır. Bu işlem sırasında bistürinin çok hassas hareket etmesi gerekmektedir. Pamuk tomurcuğundan alınan yan kesit görüntüsü Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Pamuk tomurcuğunun yan kesit görüntüsü (Anonim, 2014c)

Tüm dış katmanları uzaklaştırılmış tomurcuktan, bisturi yardımıyla, filamentler alınmamaya özen gösterilerek anterler alınmış ve hazırlanan besin ortamlarına aktarılmışlardır.

Anterler kültüre alınırken, tomurcuk boyutu küçük olduğu ve içerisinde çok sayıda anter bulunduğu için stereo mikroskop kullanılmıştır. Tek bir çiçek tomurcuğundan yaklaşık olarak 80-100 adet anter kültüre alınabilmektedir. Bir kültür kabında çok sayıda anter bulunmasının rekabete yol açarak gelişimi

yavaşlatmamak için her bir kültür tübüne 20-40 adet arasında anter konulmaya özen gösterilmiştir.

Kültüre alınan anterler iki farklı kültür koşulunda büyümeye bırakılmışlardır. Kültüre alınan anterlerin bir kısmı 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyotta (3500 lux altında) ve 24°C sıcaklıkta, diğer kısmı ise sürekli karanlıkta muhafaza edilmişlerdir.

3.2.5. Gözlem parametreleri

Bu işlemlerin hepsi hem Nazilli-143 hem de Özbek-100 çeşitleri için ayrı ayrı, soğuk ön uygulamalı ve ön uygulamasız, karanlık/aydınlık koşullar altında çeşitli parametreler ele alınarak gerçekleştirilmiştir.

Anter kültürü çalışmalarında aşağıdaki parametreler incelenmiş ve elde edilen kallsular altkültüre alınmışlardır.

1. Sterilizasyon yüzdesi (%),
2. Embriyo oluşturan anter oranı (%),
3. Kallus oluşturan anter oranı (%),
4. Elde edilen kallusların renkleri (%),
5. Kararan anter yüzdesi

3.2.6. Kallusların Altkültüre Alınması

Anter kültürü çalışmaları sonucunda elde edilen kalluslar literatür araştırmaları ile belirlenen ve PKB5 olarak kodlanan, B5 (Gamborg, 1972) besin ortamına ait vitamin kompozisyonunun yanı sıra, 1.6 g/L $MgCl_2 \times 6H_2O$, 0.1 mg/L 2,4-D ve 0.1 mg/L kinetin büyüme düzenleyicileri içeren, karbon kaynağı olarak %3 sükroz ve jelleştirici ajan olarak %0.7 plant agar kullanılan MS besin ortamında altkültüre alınmışlardır. Altkültüre alınan kallusların gelişimleri, 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyotta (3500 lux altında) ve 24°C sıcaklıkta incelenmiştir.

3.2.7. Sıvı Kültür Denemelerinin Kurulması

Karbon kaynağının kalluslarda embriyogenez üzerine etkilerini incelemek üzere sıvı kültürler kurulmuştur. Kullanılan besin ortamı kompozisyonları Çizelge 3.3’de verilmiştir. Tüm besin ortamlarında Stok 1 (NH_4NO_3) ortama ilave edilmemiş ve 3,8 g/L KNO_3 kullanılmış, bu karışım “TO” olarak kodlanmıştır.

Çizelge 3.3. Sıvı kültürlerde kullanılan besin ortamı kompozisyonları

Ortam Kodu	Besin Ortamı Kompozisyonu
MPG	TO + 5 g/L glukoz
MPM	TO + 5 g/L maltoz
MPSA	TO + 5 g/L sükroz
MPS	TO + 30 g/L sükroz
MS	MS besin ortamı + 30 g/L sükroz

Besin ortamı daha önce anlatıldığı şekilde hazırlanmış, ancak pH ayarlandıktan sonra agar eklenmeden şişeye konmuştur. Şişenin ağzı otoklav sonrasında sıkışmaması için tamamen kapatıldıktan sonra bir tur döndürülerek açılmış ve ağız kısmı alüminyum folyo ile sarılmıştır. Sterilizasyon için 121°C ’de 1 atm basınçta 15 dakika süreyle otoklavlanmış ve otoklavdan sonra kapağı iyice sıkıştırılarak buzdolabında $+4^\circ\text{C}$ ’de muhafaza edilmiştir.

Çalışmaya başlamadan önce etüvde steril edilmiş erlen ve beherler ile tartım sırasında kullanılacak steril petriler, hassas terazi ile birlikte %70’lil etil alkol ile silinerek kabine alınmış ve 15 dakika UV ile steril edilmişlerdir. Sterilizasyon işlemi tamamlandıktan sonra sıvı kültürlerin kurulması işlemine başlanmıştır.

Çalışma hacmi olarak 50 mL, 100 mL ve 250 mL’lik farklı boyutlarda erlenler kullanılmıştır. Erlenler ağız kısımlarına çok sıkı olmayacak, ancak gevşek de olmayacak şekilde pamuk yerleştirildikten ve üzeri iki kat alüminyum folyo ile sarıldıktan sonra 170°C ’de etüvlenerek steril edilmişlerdir. Erlenlerde uygun çalışma hacmi 1/5 olarak ayarlandığı için (besin ortamındaki çözünmüş oksijen

konsantrasyonunun dengelenmesi adına), 50 mL'lik erlene 10 mL, 100 mL'lik erlene 20 mL ve 250 mL'lik erlene 50 mL besin ortamı ilave edilmiştir. Kallus miktarları besin ortamının %5'i olarak 10 ml besin ortamı için 0,5 g, 20 mL besin ortamı için 1 g ve 50 mL besin ortamı için 2 gr olacak şekilde tartılmıştır.

Sıvı kültüre alınacak kallus miktarını ayarlamak için, hassas terazi üzerine steril petri konulmuş ve darası alınmıştır. Seçilen kültür kabındaki kallus, petriye alınmış ve belirlenen miktarda olacak şekilde ayarlanmıştır. Sıvı hacimlerin ayarlanması için etüvlenmiş beherler kullanılmıştır. Erlenlerle çalışılacağı sırada, kontaminasyon riskini önlemek adına erlenin ağzında bulunan pamuk, erlenin içine bakan kısmına dokunulmadan folyonun içine yerleştirilmiştir. Erlenin ağız kısmı iyice alevden geçirildikten sonra, uygun besin ortamından kullanılacak miktar beherle ayarlanmış ve ardından ağız kısımları birbirlerine dokundurulmadan erlene aktarılmıştır. Tartılmış olan kalluslar da steril pens ile bu erlene aktarılmıştır. Erlenin ağız kısmı iyice alevden geçirilmiş, pamuk ve folyo yeniden ağız kısmına kapatılmıştır. Erlen, kabinden çıkarılarak etiketleme yapılmıştır.

Tüm kültürler hazırlandıktan sonra erlenler çalkalayıcıya yerleştirilmiş ve 100 rpm'de sürekli çalkalanarak gelişmeye bırakılmışlardır. 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyodunda 3000 lux ışık altında 24°C'de kültür koşullarında gözlemler yapılmıştır.

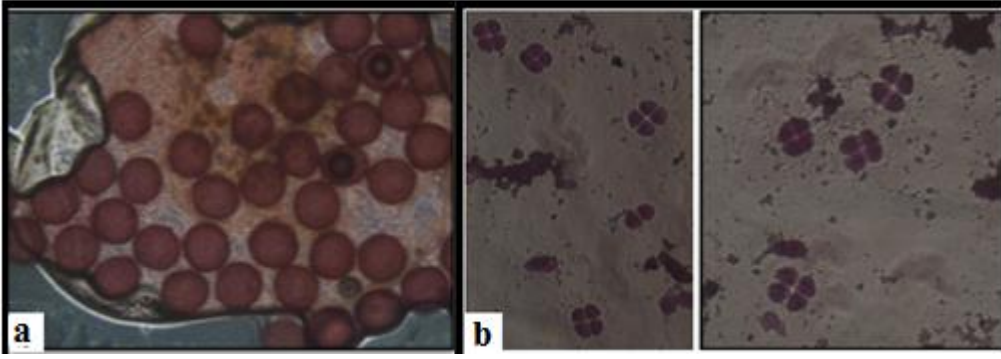
3.2.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Çalışma süresinde yapılan uygulamalar, tesadüf parselleri deneme deseni esas alınarak üç tekerrürlü olarak düzenlenmiştir. Elde edilen veriler, TARİST istatistik programı (Açıkgöz vd., 2004) kullanılarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Uygun Tomurcuk Boyutunun Belirlenmesi

Tomurcuklar boyutlarına göre sıralanıp ezme preparat hazırlanması ve mikroskopta gerçekleştirilen gözlemler sırasında ilk olarak 7 mm'lik tomurcuklar ile preparat hazırlanmış ve olgun çiçek tozu (polen) görülmüştür (Şekil 4.1a). Bunun ardından 4 mm'lik tomurcuklarla ezme preparat hazırlanmış ve tetrat aşamasındaki mikrosporlar gözlenmiştir (Şekil 4.1b).



Şekil 4.1. Ezme preparatlardan elde edilen mikroskop görüntüleri. a) Polen safhası b) Tetrat safhası

4.2 Sterilizasyon Başarısının Belirlenmesi

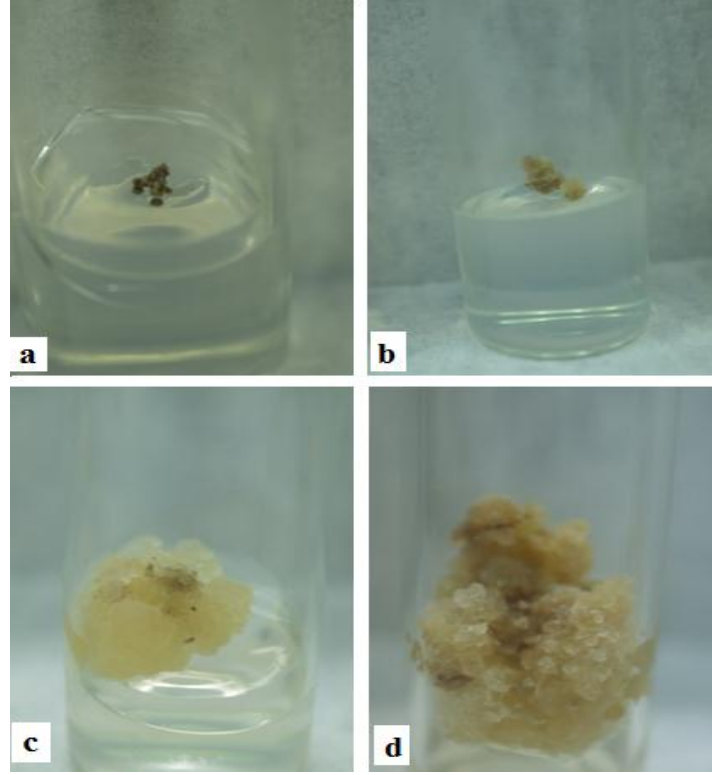
Çalışma sırasında tek bir sterilizasyon prosedürü uygulanmıştır. Tomurcuklar öncelikle %70'lik etil alkolde 1 dakika süreyle çalkalanmış, ardından %0.1'lik $HgCl_2$ solüsyonunda 10 dakika boyunca bekletilmiş, 3 kez steril sudan geçirilerek durulanmıştır. Kültüre alınan tüm anterler göz önünde bulundurulduğunda kontaminasyon yüzdesi %1,7 olarak belirlenmiştir.

4.3. Kallus Rejenerasyon Oranlarının Karşılaştırılması

Denemelerde elde edilen veriler; besin ortamı, kültür koşulu (aydınlık ya da karanlık), ön uygulama (+4°C'de 3 gün süreyle bekletme) ve çeşit (Özbek-100 ve Nazilli-143) gibi parametrelere göre gruplandırılarak karşılaştırılmışlardır.

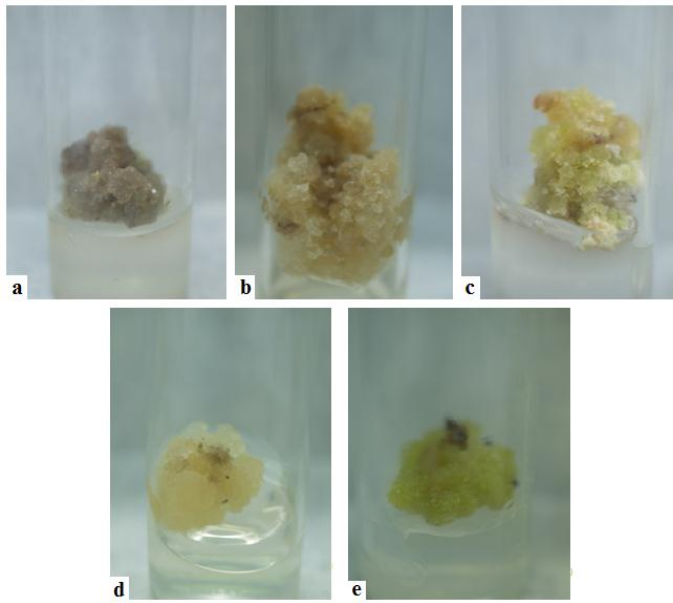
Kültüre alındıktan 7 gün sonra anterlerde kararmalar görülmeye başlamıştır. Yaklaşık 14 gün sonucunda anterlerden kallus başlangıçları stereo mikroskop ile tespit edilebilir hale gelmiştir. Kültürün 21. gününde kalluslar gözle görülebilir

şekilde gelişmişlerdir. Kültürün 60. gününde ise embriyo oluşumları stereo mikroskop kullanılarak incelenmiştir (Şekil 4.2) ve elde edilen tüm embriyoların globuler safhada oldukları gözlenmiştir.



Şekil 4.2. Kültüre alınan anterlerde kallus gelişim aşamaları: a) Kültüre alındıktan sonra 7 gün içinde kararan anterler b) Kültürün 14. gününde kallus rejenerasyonlarının başlaması c) Kültürün 21. gününde görülen yoğun kallus yığınları d) Kültürün 60. gününde embriyo gelişimi görülen kallus yığını

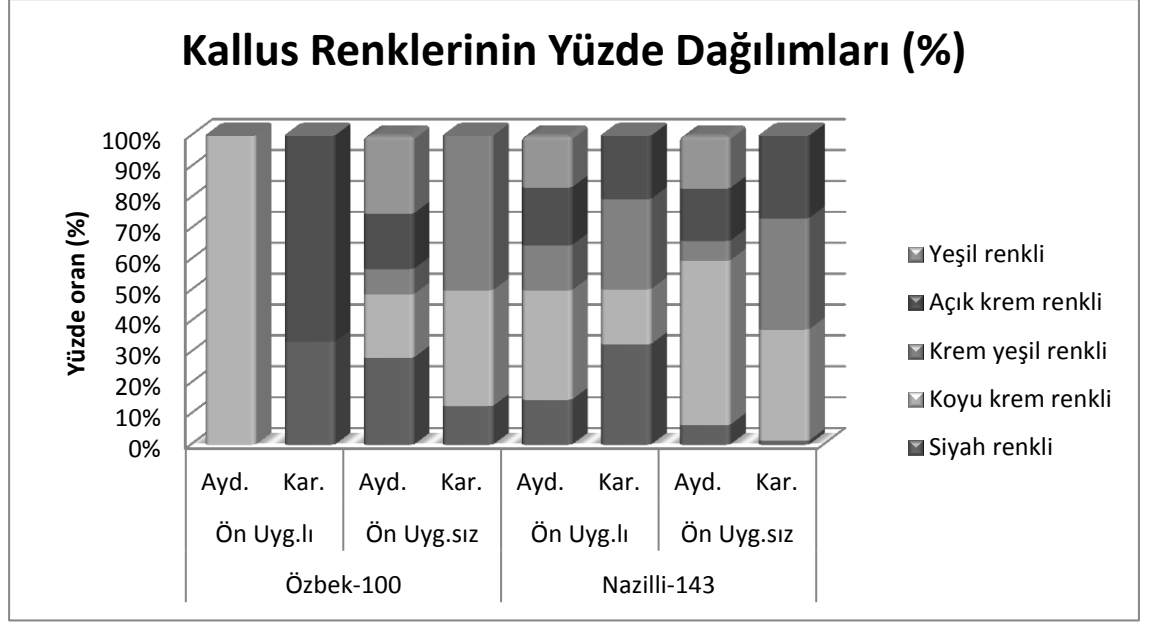
Elde edilen kalluslar genel olarak gevşek yapılı ve kırılgan nitelikte olmuştur. Anterlerden gelişen kalluslar renk açısından 5 grupta toplanmıştır (siyah, koyu krem, krem yeşil, açık krem, yeşil renkli) (Şekil 4.3). Ön uygulamanın varlığı ve kültür koşulları kallusların renkleri üzerinde etkili olmaktadır. Bu koşullara göre yüzde (%) olarak kallusların renk dağılımları Çizelge 4.1 ve Şekil 4.4’de verilmiştir. Elde edilen kallusların çoğunluğu (%37.5) koyu krem renkli olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.3. Kallusların renklerine göre gruplandırılması. a) Siyah renkli kalluslar b) Koyu krem renkli kalluslar c) Krem-yeşil renkli kalluslar d) Açık krem renkli kalluslar e) Yeşil renkli kalluslar

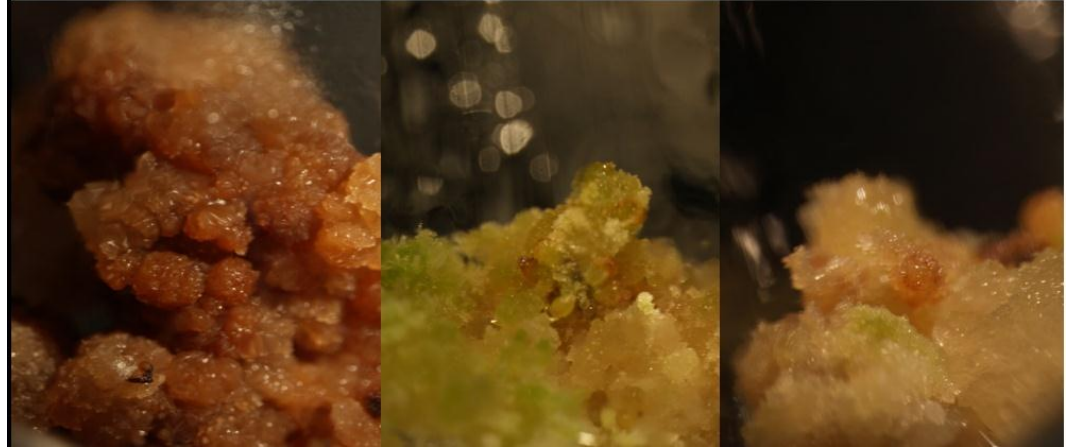
Çizelge 4.1. Kallus renklerinin yüzde dağılımları.

[illegible]



Şekil 4.4. Kallus renklerinin yüzde dağılım grafiği

Anterlerin kültüre alınmasından sonra kallus rejenerasyonlarının başlaması sırasında kırmızılıklar belirlenmiştir. Yüzde olarak veriler değerlendirildiğinde; en fazla (% 7.8), Nazilli-143 çeşidinde ön uygulama gerçekleştirilen ve aydınlık koşullarda gelişen kalluslarda kırmızılıklar gözlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.5. Farklı kallus yapılarında görülen kırmızılıklar

4.3.1. Özbek-100 Çeşidinde Ön Uygulamanın Kallus Rejenerasyonu Üzerine Etkileri

Özbek-100 çeşidinde ön uygulama yapılan (3 gün + 4°C’de bekletme) ve yapılmayan anterlerle farklı besin ortamı kompozisyonlarında kurulan anter

kültürlerinin, fotoperiyot koşullarında (16 saat aydınlık/8 saat karanlık) kültürlerinin gerçekleştirilmesi sonucunda, kallus rejenerasyonu görülen anter yüzdeleri ile ilgili bilgiler Çizelge 4.2’de gösterilmiştir. Ön uygulama yapılan anterlerde kallus rejenerasyonu görülen anter yüzdesi %44.3 şeklinde olurken, ön uygulama yapılmayanlarda ise %48.37 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2). LSD sınıflandırmasına göre kallus oluşumunun en fazla (%100) olduğu ön uygulamalı PB2 ortamı 1. grupta yer alırken, ön uygulama gerçekleştirilen ve gerçekleştirilmeyen çalışmalarda PB4 ortamı son grupta yer almıştır. Ayrıca yapılan varyans analizi sonucunda besin ortamı ve besin ortamıyla ön uygulamanın interaksiyonunun kallus rejenerasyonu görülen anter sayıları üzerine etkileri incelendiğinde, istatistiki değerlendirmeye göre %1 düzeyinde önemli bulunmuştur. Ancak; ön uygulamanın tek başına etkisi önemli bulunmamıştır (Çizelge 4.3) (Şekil 4.6; Şekil 4.7).

Çizelge 4.2. Özbek-100 çeşidinde ön uygulamaya göre anterlerin fotoperiyot koşullarında farklı kompozisyonlarda besin ortamlarında kültüre alınmasından 60 gün sonra gelişen kallus sayıları (adet)

Besin Ortamı	Ön Uygulamalı				Ön Uygulamasız				ORT.
	Kallus Oluşturan Anter Yüzdesi (%)				Kallus Oluşturan Anter Yüzdesi (%)				
	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.	
PTD	80	75	82	79.00 b	54	53	54	53.67 c	66.33
PT	40	46	39	41.67 d	58	55	63	58.67 bc	50.17
PTM	45	48	42	45.00 d	34	36	36	35.33 d	40.17
PN2	53	56	53	54.00 cd	74	75	76	75.00 a	64.5
PN3	25	60	8	17.67 e	78	70	79	72.33 ab	44.99
PB1	55	70	59	61.33 c	44	69	48	53.67 c	57.5
PB2	100	100	100	100.0 a	73	59	59	63.34 abc	81.67
PB3	0	0	0	0.00 f	24	33	13	23.33 d	11.66
PB4	0	0	0	0.00 f	0	0	0	0.00 e	0
ORT.				44.3				48.37	

*Kültüre alınan anter sayısı tekrerr başına 100’dür.

** Besin ortamı için HKO değeri 48.543; LSD değeri 11.146, ön uygulama için HKO değeri 48.543; LSD değeri 5.958, besin ortamı*ön uygulama HKO değeri 48.543; LSD değeri 15.762’dür.

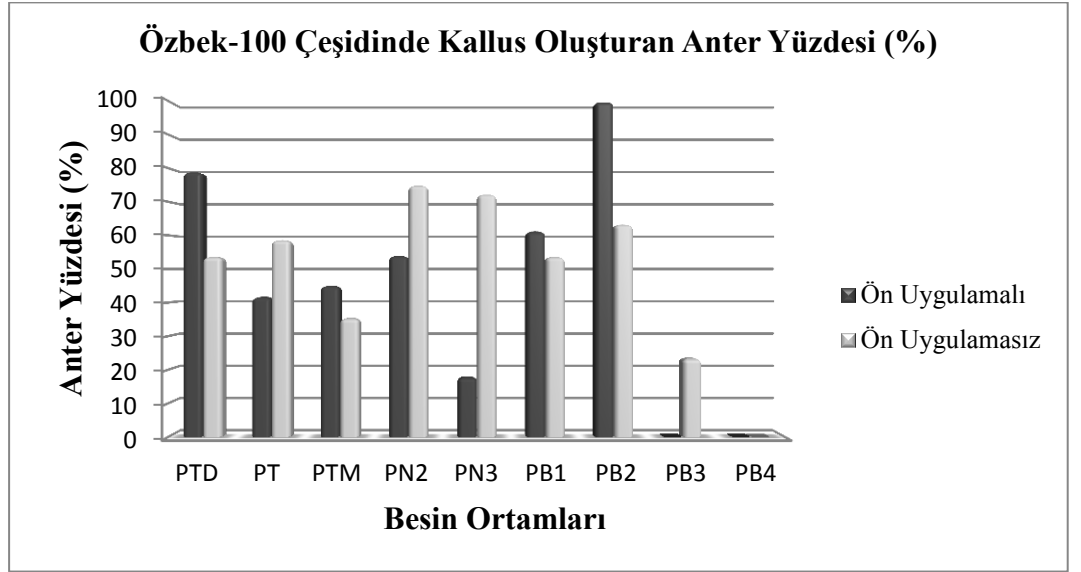
Çizelge 4.3. Özbek-100 çeşidinde ön uygulamaya göre anterlerin fotoperiyot koşullarında farklı kompozisyonlarda besin ortamlarında kültüre alınması sonucunda kallus rejenerasyonu görülen anter yüzdeleriyle ilgili varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
Besin ortamı	8	10721.078	1340.135	27.607**	2.310	3.260
Ön uygulama	1	69.667	69.667	1.435ns	4.210	7.680
Besin Ortamı*Ön uygulama	8	8679.166	1084.896	22.349**	2.310	3.260
Hata	27	1310.667	48.543			
Genel	44	20780.578	472.286			

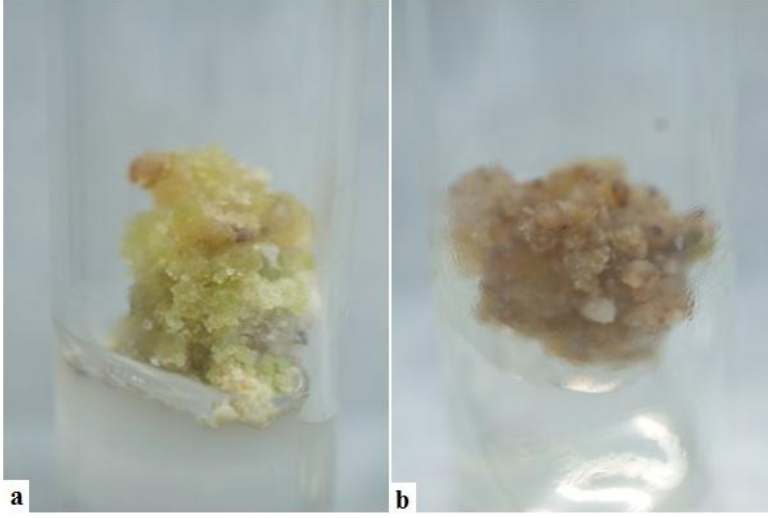
*= $\alpha:0,05$ önemlilik düzeyi

**= $\alpha:0,01$ önemlilik düzeyi

ns= anlamsız



Şekil 4.6. Özbek-100 çeşidinde ön uygulamaya göre fotoperiyotta farklı besin ortamlarında kallus oluşturan anter yüzdesi (%)



Şekil 4.7. Özbek-100 çeşidinde ön uygulama durumuna göre elde edilen kalluslar. a) Ön uygulamalı anterlerden gelişen kalluslar b) Ön uygulamasız kültüre alınan anterlerden gelişen kalluslar

4.3.2. Özbek-100 Çeşidinde Kültür Koşullarının Kallus Rejenerasyonu Üzerine Etkileri

Çalışmada farklı kompozisyonlardaki besin ortamlarında kültüre alınan anterlerin bir kısmı karanlık koşullarda gelişmeye bırakılırken, diğer bir kısmı fotoperiyot (3500 lux 16 saat aydınlık/ 8 saat) koşullarında tutulmuşlardır. Bu koşullarda gerçekleşen kallus rejenerasyonlarına ait veriler Çizelge 4.4'te gösterilmiştir. Fotoperiyot koşullarında kültüre alınan anterlerde, kallus rejenerasyonu görülen anter yüzdesi %48,37 iken, karanlık koşullarda kültüre alınanlarda bu değer %42.66 olmuştur. LSD sınıflandırmasına göre kallus oluşumunun en fazla (%95) olduğu karanlık koşullardaki PB1 ortamı 1. grupta yer alırken, fotoperiyot koşullarındaki PB4 ortamı son grupta yer almıştır. Ayrıca yapılan varyans analizi sonucunda besin ortamı, kültür koşulu ve besin ortamı*kültür koşulu interaksyonunun kallus rejenerasyonu görülen anter sayıları üzerine etkileri incelendiğinde, istatistiki değerlendirmeye göre her üçü de %1 düzeyinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.5) (Şekil 4.8; Şekil 4.9).

Çizelge 4.4 Özbek-100 çeşidinde farklı kompozisyonlarda besin ortamlarında kültüre alınmasından 60 gün sonra fotoperiyot ve karanlık kültür koşullarında kallus rejenerasyonu görülen anter yüzdesi (%)

Besin Ortamı	Fotoperiyot				Karanlık				ORT
	Kallus Oluşturan Anter Yüzdesi (%)				Kallus Oluşturan Anter Yüzdesi (%)				
	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.	
PTD	54	53	54	53.67 bc	87	90	63	80.00 a	66.83
PT	58	55	63	58.67 ab	60	45	44	49.67 b	54.17
PTM	34	36	36	35.33 d	0	0	0	0.00 c	17.66
PN2	74	75	76	75.00 a	42	44	48	44.67 b	59.83
PN3	78	60	79	72.00 ab	51	63	58	57.33 b	64.66
PB1	44	69	48	53.67 bc	91	97	97	95.00 a	74.33
PB2	73	59	59	63.67 ab	60	53	50	57.33 b	60.5
PB3	24	33	13	23.33 d	0	0	0	0.00 c	11.665
PB4	0	0	0	0.00 e	0	0	0	0.00 c	0
ORT				48.37				42.66	

* Kültüre alınan anter sayısı tekrerr başına 100'dür.

**Besin ortamı için HKO değeri 71.444; LSD değeri 13.650, kültür koşulu için HKO değeri 71.444; LSD değeri 6.825, besin ortamı*kültür koşulu için HKO değeri 71.444; LSD değeri 19.304'dir

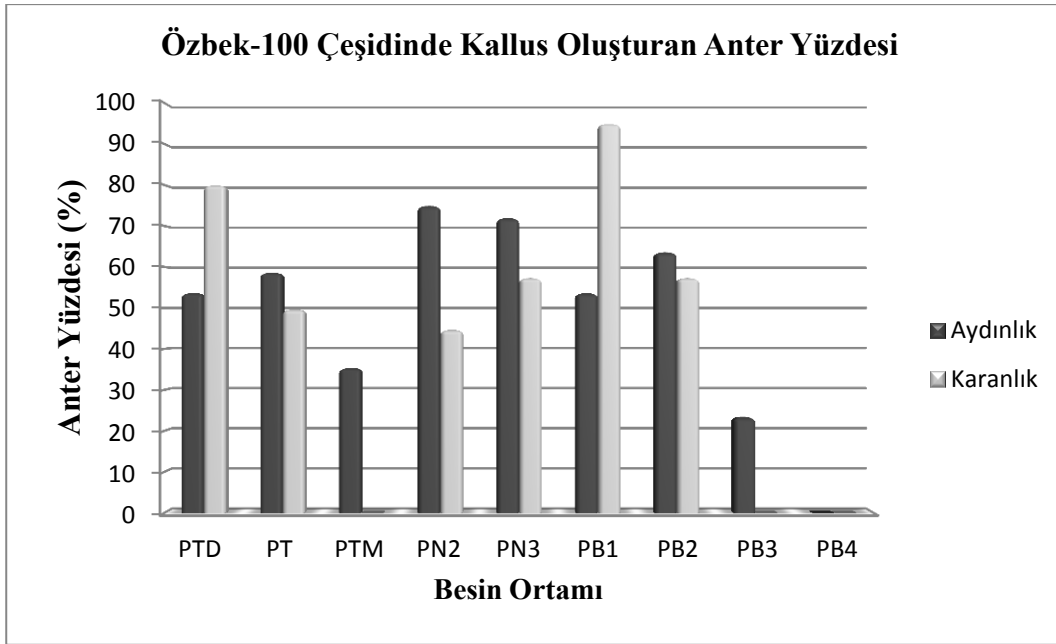
Çizelge 4.5. Özbek-100 çeşidine ait anterlerin, karanlık ve fotoperiyot koşullarında farklı besin ortamlarında kültüre alınması sonucunda kallus rejenerasyonu görülen anter yüzdeleriyle ilgili varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
Besin ortamı	8	7592.476	949.060	13.284**	2.360	3.360
Kültür Koşulu	1	848.643	848.643	11.878**	4.260	7.820
Besin Ortamı*Kültür koşulu	8	4709.190	588.649	8.239**	2.360	3.360
Hata	24	1714.667	71.444			
Genel	41	14864.976	362.560			

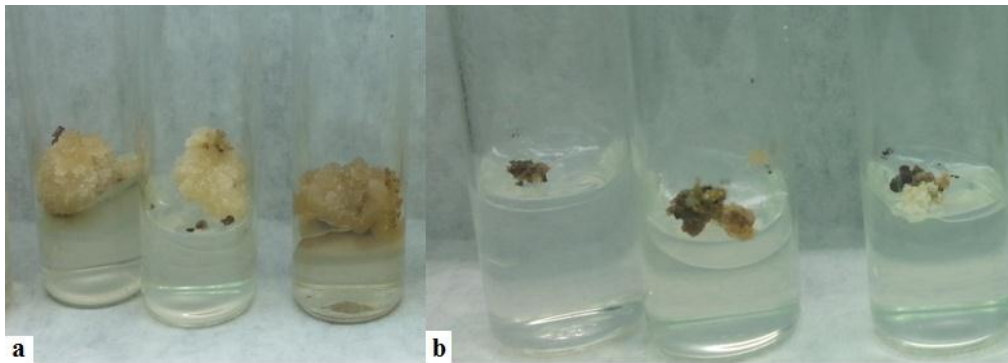
*= $\alpha:0,05$ önemlilik düzeyi

**= $\alpha:0,01$ önemlilik düzeyi

ns= anlamsız



Şekil 4.8. Özbek-100 çeşidinde fotoperiyot ve karanlık kültür koşullarında farklı besin ortamlarında kallus oluşturan anter yüzdesi (%)



Şekil 4.9. Özbek-100 çeşidinde farklı kültür koşullarında kültüre alınan anterler. a) Karanlık koşulda gelişen kalluslar b) Fotoperiyot koşulunda gelişen kalluslar

4.3.3. Nazilli-143 Çeşidinde Kültür Koşullarının Kallus Rejenerasyonu Üzerine Etkileri

Çalışmada Nazilli-143 çeşidine ait anterler farklı besin ortamlarında kültüre alınmış, karanlık ve fotoperiyot koşulları olmak üzere iki farklı kültür koşulunda gelişimleri gözlenmiştir. Gerçekleşen kallus rejenerasyonlarına ait veriler Çizelge 4.6'de verilmiştir. Aydınlık koşullardaki kültür süreci sonunda kallus rejenerasyonu görülen anter sayısı ortama olarak %26.62 olarak belirlenirken, karanlık koşullarda bu değer %38.52 şeklinde olmuştur (Çizelge 4.6). Yapılan varyans analizi sonucunda besin ortamı ve kültür koşulunun yanı sıra, besin

ortamı*kültür koşulu interaksiyonları istatistiki değerlendirmeye göre %1 düzeyinde anlamlı bulunmuştur (Çizelge 4.7). LSD sınıflandırmasına göre yapılan analiz sonucunda karanlık koşulda PB2 besin ortamı en fazla (% 100) kallus oluşturan anter yüzdesi ile 1. grupta yer almıştır. Kültür koşullarına göre karşılaştırma yapılırsa; karanlık koşul (%38.52), fotoperiyot koşuluna göre (%26.62) daha başarılı sonuç vermiştir. İki koşulu beraber incelendiğinde en başarılı sonuç, PB2 besin ortamında kültüre alınan ve karanlık koşulda kültürü gerçekleştirilen anterlerden (%100) elde edilmiştir (Çizelge 4.6) (Şekil 4.10; Şekil 4.11).

Çizelge 4.6. Nazilli-143 çeşidine ait anterlerin farklı besin ortamlarında kültüre alınmasından 60 gün sonra fotoperiyot ve karanlık kültür koşullarında kallus gelişimi görülen anter yüzdesi (%)

Besin Ortamı	Fotoperiyot				Karanlık				ORT.
	Kallus Oluşturan Anter Yüzdesi (%)				Kallus Oluşturan Anter Yüzdesi (%)				
	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.	
PTD	21	20	20	20.33 b	69	51	64	61.33 b	40.83
PTDM	26	18	25	23.00 b	0	0	0	0.00 d	11.5
PT	20	23	21	21.33 b	35	26	38	33.00 c	27.16
PB1	97	97	94	96.00 a	70	73	83	75.33 b	85.66
PB2	22	34	21	25.67 b	100	100	100	100.00 a	62.83
PB3	0	0	0	0.00 c	0	0	0	0.00 d	0
PB4	0	0	0	0.00 c	0	0	0	0.00 d	0
ORT.				26.62				38.52	

*Kültüre alınan (anter sayısı) tekerrür başına 100'dür.

** Besin ortamı için HKO değeri 38.256; LSD değeri 10.756, kültür koşulu için HKO değeri 38.256; LSD değeri 6.803, besin ortamı*kültür koşulu için HKO değeri 38.256; LSD değeri 15.211'dir.

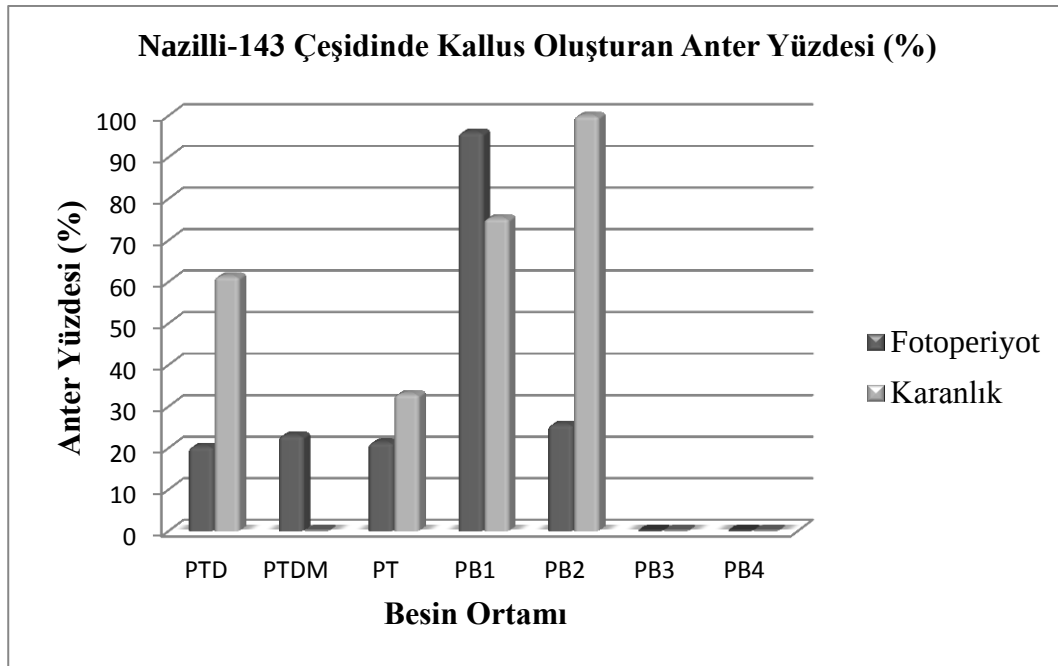
Çizelge 4.7. Nazilli-143 çeşidine ait anterlerin, karanlık ve fotoperiyot koşullarında farklı kompozisyonlarda besin ortamlarında kültüre alınması sonucunda kallus rejenerasyonu görülen anter yüzdesiyle ilgili varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
Besin ortamı	6	14428.167	2404.694	62.857**	2.920	4.620
Kültür Koşulu	1	6060.150	6060.150	158.409**	4.670	9.070
Besin Ortamı*Kültür koşulu	6	5594.350	932.392	24372**	2.920	4.620
Hata	13	497.333	38.256			
Genel	26	26580	1022.308			

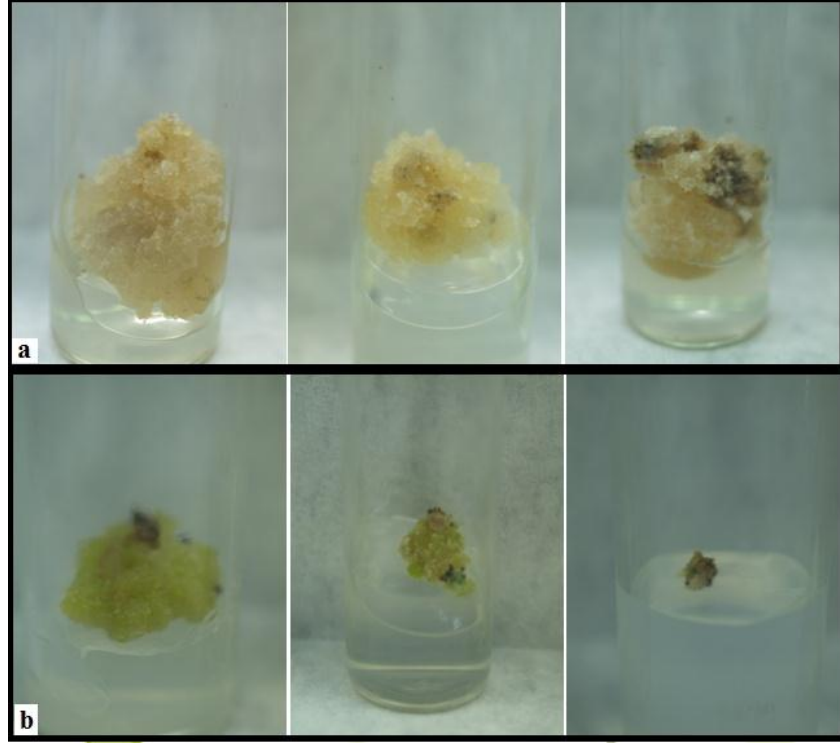
*= $\alpha:0,05$ önemlilik düzeyi

**= $\alpha:0,01$ önemlilik düzeyi

ns= anlamsız



Şekil 4.10. Nazilli-143 çeşidinde farklı kompozisyonlardaki besin ortamlarında kültür koşullarına göre kallus rejenerasyonu gerçekleşen anter yüzdesi (%)



Şekil 4.11. Fotoperiyot ve karanlık koşullarda Nazilli-143 çeşidinin anterlerinden gelişen kalluslar.
a) Karanlık koşullarda gelişen kalluslar b) Fotoperiyot koşullarda gelişen kalluslar

4.3.4. İki Çeşidin Farklı Besin Ortamları ve Ön Uygulamanın Yapılması Durumunda Kallus Oluşturan Anter Sayılarının Karşılaştırılması

Özbek-100 ve Nazilli-143 çeşitlerine ait anterlerin belirli bir kısmına ön uygulama gerçekleştirilmiş ve farklı büyüme düzenleyicisi konsantrasyonlarında hazırlanmış besin ortamlarında kültüre alınmışlardır. Aynı zamanda ön uygulama gerçekleşmemiş anterlerin de aynı besin ortamları içerisinde kültürlü gerçekleştirilmiştir. Tüm eksplantlar fotoperiyot koşullarında gelişmeye bırakılmıştır. Bu koşullarda kallus rejenerasyonu gerçekleşen anter yüzdelere ait veriler Çizelge 4.8’de verilmiştir. Özbek-100 çeşidinde ön uygulama gerçekleştirilen anterlerin kültüründe kallus rejenerasyonu gözlenen anter yüzdesi ortalama olarak %60.4 olarak belirlenirken, ön uygulamanın gerçekleştirilmediği kültürlerde bu oran %58 olarak gerçekleşmiştir. Nazilli-143 çeşidinde ise ön uygulamanın gerçekleştirilmesi durumunda %36.66 olarak belirlenen kallus oluşturan anter yüzdesi, ön uygulamanın gerçekleştirilmediği durumda %38.2 şeklinde belirlenmiştir (Çizelge 4.8). Besin ortamı, kültür koşulu ve çeşit

parametrelerinin tek başına interaksiyonlarının yanı sıra, besin ortamı*ön uygulama, besin ortamı*çeşit, ön uygulama*çeşit ve besin ortamı*ön uygulama*çeşit interaksiyonları arasında gerçekleştirilen varyans analizi sonucunda, istatistiki değerlendirmeye göre ön uygulama ve ön uygulama*çeşit interaksiyonları anlamsız bulunmuştur. Diğer tüm interaksiyonlar %1 düzeyinde anlamlıdır (Çizelge 4.9). Besin ortamları karşılaştırıldığında en fazla kallus rejenerasyonu görülen ortam PB1 (%63.16) olarak belirlenirken, PTM besin ortamında en düşük değer (%36.58) elde edilmiştir. Çeşide göre karşılaştırma yapıldığında Özbek-100 besin ortamında en fazla kallus oluşturan anter yüzdesi (%59,2) elde edilirken, Nazilli-143'de bu değer daha düşük (%37.43) olarak gözlenmiştir (Çizelge 4.8) (Şekil 4.12; Şekil 4.13).

Çizelge 4.8. Nazilli-143 ve Özbek-100 çeşitlerine ait anterlerin ön uygulama durumuna göre farklı besin ortamlarında kültüre alınmaları sonucunda kallus rejenerasyonu görülen anter yüzdesi (%)

Besin Ortamı	Özbek-100								Nazilli-143								ORT.
	Kallus Oluşturan Anter Yüzdesi (%)								Kallus Oluşturan Anter Yüzdesi (%)								
	Ön Uygulamalı				Ön uygulamasız				Ön Uygulamalı				Ön uygulamasız				
	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.	
PT	40	46	39	41.67 d	58	55	63	58.67 b	71	77	76	74.67 a	20	23	21	21.33 cd	49.08
PTM	45	48	42	45.00 cd	34	36	36	35.33 c	58	54	45	52.33 b	14	13	14	13.67 d	36.58
PN2	53	56	53	54.00 bc	74	75	76	75.00 a	15	23	17	18.33 d	35	32	36	34.33 b	45.41
PB1	55	70	59	61.33 b	44	69	48	57.33 b	38	42	34	38.00 c	97	97	94	96.00 a	63.16
PB2	100	100	100	100.00 a	73	59	59	63.67 b	0	0	0	0.00 e	22	34	21	25.67 bc	37.66
ORT.				60.4				58				36,66				38,2	
ORT.	59.2								37.43								

*Kültüre alınan anter sayısı tekerrür başına 100'dür.

**Besin ortamı için HKO değeri 23.967; LSD değeri 5.405, çeşit için HKO değeri 23.967; LSD değeri 3.418, besin ortamı*çeşit*ön uygulama için HKO değeri 23.967; LSD değeri 10.810'dir.

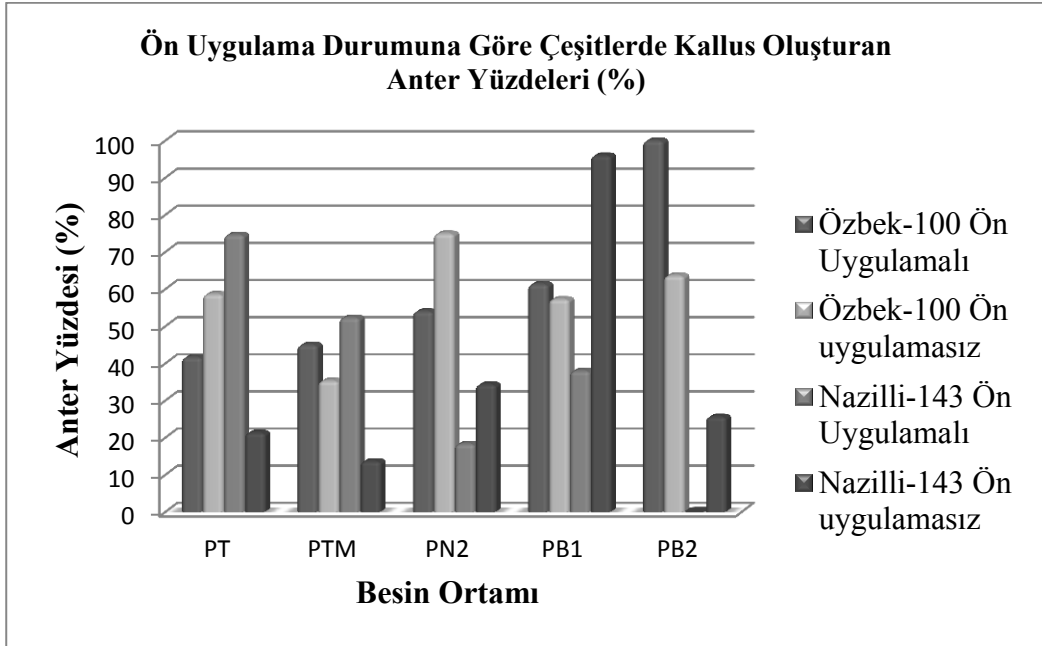
Çizelge 4.9. Nazilli-143 ve Özbek-100 çeşitlerine ait anterlerin ön uygulama durumuna göre anterlerin farklı besin ortamlarında kültüre alınmaları sonucunda kallus rejenerasyonu görülen anter yüzdeleri ile ilgili varyans analizi sonucu

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
Besin ortamı	4	4417.9	1104.475	46.084**	2.610	3.830
Ön Uygulama	1	2.817	2.817	0.118ns	4.080	7.310
Besin Ortamı*Ön Uygulama	4	6038.433	1509.608	62.998**	2.610	3.830
Çeşit	1	7106.817	7106.817	296.529**	4.080	7.310
Besin Ortamı*Çeşit	4	11890.767	2972.692	124.034**	2.610	3.830
Ön Uygulama*Çeşit	1	58.017	58.017	2.421ns	4.080	7.310
Besin Ortamı*Ön Uygulama*Çeşit	4	10067.567	2516.892	105.016**	2.610	3.830
Hata	40	958.667	23.967			
Genel	59	40540.983	687.135			

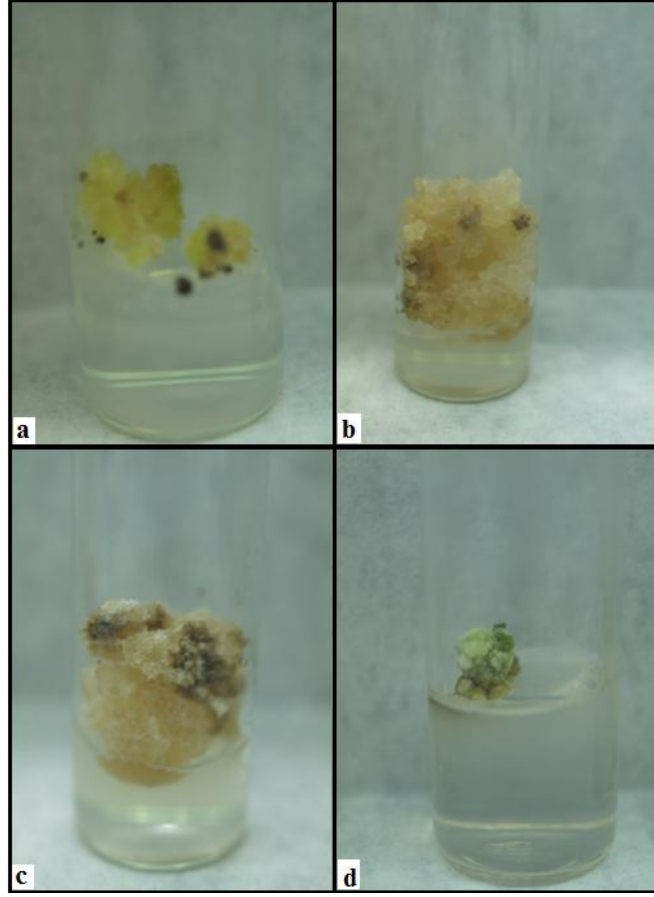
*= $\alpha:0,05$ önemlilik düzeyi

**= $\alpha:0,01$ önemlilik düzeyi

ns= anlamsız



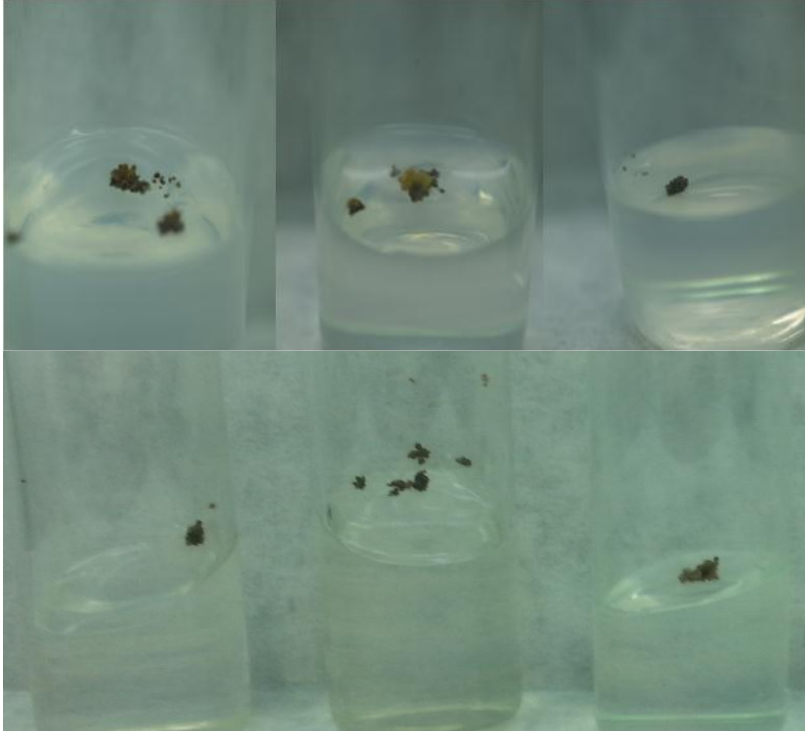
Şekil 4.12. Ön uygulama durumuna göre farklı kompozisyonlardaki besin ortamlarına göre kallus rejenerasyonu gerçekleşen anter yüzdesi (%)



Şekil 4.13. Özbek-100 ve Nazilli-143 çeşitlerinde ön uygulamalı ve ön uygulamasız kültürlerde gelişen kalluslar: a) Ön uygulama yapılmış Özbek-100 anterinden gelişen kallus b) Ön uygulama yapılmamış Özbek-100 anterinden gelişen kallus c) Ön uygulama yapılmış Nazilli-143 anterinden gelişen kallus d) Ön uygulama yapılmamış Nazilli-143 anterinden gelişen kallus

4.4. Kararma Oranlarının Karşılaştırılması

Farklı kültür koşullarında, farklı besin ortamı kompozisyonlarında ve ön uygulama yapıp yapılmaması durumuna göre anterlerde görülen kararmalar (Şekil 4.14) belirlenmiş ve durumlar kendi içlerinde istatistiki olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.14. Kararma gösteren anterler

4.4.1. Özbek-100 Çeşidinde Ön Uygulama Yapılmasının Kararma Üzerine Etkileri

Çalışmada, farklı kompozisyonlardaki besin ortamlarında kültüre alınan Özbek-100 çeşidine ait anterlere yapılan ön uygulamaların kararma üzerine etkileri incelenmiştir. Tüm eksplantlar aydınlık koşullarda gelişmeye bırakılmıştır. Bu çalışmaya ait veriler Çizelge 4.10'da verilmiştir (Şekil 4.15). Ön uygulamanın gerçekleştirilmesi durumunda, kararan anter yüzdesi %47.92 iken, ön uygulamanın gerçekleştirilmediği durumda % 66.11 olmuştur (Çizelge 4.10). Gerçekleştirilen LSD analizine göre kararma en fazla (%86.83) PB3 besin ortamında gözlenmiş, en az ise PB2 ortamında %18 olarak belirlenmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda besin ortamının ve besin ortamı*ön uygulama interaksiyonlarının kararma üzerine etkisi %1 değerinde anlamlı bulunurken, ön uygulama değerlendirmede anlamsız bulunmuştur (Çizelge 4.11) (Şekil 4.15; Şekil 4.16).

Çizelge 4.10. Özbek-100 çeşidinde ön uygulama durumlarına göre anterlerin farklı kompozisyonlarda besin ortamlarında kültüre alınmasından 60 gün sonra gözlenen kararın anter yüzdeleri (%)

Besin Ortamı	Ön Uygulamalı				Ön Uygulamasız				ORT.
	Kararan Anter Yüzdesi (%)				Kararan Anter Yüzdesi (%)				
	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.	
PTD	80	71	69	73.33 b	47	48	44	46.33 c	59.83
PT	74	83	68	75.00 b	78	73	78	76.33 b	75.66
PTM	55	61	57	57.67 bc	78	78	80	78.67 b	68.17
PN2	49	47	47	47.67 c	27	29	31	29.00 c	38.33
PN3	0	0	0	0.00 d	76	87	81	81.33 ab	40.66
PB1	6	11	20	12.33 d	51	89	81	73.67 b	42.99
PB2	0	0	0	0.00 d	41	46	21	36.00 c	18
PB3	100	100	100	100.00 a	86	83	52	73.67 b	86.83
PB4	68	78	50	65.33 bc	100	100	100	100.00 a	82.66
ORT.				47.92				66.11	

*Kültüre alınan anter sayısı tekrür başına 100'dür.

** Besin ortamı için HKO değeri 88.844; LSD değeri 14.965, ön uygulama için HKO değeri 88.844; LSD değeri 7.999, besin ortamı*ön uygulama HKO değeri 71.444; LSD değeri 19.304'dir.

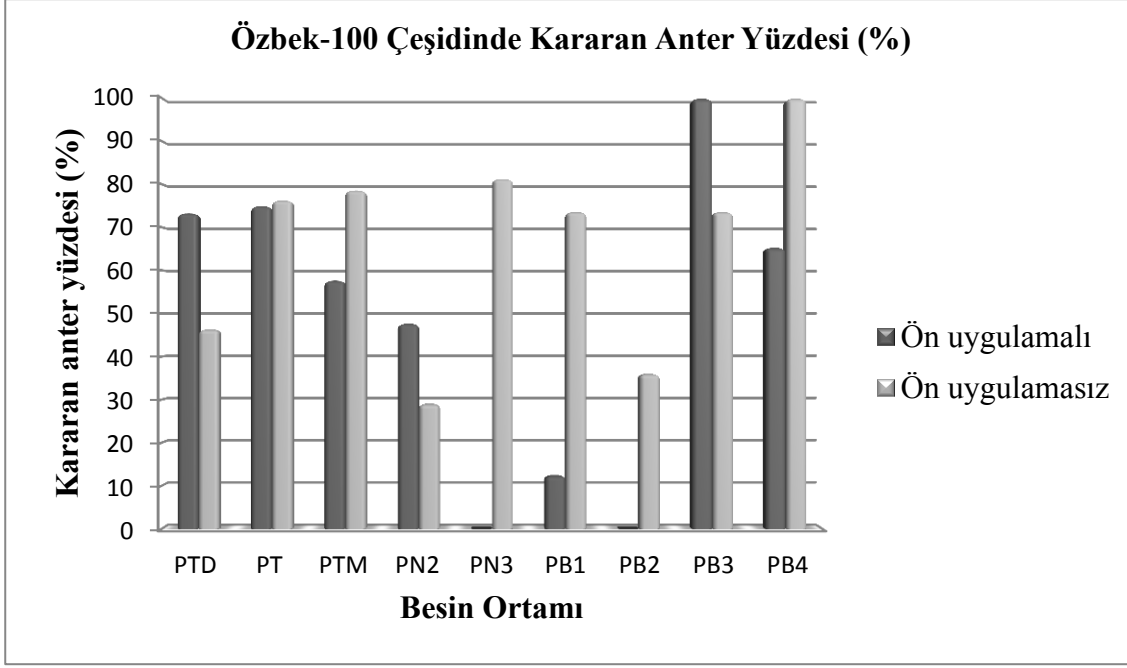
Çizelge 4.11. Özbek-100 çeşidinde ön uygulama durumuna göre anterlerin farklı kompozisyonlarda besin ortamlarında kültüre alınmasından sonra kararın gösteren anter yüzdeleri ile ilgili varyans analizi sonucu

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
Besin ortamı	8	16094.813	2011.852	22.645**	2.270	3.170
Ön Uygulama	1	238.360	238.360	2,683ns	4.170	7.560
Besin Ortamı*Ön Uygulama	8	10527.473	1315.934	14.812**	2.270	3.170
Hata	30	2665.333	88.844			
Genel	47	29525.979	628.212			

*= $\alpha:0,05$ önemlilik düzeyi

**= $\alpha:0,01$ önemlilik düzeyi

ns= anlamsız



Şekil 4.15. Özbek-100 çeşidinde ön uygulama durumuna göre farklı besin ortamı kompozisyonlarında kararma gösteren anter sayısı yüzdesi (%)

4.4.2. Özbek-100 Çeşidinde Kültür Koşullarının Kararma Üzerine Etkileri

Çalışmada ön uygulama gerçekleşmeksizin kültüre alınan anterler fotoperiyot (16 saat aydınlık/8 saat karanlık) ve karanlık koşullarda kültüre alınmış ve kararan anter sayıları belirlenmiştir. Elde edilen veriler Çizelge 4.12’de verilmiştir. Farklı kompozisyonlardaki besin ortamlarında kültüre alınan anterlerin fotoperiyot koşullarında kültürlerinin gerçekleştirilmesi sonucunda kararan anter yüzdesi % 66.11 olarak belirlenirken, karanlık koşullarda kültüre alınan anterlerde kararma görülen anter yüzdesi %61.91 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.12). LSD sınıflandırmasına göre kararan anter yüzdesinin en fazla (%100) olduğu fotoperiyot koşulunda PB4 ve karanlık koşulda PB3 ortamları 1. grupta yer alırken, en düşük (%0) olduğu karanlık koşul PB1 son grupta yer almıştır. Ayrıca yapılan varyans analizi sonucunda besin ortamı ve besin ortamı*kültür koşulu etkileşimleri istatistiksel olarak %1 düzeyinde önemli bulunmuş, kültür koşulunun etkisinin anlamsız olduğu belirtilmiştir (Çizelge 4.13). Besin ortamları kendi aralarında değerlendirildiğinde; PB4 ortamı %95.67 ile en fazla kararmanın görüldüğü ortam olarak belirlenirken, ortalama kararan anter

yüzdesinin %17.83 olduğu PN2 ortamında ise en az kararma görülmüştür (Çizelge 4.12) (Şekil 4.16).

Çizelge 4.12. Özbek-100 çeşidinde anterlerin farklı kompozisyonlarda besin ortamlarında fotoperiyot ve karanlık kültür koşullarında kültüre alınmasından 60 gün sonra gözlenen kararan anter yüzdeleri (%)

Besin Ortamı	Fotoperiyot				Karanlık				ORT.
	Kararan Anter Yüzdesi (%)				Kararan Anter Yüzdesi (%)				
	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.	
PTD	47	48	44	46.33 c	17	29	11	19.00 e	35.66
PT	78	73	78	76.33 b	63	84	83	76.67 b	76.5
PTM	78	78	80	78.67 ab	100	100	100	100.00 a	89.33
PN2	27	29	31	29.00 c	8	12	0	6.67 e	17.83
PN3	76	87	81	81.33 ab	44	55	29	42.67 d	62
PB1	51	89	81	73.67 b	0	0	0	0.00 e	36.83
PB2	41	46	21	36.00 c	47	80	50	59.00 c	47.5
PB3	86	83	52	73.67 b	100	100	100	100.00 a	86.83
PB4	100	100	100	100.00 a	86	93	95	91.33 ab	95.66
ORT.				66.11				61.91	

*Kültüre alınan anter sayısı tekerrür başına 100'dür.

** Besin ortamı için 105.111; LSD değeri 16.178, kültür koşulu için HKO değeri 105.111; LSD değeri 7.626, besin ortamı*kültür koşulu için KHO değeri 105.11; LSD değeri 22.879'dur.

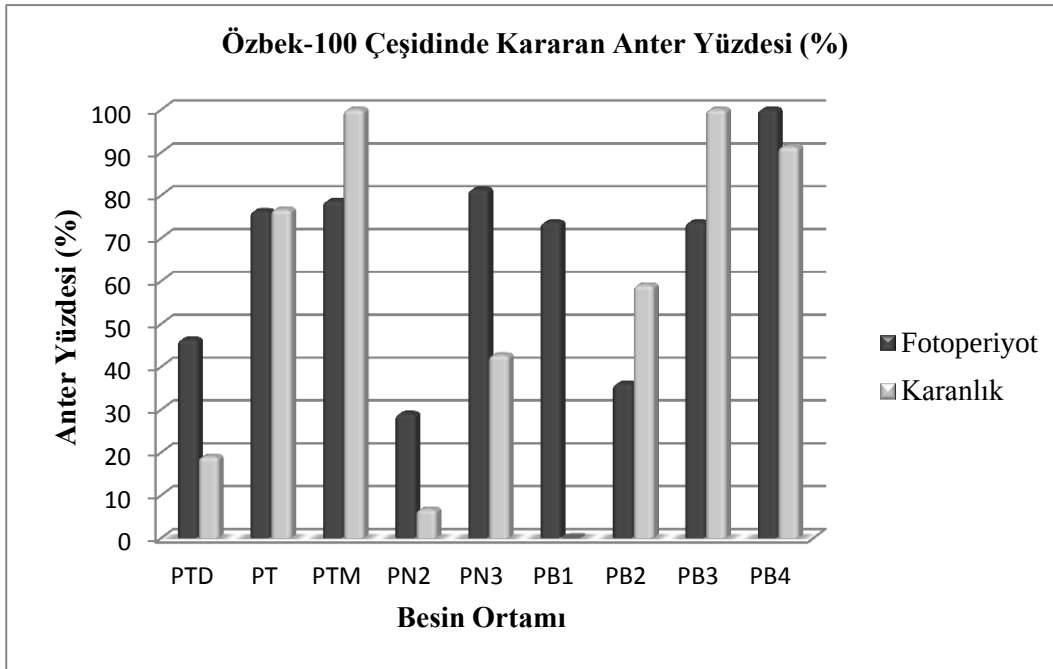
Çizelge 4.13. Özbek-100 çeşidine ait anterlerin farklı kompozisyonlardaki besin ortamlarında fotoperiyot ve karanlık koşullarda kültüre alınmasından sonra kararına gösteren anter sayıları ilgili varyans analizi sonucu

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
Besin ortamı	8	34548.706	4318.588	41.086**	2.243	3.116
Kültür Koşulu	1	223.539	223.539	2.127ns	4.143	7.485
Besin Ortamı*Kültür koşulu	8	6517.127	814.641	7.750**	2.243	3.116
Hata	33	3468.667	105.111			
Genel	50	44758.039	895.161			

*= $\alpha:0,05$ önemlilik düzeyi

**= $\alpha:0,01$ önemlilik düzeyi

ns= anlamsız



Şekil 4.16. Özbek-100 çeşidinde farklı besin ortamı kompozisyonlarında kültüre alınan anterlerde fotoperiyot ve karanlık kültür koşullarında kararma gözlenen anter yüzdesi

4.4.3. Nazilli-143 Çeşidinde Kültür Koşullarının Kararma Üzerine Etkileri

Ön uygulama gerçekleştirilmeden, farklı besin ortamı kompozisyonlarında kültüre alınan anterler, gelişimleri gözlemek üzere fotoperiyot (16 saat aydınlık / 8 saat karanlık) ve karanlık koşullarda kültüre alınmışlardır. Kültür süresince kararan anter sayıları gözlenmiştir, elde edilen veriler Çizelge 4.14’de gösterilmiştir. Fotoperiyot koşullarında, farklı besin ortamlarında kararan anter sayısı ortalama %92.33 olarak belirlenirken, karanlık koşullarda bu bu değer %82.21 olarak saptanmıştır (Çizelge 4.14). LSD sınıflandırmasına göre kararan anter yüzdesinin en fazla (%100) olduğu aydınlık koşuldaki PTDM, PB2, PB3 ve PB4 ortamları ile karanlık koşulda PTDM ve PB4 ortamları yine yakın değere sahip (%99) karanlık koşuldaki PT ve PB3 ortamları ile 1. grupta yer alırken, en az değeri (%0) karanlık koşulda PB2 ortamı vererek son grupta yer almıştır (Çizelge 4.14). Ayrıca yapılan varyans analizi sonucunda besin ortamı, kültür koşulu ve besin ortamı*kültür koşulu interaksiyonları, istatistiksel olarak değerlendirilmesinde %1 düzeyinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.15). Besin ortamları kendi aralarında değerlendirildiklerinde; PTDM, PB3 ve PB4 (%100, %99.5 ve %100) ortamları kararmanın en fazla görüldüğü ortamlar olarak değerlendirilirken, PTD ve PB2 (%50.5 ve %50) ortamı en az kararma görülen ortamlar olarak belirlenmişlerdir.

Çizelge 4.14. Nazilli-143 çeşidinde anterlerin farklı kompozisyonlarda besin ortamlarında fotoperiyot ve karanlık kültür koşullarında kültüre alınmasından 60 gün sonra gözlenen kararan anter yüzdesi (%)

Besin Ortamı	Fotoperiyot				Karanlık				ORT.
	Kararan Anter Yüzdesi (%)				Kararan Anter Yüzdesi (%)				
	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.	
PTD	74	73	78	75.00 c	26	21	31	26.00 c	50.5
PTDM	100	100	100	100.00 a	100	100	100	100.00 a	100
PT	86	84	83	84.33 ab	54	60	97	99.00 a	91.66
PB1	93	94	74	87.00 ab	77	75	90	80.67 b	83.83
PB2	100	100	100	100.00 a	0	0	0	0.00 f	50
PB3	100	100	100	100.00 a	100	100	97	99.00 a	99.5
PB4	100	100	100	100.00 a	100	100	100	100.00 a	100
ORT.				92.33				82.21	

*Kültüre alınan anter sayısı tekerrür başına 100'dür.

**Besin ortamı için HKO değeri 61.840; LSD değeri 12.656, kültür koşulu için HKO değeri 61.840; LSD değeri 6.765, besin ortamı*kültür koşulu için HKO değeri 61.840; LSD değeri 17.899'dir.

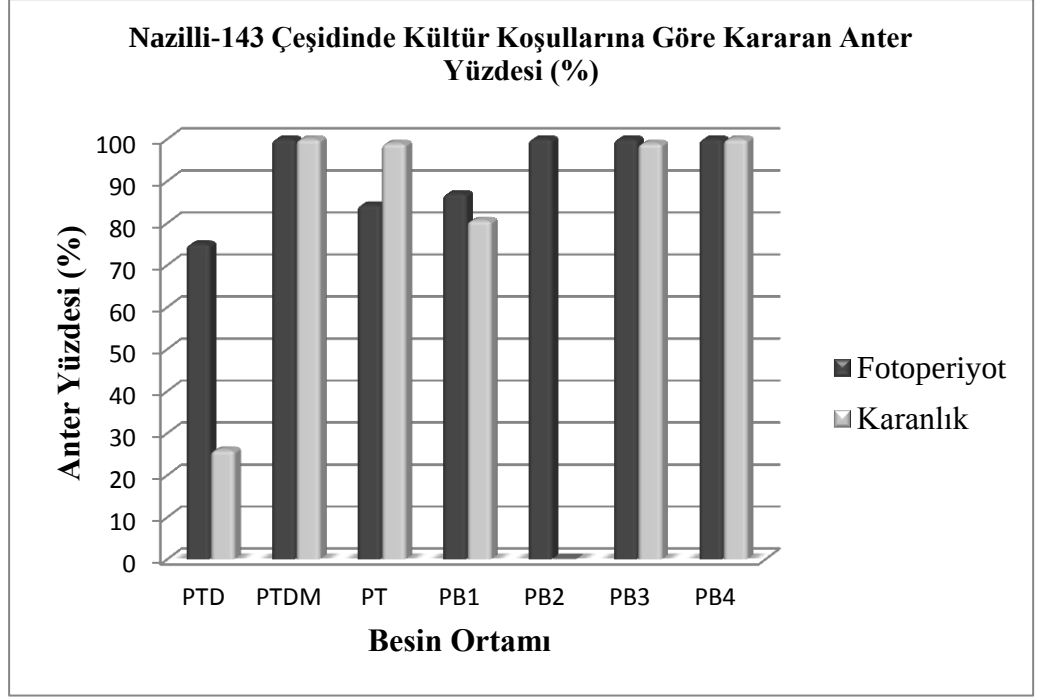
Çizelge 4.15. Nazilli-143 çeşidine ait anterlerin farklı kompozisyonlardaki besin ortamlarında aydınlık ve karanlık koşullarda kültüre alınmasından sonra kararma görülen anter sayıları ile ilgili verilerin varyans analizi sonucu

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
Besin ortamı	6	12069.5	2011.583	32.529**	2.490	3.630
Kültür Koşulu	1	1638	1638	26.488**	4.240	7.770
Besin Ortamı*Kültür koşulu	6	2319.167	386.528	6.250**	2.490	3.630
Hata	25	1546	61.840			
Genel	38	17572.667	462.439			

*= $\alpha:0,05$ önemlilik düzeyi

**= $\alpha:0,01$ önemlilik düzeyi

ns= anlamsız



Şekil 4.17. Nazilli-143 çeşidinde farklı besin ortamı kompozisyonlarında kültüre alınan anterlerde fotoperiyot ve karanlık kültür koşullarında gözlenen kararan anter yüzdesi (%)

4.4.4. İki Çeşidin Farklı Besin Ortamları ve Ön Uygulamanın Yapılması Durumunda Kararan Anter Sayılarının Karşılaştırılması

Özbek-100 ve Nazilli-143 çeşitleri ön uygulamaya maruz bırakılarak ve bırakılmayarak farklı besin ortamlarında anterler kültüre alınmış ve kültür süresince kararan anter sayıları belirlenmiştir. Elde edilen veriler Çizelge 4.16'da gösterilmiştir. Ön uygulamanın gerçekleştirildiği durumlarda, Özbek-100 çeşidinde kararma gözlenen anter sayısı %27.4 iken, Nazilli-143 çeşidinde %67.47 olarak ölçülmüştür. Ön uygulama gerçekleştirilmeyen durumda ise Özbek-100 için bu oran %58.73, Nazilli-143 için ise %84.76 şeklinde olmuştur (Çizelge 4.16). LSD sınıflandırmasına göre en fazla (%100) kararan anter sayısı oranıyla Nazilli-143 çeşidinin PB2 ortamı kullanılan ön uygulamalı ve uygulamasız denemeleri 1. grupta yer alırken, ön uygulama yapılan Özbek-100 çeşidinin PB2 denemesi son grupta sınıflandırılmıştır. Yapılan varyans analizi sonucuna göre; tüm interaksiyonlar istatistiki açıdan değerlendirilmesinde %1 düzeyinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.17).

Besin ortamları açısından en fazla (% 67,42) kararırma PTM ortamında gerçekleşmiştir. Diğer tüm ortamlar aynı grup içerisinde yer alırken, çeşitler bakımından ise Nazilli-143 çeşidinde (%76,03), Özbek-100 çeşidine (% 43,06) göre daha fazla kararırma gözlenmiştir(Çizelge 4.16) (Şekil 4.18). Ön uygulamanın olmadığı durumda (% 71,67) ise olduğu duruma (% 47,43) göre daha fazla kararırma gerçekleşmiştir.

Çizelge 4.16. Nazilli-143 ve Özbek-100 çeşitlerine ait anterlerin ön uygulama gerçekleştirilen ve gerçekleştirilmeyen anterlerin farklı besin ortamlarında kültüre alınmaları sonucunda kararma görülen anter yüzdeleri (%)

Besin Ortamı	Özbek-100								Nazilli-143								ORT
	Kararan Anter Yüzdesi (%)								Kararan Anter Yüzdesi (%)								
	Ön Uygulamalı				Ön uygulamasız				Ön Uygulamalı				Ön uygulamasız				
	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.	
PT	19	24	15	19.33 b	78	73	78	76.33 a	38	37	39	38.00 c	86	84	83	84.33 a	54.49
PTM	55	61	57	57.67 a	78	78	80	78.67 a	49	46	48	47.67 bc	87	82	88	85.67 a	67.42
PN2	49	47	47	47.67 a	27	29	31	29.00 b	81	97	91	89.67 a	69	61	68	66.00 b	58.08
PB1	6	11	20	12.33 bc	51	89	81	73.67 a	66	48	72	62.00 b	93	94	74	87.00 a	58.75
PB2	0	0	0	0.00 c	41	46	21	36V b	100	100	100	100.00 a	100	100	100	100.00 a	59
ORT				27.4				58.73				67.47				84.6	
ORT	43,06								76,03								

*Eksplant sayısı (anter sayısı) tekerrür başına 100'dür.

**Besin ortamı için HKO değeri 52.733; LSD değeri 8.017, ön uygulama ve çeşit için HKO değeri 52.733; LSD değeri 5.071, besin ortamı*ön uygulama*çeşit için HKO değeri 52.733; LSD değeri 16.034'dir.

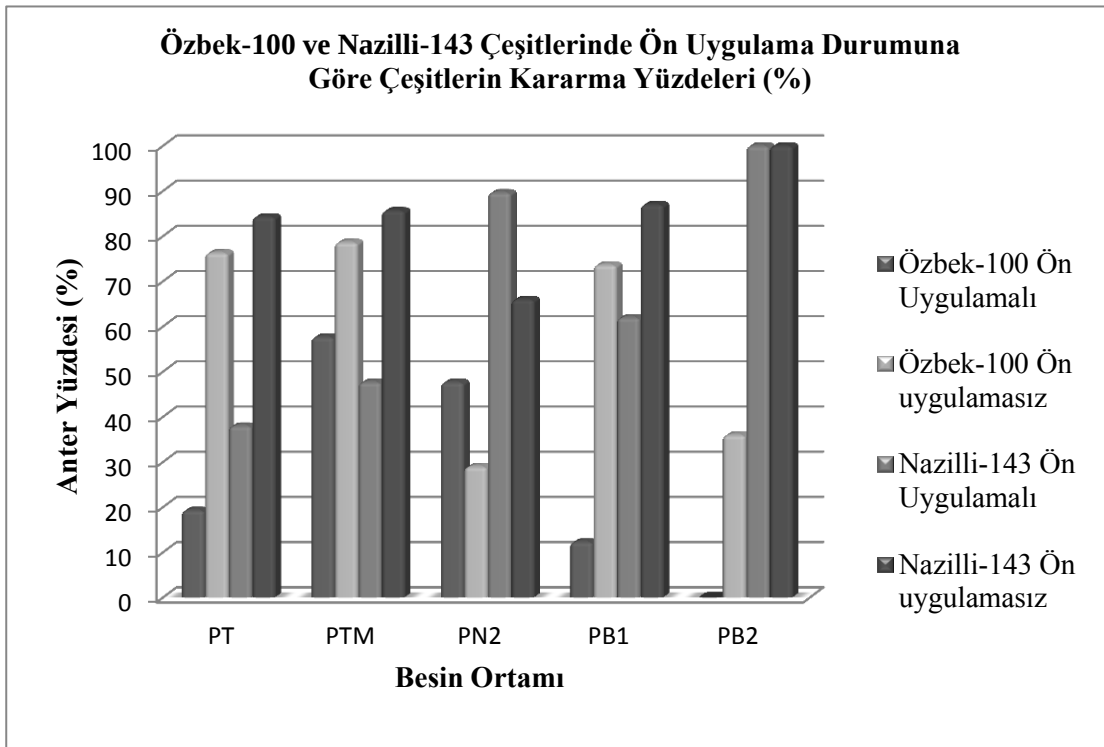
Çizelge 4.17. Nazilli-143 ve Özbek-100 çeşitlerine ait anterlerin ön uygulama gerçekleştirilmesi durumunda farklı besin ortamlarında anterlerin kültüre alınmaları sonucunda kararma gözlenen anter yüzdeleri ile ilgili varyans analizi sonucu

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
Besin ortamı	4	1085.767	271.442	5.418**	2.610	3.830
Ön Uygulama	1	8808.817	8808.817	167.045**	4.080	7.310
Besin Ortamı*Ön Uygulama	4	9716.433	2429.108	46.064**	2.610	3.830
Çeşit	1	16302.017	16302.017	309.141**	4.080	7.310
Besin Ortamı*Çeşit	4	12067.567	3016.892	57.141**	2.610	3.830
Ön Uygulama*Çeşit	1	756.150	756.150	14.339**	4.080	7.310
Besin Ortamı*Ön Uygulama*Çeşit	4	1523.767	381.692	7.238**	2.610	3.830
Hata	40	2109.333	52.733			
Genel	59	52372.850	887.675			

*= $\alpha:0,05$ önemlilik düzeyi

**= $\alpha:0,01$ önemlilik düzeyi

ns= anlamsız



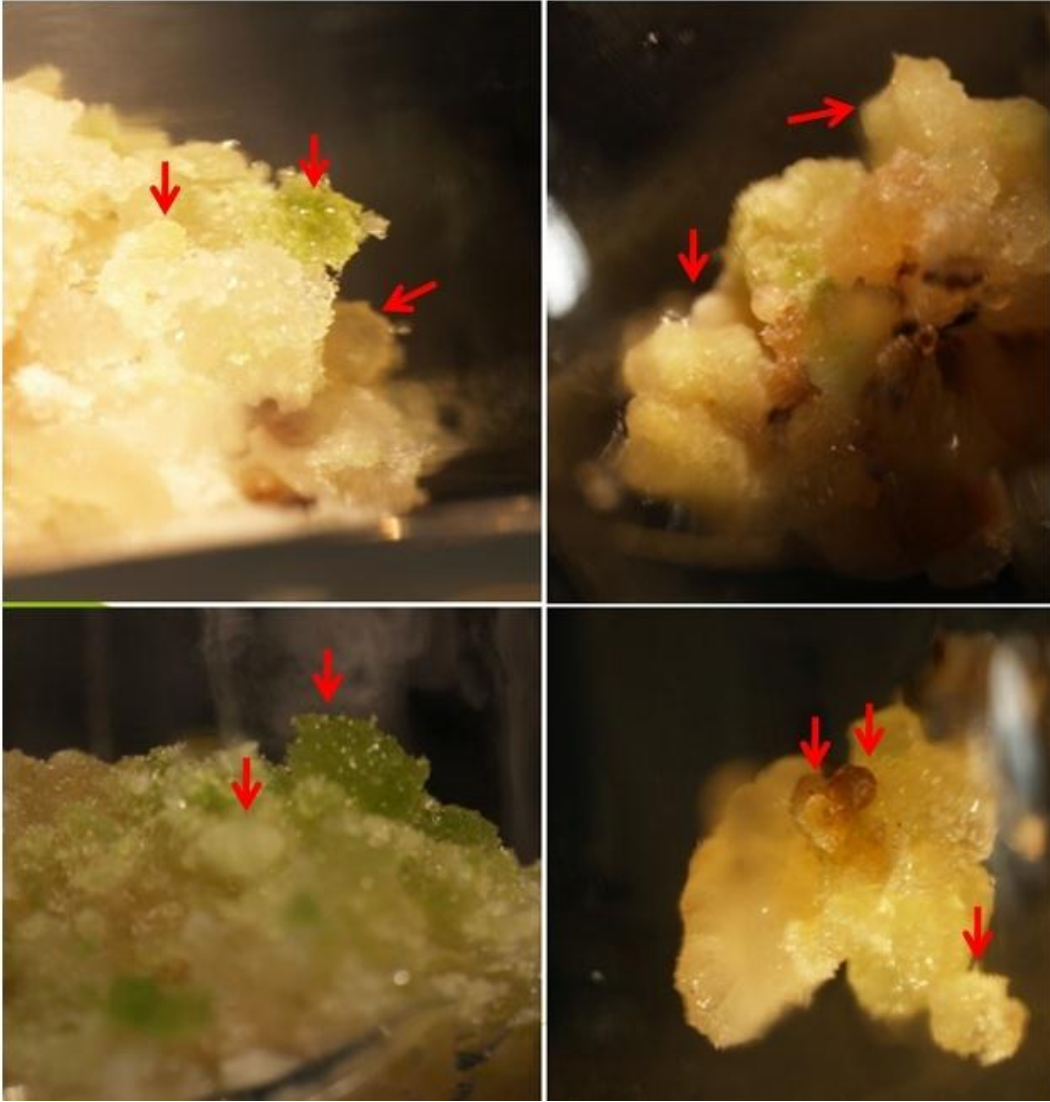
Şekil 4.18. Ön uygulama durumuna göre farklı kompozisyonlardaki besin ortamlarında kararan anter yüzdesi (%).

4.5. Embriyo Oluşum Oranlarının Karşılaştırılması

İki farklı çeşitte, farklı besin ortamlarında ve ön uygulamanın durumuna göre oluşan embriyolar incelenmiştir. Embriyolar genellikle globuler safhadadır (Şekil 4.19; Şekil 4.20).



Şekil 4.19. Nazilli-143 ve Özbek-100 çeşitlerinde gelişen koyu renkli kallus yığınlarında farklı kültür koşulları ve çeşitlerde elde edilen embriyolar



Şekil 4.20. Nazilli-143 ve Özbek-100 çeşidinde gözlenen açık renkli kalluslardan gelişen embriyolar.

4.5.1. Özbek-100 Çeşidinde Ön Uygulamanın Embriyo Oluşumu Üzerine Etkileri

Özbek-100 çeşidinde ön uygulama durumuna göre anterler, farklı besin ortamlarında kültüre alınmışlardır. Fotoperiyot koşullarında kültürü gerçekleştirilen anterlerde 60 günlük kültür sonucunda dolaylı embriyo rejenerasyonu gözlenmiştir. Elde edilen veriler Çizelge 4.18’de gösterilmiştir. Ön uygulama durumunda kültüre alınan anter başına oluşan embriyo sayısı %11.15 olarak gözlenirken, ön uygulama gerçekleştirilmeyen durumda bu değer %3.37 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.18). LSD sınıflandırmasına göre, en fazla (%48) PB2 besin ortamında embriyo oluşumu gözlenmiştir. Ayrıca ön uygulamada PN2,

PN3, PB3 ve PB4 besin ortamları ile ön uygulama gerçekleşmeyen durumda PN3, PB1, PB2, PB3 ve PB4 besin ortamlarında embriyo oluşumu gözlenmemiştir. Yapılan varyans analizi sonucuna göre besin ortamı ve besin ortamı*kültür koşulu interaksyonları istatistiki değerlendirmede %1 değer düzeyinde önemli bulunurken, kültür koşulu %5 değer düzeyinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.19). Besin ortamları karşılaştırmasına göre PB2 ortamında %24 embriyo oluşumu gerçekleşirken, PN3, PB3 ve PB4 ortamlarında embriyo oluşumu gözlenmemiştir(Çizelge 4.18) (Şekil 4.21).

Çizelge 4.18. Özbek-100 çeşidinde ön uygulama gerçekleştirilmesi durumuna göre anterlerin farklı besin ortamlarında fotoperiyot koşullarında kültüre alınmasından 60 gün sonra gözlenen embriyo yüzdeleri (%)

Besin Ortamı	Ön Uygulamalı				Ön Uygulamasız				ORT.
	Embriyo Yüzdesi (%)				Embriyo Yüzdesi (%)				
	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.	
PTD	8	9	7	8.00 c	3	3	3	3.00 c	5.5
PT	10	12	8	10.00 c	10	10	9	9.67 b	9.83
PTM	15	16	15	15.33 b	5	5	5	5.00 c	10.16
PN2	2	2	2	2.00 e	13	13	12	12.67 a	7.33
PN3	0	0	0	0.00 e	0	0	0	0.00 d	0
PB1	16	17	18	17.00 b	0	0	0	0.00 d	8.5
PB2	52	49	43	48.00 a	0	0	0	0.00 d	24
PB3	0	0	0	0.00 e	0	0	0	0.00 d	0
PB4	0	0	0	0.00 e	0	0	0	0.00 d	0
ORT.				11.15				3.37	

*Kültüre alınan anter sayısı tekrerr başına 100'dür.

**Besin ortamı için HKO değeri 1.556; LSD değeri 1.958, ön uygulama için HKO değeri 105.111; LSD değeri 0.923, besin ortamı*ön uygulama için HKO değeri 1.556; LSD değeri 2.769'dir.

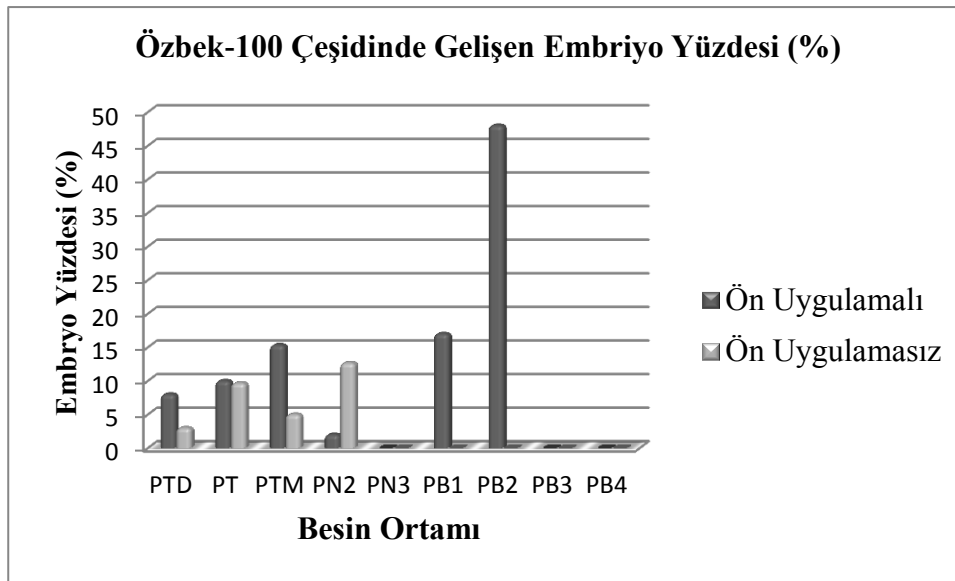
Çizelge 4.19. Özbek-100 çeşidine ait ön uygulama durumuna göre anterlerin farklı besin ortamlarında kültüre alınmaları sonucunda gelişen embriyo yüzdeleri ile ilgili varyans analizi sonucu

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
Besin ortamı	8	2748.370	343.546	220.851**	2.216	3.062
Kültür Koşulu	1	816.667	816.667	525.000*	4.116	7.410
Besin Ortamı*Kültür koşulu	8	3441.333	430.167	276.536**	2.216	3.062
Hata	36	56.000	1.556			
Genel	53	7062.370	133.252			

*= $\alpha:0,05$ önemlilik düzeyi

**= $\alpha:0,01$ önemlilik düzeyi

ns= anlamsız



Şekil 4.21. Ön uygulama durumuna göre farklı kompozisyonlardaki besin ortamlarında elde edilen embriyo sayılarının yüzdeleri (%)

4.5.2. Özbek-100 Çeşidinde Kültür Koşullarının Embriyo Oluşumu Üzerine Etkileri

Ön uygulama gerçekleştirilmeden farklı besin ortamlarında kültüre alınan anterler fotoperiyot ve karanlık kültür koşullarında kültüre alınmışlar ve oluşan embriyo sayıları belirlenmiştir. Elde edilen veriler Çizelge 4.20’de gösterilmiştir.

Fotoperiyot koşullarında elde edilen embriyo sayısı %2.75 şeklinde gözlenirken, karanlık koşullarda bu değer % 15.21 şeklinde olmuştur (Çizelge 4.20). Yapılan varyans analizi sonucuna göre en fazla (%54) embriyo oluşumu belirlenen karanlık koşulda PB1 ortamı 1. grupta yer almıştır. Aydınlik koşulda PTD ortamında %3 embriyo oluşumu elde edilirken, PN1, PN3, PN4, PB1, PB2, PB3 ve PB4 ortamları ile karanlık koşuldaki PTM, PN1, PN2, PN4, PB3 ve PB4 ortamlarında ise embriyo oluşumları gözlenmemiştir. Yapılan varyans analizi sonucuna göre tüm interaksyonlar, istatistiksel olarak değerlendirmede %1 düzeyinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.21). Besin ortamlarının kendi içinde değerlendirilmeleri sonucunda PB1 besin ortamında (%27) en fazla embriyo oluşumu gözlenirken; karanlık koşullarda, fotoperiyot koşullarına göre daha fazla sayıda embriyo oluşumu belirlenmiştir (Çizelge 4.20) (Şekil 4.22).

Çizelge 4.20. Özbek-100 çeşidine ait anterlerin farklı besin ortamlarında fotoperiyot ve karanlık koşullarında kültüre alınmasından 60 gün sonra gözlenen embriyo sayısı (%)

Besin Ortamı	Fotoperiyot				Karanlık				ORT.
	Embriyo Yüzdesi (%)				Embriyo Yüzdesi (%)				
	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.	
PTD	3	3	3	3.00 c	27	26	23	25.33 d	14.17
PT	10	10	9	9.67 ab	12	16	17	16.00 e	12.8
PTM	5	5	5	5.00 bc	0	0	0	0.00 f	2.5
PN1	0	0	0	0.00 c	0	0	0	0.00 f	0
PN2	13	13	12	12.67 a	0	0	0	0.00 f	6.33
PN3	0	0	0	0.00 c	35	35	53	40.33 b	20.33
PN4	0	0	0	0.00 c	0	0	0	0.00 f	0
PB1	0	0	0	0.00 c	52	55	55	54.00 a	27
PB2	0	0	0	0.00 c	33	33	29	31.67 c	15.83
PB3	0	0	0	0.00 c	0	0	0	0.00 f	0
PB4	0	0	0	0.00 c	0	0	0	0.00 f	0
ORT.				2.75				15.21	

*Kültüre alınan anter sayısı tekerrür başına 100'dür.

**Besin ortamı için HKO değeri 6.617; LSD değeri 3.860, kültür koşulu için HKO değeri 6.617; LSD değeri 1.646, besin ortamı*kültür koşulu için HKO değeri 6.167; LSD değeri 5.459'dir.

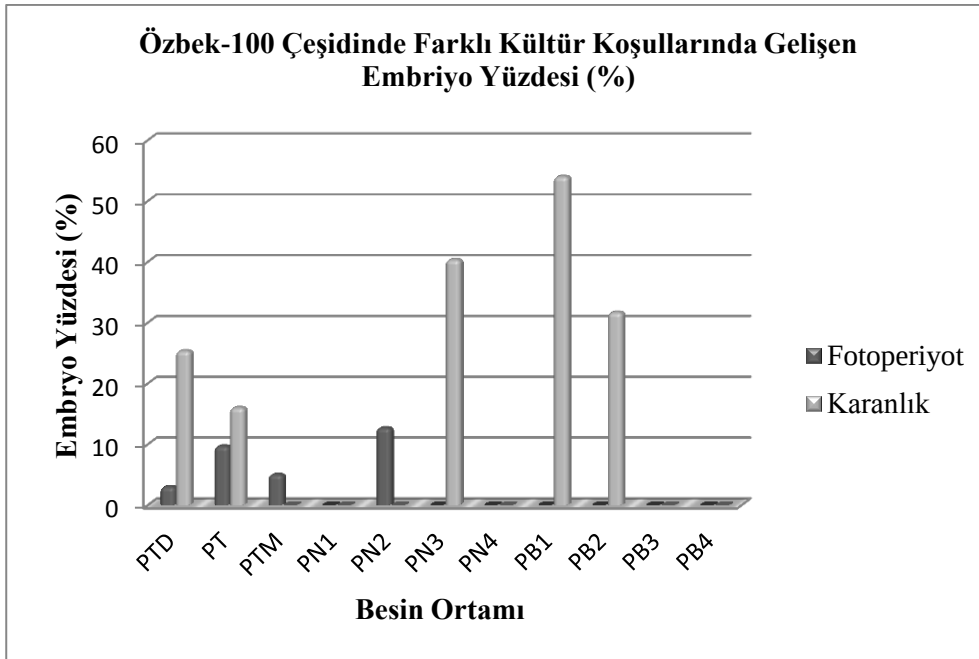
Çizelge 4.21. Özbek-100 çeşidine ait anterlerin farklı besin ortamlarında fotoperiyot ve karanlık koşullarda kültüre alınmaları sonucunda gelişen embriyo yüzdeleri ile ilgili varyans analizi sonucu

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
Besin ortamı	10	5460.818	546.082	88.554**	2.115	2.745
Kültür Koşulu	1	2559.409	2559.409	415.039**	4.064	7.264
Besin Ortamı*Kültür koşulu	10	6845.424	684.542	111.007**	2.115	2.745
Hata	44	271.333	6.167			
Genel	65	15136.985	232.877			

*= $\alpha:0,05$ önemlilik düzeyi

**= $\alpha:0,01$ önemlilik düzeyi

ns= anlamsız



Şekil 4.22. Özbek-100 çeşidinde farklı kompozisyonlardaki besin ortamlarındaki anterlerin fotoperiyot ve karanlık koşullarda kültüre alınmaları sonucu oluşan embriyo yüzdeleri (%)

4.5.3. Nazilli-143 Çeşidinde Kültür Koşullarının Embriyo Oluşumu Üzerine Etkileri

Farklı besin ortamlarında kültüre alınan anterlerin, fotoperiyot ve karanlık kültür koşullarında gelişimleri gözlenmiş ve embriyo oluşan anter sayıları tespit edilmiştir. Elde edilen veriler Çizelge 4.22’de yer almaktadır. Fotoperiyot

koşullarda oluşan embriyo yüzdesi %4.14, karanlık koşullarda ise %1.8 olarak belirlemiştir (Çizelge 4.22). LSD sınıflandırmasına göre en fazla (%25.33) embriyo görülen fotoperiyot koşulları 1. grupta yer alırken, aydınlık koşulda PTDM, PB1, PB3 ve PB4 besin ortamları ile karanlık koşullardaki PB3 dışındaki tüm ortamlar embriyo oluşumu gözlenmemiştir. Gerçekleştirilen varyans analizi sonucuna göre, tüm interaksiyonlar, istatistiki olarak değerlendirmede %1 düzeyinde önemli bulunmuşlardır (Çizelge 4.23). Besin ortamlarının kendi aralarındaki değerlendirilmeleri sonucunda PB2 ortamında en fazla (%12.67) embriyo oluşumu gözlenmiştir (Çizelge 4.22) (Şekil 4.23).

Çizelge 4.22. Nazilli-143 çeşidine ait anterlerin farklı besin ortamlarında fotoperiyot ve karanlık kültür koşullarında kültüre alınmasından 60 gün sonra elde edilen embriyo yüzdesi (%)

Besin Ortamı	Fotoperiyot				Karanlık				ORT.
	Embriyo Yüzdesi (%)				Embriyo Yüzdesi (%)				
	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.	
PTD	1	1	0	0.67 c	0	0	0	0.00 b	0.33
PTDM	0	0	0	0.00 c	0	0	0	0.00 b	0
PT	3	3	3	3.00 b	0	0	0	0.00 b	1,5
PB1	0	0	0	0.00 c	0	0	0	0.00 b	0
PB2	25	28	23	25.33 a	0	0	0	0.00 b	12.66
PB3	0	0	0	0.00 c	12	12	14	12.67 a	6.33
PB4	0	0	0	0.00 c	0	0	0	0.00 b	0
ORT.				4.14				1.8	

*Kültüre alınan ante sayısı tekerrür başına 100'dür.

**Besin ortamı için HKO değeri 0.571; LSD değeri 1.206, kültür koşulu için HKO değeri 0.571; LSD değeri 0.645, besin ortamı*kültür koşulu için HKO değeri 0.571; LSD değeri 1.706'dir.

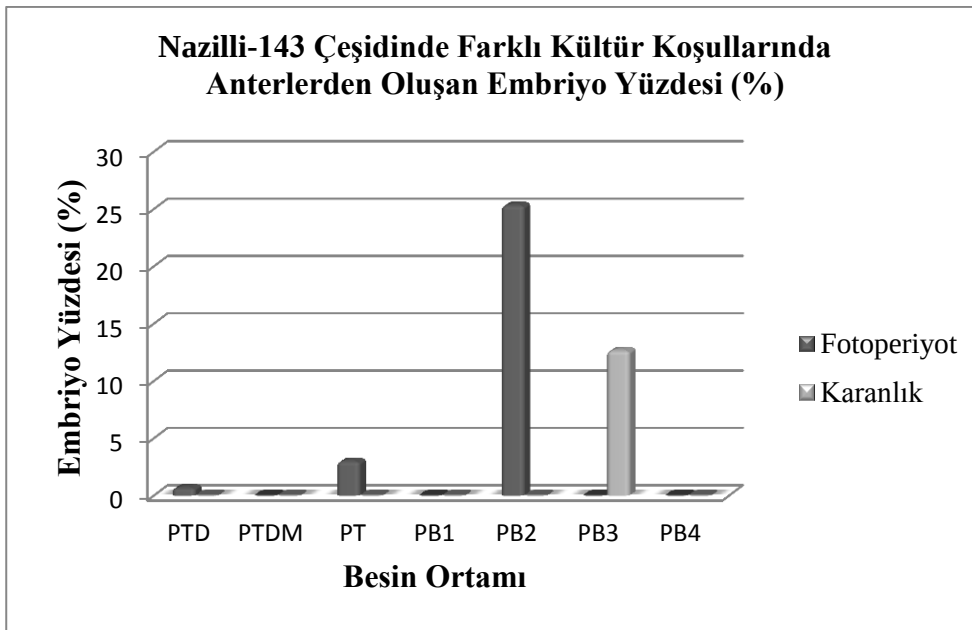
Çizelge 4.23. Nazilli-143 çeşidine ait anterlerin farklı besin ortamlarında fotoperiyot ve karanlık koşullarda kültüre alınmaları sonucunda gelişen embriyo yüzdeleri ile ilgili varyans analizi sonucu

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
Besin ortamı	6	845.476	140.913	246.597**	2.450	3.530
Kültür Koşulu	1	57.167	57.167	100.042**	4.200	7.640
Besin Ortamı*Kültür koşulu	6	1160.333	193.389	338.431**	2.450	3.530
Hata	28	16.000	0.571			
Genel	41	2078.976	50.707			

*= $\alpha:0,05$ önemlilik düzeyi

**= $\alpha:0,01$ önemlilik düzeyi

ns= anlamsız



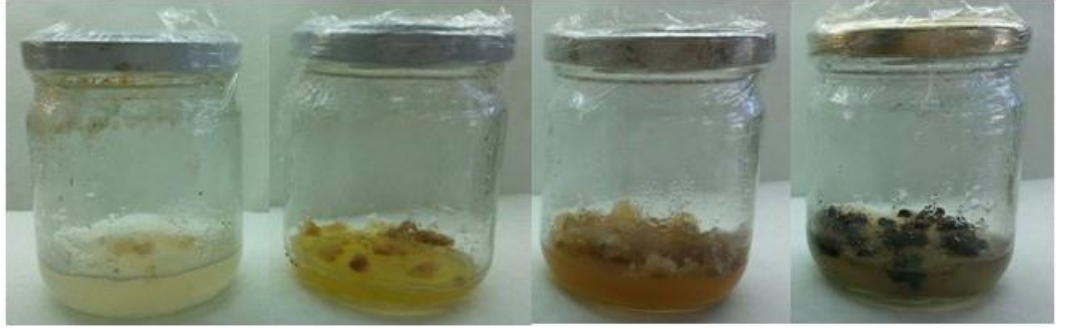
Şekil 4.23. Nazilli-143 çeşidinde farklı besin ortamlarındaki anterlerin fotoperiyot ve karanlık koşullarda kültürü alınmaları sonucu oluşan embriyo yüzdeleri (%)

4.6. Kallusların Altkültüre Alınması

Anter kültürlerinin kurulması sonucunda elde edilen kalluslar, kallus rejenerasyonunu ve embriyo gelişimlerini arttırmak, kallusların daha gevşek forma gelerek sıvı kültürlerin kurulmasını kolaylaştırmak adına 60 günlük intervallerde iki kez altkültüre alınmışlardır. 60 günlük kültür süresi sonucunda

PKB5 olarak adlandırılan besin ortamlarında kültüre alınan kallus yığınları aydınlık koşullarda gelişmeye bırakılmışlardır.

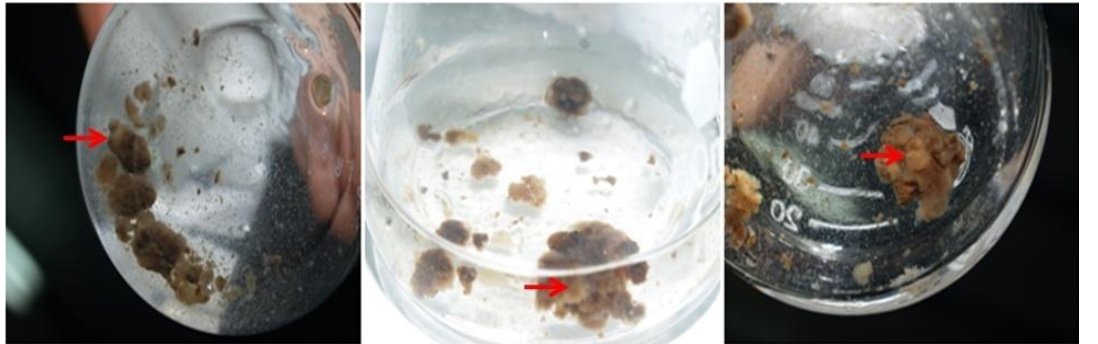
Kültür sırasında gevşek yapılı kallusların daha da gevşek forma ulaşması sonucunda besin ortamlarının renginde değişiklik gözlenmiştir (Şekil 4.24). Altkültürlemeler sonucunda embriyo sayılarında değişiklik olmamakla birlikte, var olan embriyolarda da herhangi bir gelişme gözlenmemiştir.



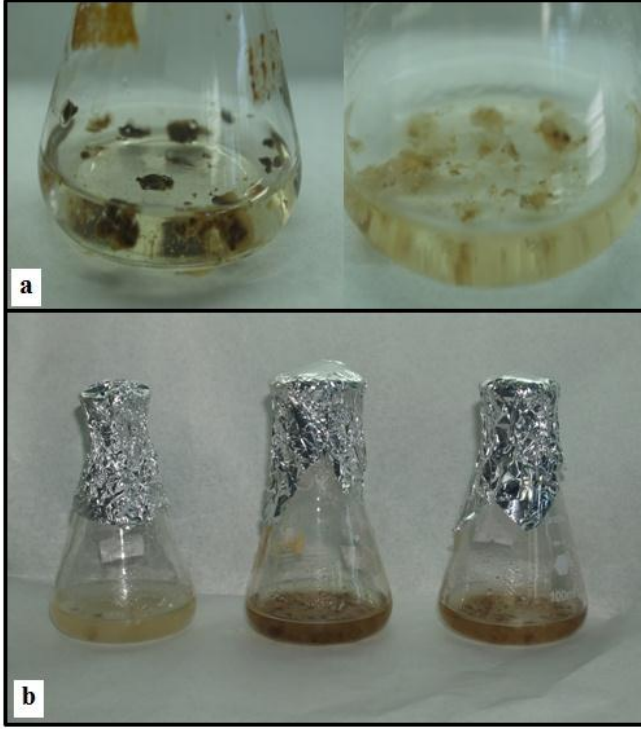
Şekil 4.24. Nazilli-143 çeşidinde PKB5 besin ortamında kallusların gelişimleri sırasında besin ortamında ve kalluslarda gözlenen renk değişimleri

4.7. SIVI KÜLTÜR DENEMELERİ

Çalışmada kurulan sıvı kültür denemelerine, altkültüre alınan kalluslarla başlanmış, 14 gün sonunda farklı ortamlarda embriyo oluşumları belirlenmiştir. Ancak embriyolar sadece Nazilli-143 çeşidinden elde edilen kalluslarda MPM, MPG, MPS ve MS ortamlarında gözlenmişlerdir (Şekil 4.25). Ayrıca altkültür işlemi sonucunda belirlenen yarı-katı besin ortamlarındaki kallus renk değişikliği sıvı kültür denemelerinde de gözlenmiştir (Şekil 4.26).



Şekil 4.25. Sıvı kültür denemeleri sonucunda elde edilen embriyolar.



Şekil 4.26. Sıvı kültürlerdeki renk değişimleri. a) Kültürün 0. günü b) Kültürün 14. günü

5. TARTIŞMA

Pamuk; hem ülkemizde, hem de dünyada tarımı gerçekleştirilen önemli endüstri bitkilerinden biridir. Çok yaygın tüketime sahip olması, daha verimli ve daha kalite lif veren yeni çeşitlerin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Günümüzde kullanılan klasik ıslah çeşitlerinin uzun zaman alması ve alternatif yöntemlere ihtiyaç duyulması doku kültürü tekniklerinin bu alanda kullanımının önemini arttırmıştır.

Haploit bitki eldesi teknikleri, klasik ıslah tekniklerine göre kısa zamanda istenen sonucun alınması nedeniyle başarılı bir alternatif teknik olmuştur. Anter kültürü, izole mikrospor kültürü, ovul ve ovaryum kültürleri gibi haploit bitki eldesi teknikleri, haploit hücre yapısının devamlılığını sağladıkları için resesif özelliklerin açığa çıkmasına yardımcı olurlar.

Anter kültürü uygulamalarında; genotip, donör bitkinin yetiştirme koşulları ve fizyolojik özellikleri, mikrosporların gelişim safhaları, kültür öncesi anterlere gerçekleştirilen ön uygulamalar, kültür sırasında kullanılan besin ortamı içeriği ve yapısının yanı sıra, kültür koşulları önemli faktörlerdir. Kültüre alınan anterlerden gelişim, doğrudan ya da dolaylı embriyogenez veya organogenez şeklinde gerçekleşmektedir.

Gerçekleştirilen bu çalışmada Nazilli Pamuk Araştırma İstasyonu'na ait arazilerde yetiştirilen Özbek-100 ve Nazilli-143 çeşitlerine ait pamuk bitkilerinden alınan tomurcuklar, uygun mikrospor dönemi belirlendikten sonra farklı parametrelere göre denemelerde kullanılmıştır. Anterlere ön uygulamanın gerçekleştirilip gerçekleştirilmemesi, kültüre alınan anterlerin fotoperiyot ya da karanlık koşullarda gelişmeye bırakılması durumunda veya farklı büyüme düzenleyicisi kompozisyonlarında kallus rejenerasyonları ve embriyo gelişimleri belirlenmiştir.

Tomurcuk boyutu: Çalışmadaki en önemli aşama, tomurcukların boyutlarına göre sınıflandırıldığı ve uygun dönemde mikrosporu içeren tomurcuk boyutunun belirlendiği aşama olmaktadır. Türkoğlu (2004) tarafından yapılan çalışmada 3-5 mm çiçek tomurcuğu taşıyan 5-8 mm tarak büyüklüğünün anter kültürü için uygun olduğu saptanmış ve kültürlerin kurulmasında bu büyüklükteki materyaller kullanılmıştır. Mevcut çalışmamızda ise tetrat yapının görüldüğü, 4 mm'lik

tomurcuklar denemeler için uygun bulunmuştur. Daha büyük boyuttaki tomurcuklarda olgun polenler tespit edilmiştir. Bu sebeple, çalışmanın diğer tüm aşamalarında 4 mm'lik tomurcuklardan alınan anterler ile kültürler kurulmuştur. Elde edilen bu bilgi Türkoğlu (2004) ile benzerlik göstermektedir.

Kallus rejenerasyonlarının görülmesi için geçen süre: Gerçekleştirilen bu çalışmada kallus rejenerasyonları kültürün 14. gününde belirlenmiştir. Blauch (1979) farklı *Gossypium* türlerinde farklı gelişme dönemlerinde mikrosporlar içeren anterlerde gerçekleştirdiği çalışmada, 5 mg/L NAA ve 1 mg/L kinetin içeren Gresshof ve Doy (1972) besin ortamını kullanmışlar ve anterlerdem kallus gelişimlerini incelemişlerdir. Kültürün üçüncü haftasında da beyaz kallus yığınlarını elde etmişlerdir. Türkoğlu (2004) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, *G. hirsutum* L.'ye ait anterlerle kurulan denemelerde kültürün ilk 2.5 aylık süresi boyunca hiçbir gelişme gözlemlenememiştir. Zhang et al. (1996) tarafından *Gossypium klotzschianum*'da anter kültürü üzerine gerçekleştirilen çalışmada benzer sterilizasyon yöntemi kullanılmış ve kallus rejenerasyon oranları belirlenmiştir. Çalışmada kallus gelişimleri kültürün 30. gününde gözlemlenebilmiştir. Ghaemi et al. (2011) tarafından gerçekleştirilen çalışmada ise dört farklı genotipten üçünde 7-14 gün arasında kallus rejenerasyonu gözlenmiştir. Bu açıdan incelendiğinde mevcut çalışmada kültürün 14. gününde kallus rejenerasyonlarının gözleniyor olması daha kısa sürede kallus eldesinin mümkün olabileceğini göstermektedir. Bu değerler farklı genotiplerle Türkoğlu (2006) ve Ghaemi et al. (2011) çalışmaları sonucu elde edilen verilere göre daha başarılı bir sonuç olmuştur. Bu şekilde daha kısa sürede kallus rejenerasyonlarının sağlanabilmesi adına önemli bir aşama kaydedilmiştir.

Kallus rejenerasyonları: Kültürün 14. gününde kallus başlangıçlarının gözlenmesinin ardından kallus miktarında hızlı bir artış gerçekleşmiştir. Altkültürlemeler, kallusların miktarlarındaki artışın hızlanmasını sağlamıştır. Elde edilen kalluslar genel olarak gevşek yapılı olmuştur.. Altkültürlemeler sonucunda bu gevşek yapı daha da birbirinden ayrılır forma gelmiştir. Yeşil kalluslar ilk kültür sonucunda sadece fotoperiyot kültür koşulunda gözlemlenirken, karanlık koşullarda gelişip altkültür sonucunda fotoperiyot koşullarına alınan ve yeni

gelişen kalluslarda yeşil renk oluşumları gerçekleşmiştir. Özbek-100 çeşidinde ön uygulamanın gerçekleştirildiği denemelerde %100 oranında kallus rejenerasyonu gözlenmiş, aydınlık ve ön uygulama gerçekleştirilmeyen denemelerde ise daha düşük oranda rejenerasyon gerçekleşmiştir. Nazilli-143 çeşidinde ise ön uygulama kallus rejenerasyonunu inhibe etmiş ve rejenerasyon gözlenmemiştir. Ancak Nazilli-143 çeşidinde karanlık kültür koşulu rejenerasyon için çok uygun bulunmuştur. Kallus rejenerasyonu görülen anter yüzdesinin genotiplere bağlı olarak farklılık göstermesi ile ilgili bu bulgular, Turaev and Shamina (1985), Mavromatis et al. (1998), Wu et al. (1992) ve Zhang et al. (1998a)'nın bulgularını desteklemektedir.

Besin ortamlarının kallus rejenerasyonları üzerindeki etkileri incelendiğinde, en fazla kallus rejenerasyonu fotoperiyot koşullarında Özbek-100 çeşidinde ön uygulama gerçekleştirilen durumda PB2 besin ortamında %100 olarak gerçekleşmiştir. Nazilli-143 çeşidinde ise ön uygulamasız karanlık kültür koşulunda PB2 besin ortamında %100 kallus rejenerasyonu gözlenmiştir. PB1, PB2, PB3 ve PB4 ortamları incelendiğinde 5 mg/L ve üzerindeki BA konsantrasyonlarında bu oran %0'a düşmüştür. Bu veriler ışığında çalışma sonucunda besin ortamında bulunan BA'nın kallus rejenerasyonu için gerekli olduğu, artan konsantrasyonlarda ise kallus rejenerasyonunu inhibe ettiği ifade edilebilir. Patil and Khadi (1997) tarafından yapılan çalışma sonucunda, 10 mg/L NAA ve 1 m/L BA içeren MS besin ortamı kallus rejenerasyonu için uygun bulunmuştur. Zhang et al. (1996) gerçekleştirdikleri araştırmada da yüksek konsantrasyonda büyüme düzenleyicisi içeren besin ortamlarında kallus rejenerasyonunun daha fazla olduğu belirtilmiştir. Benzer şekilde bir çalışma Morre et al. (1998) tarafından da gerçekleştirilmiş, pamukta belirli bir BA konsantrasyonunda kallus rejenerasyonun gerçekleştiği, bu değerin altı ve üstü miktarlarda ise olumsuz etkilerinin olduğu belirtilmiştir. Özbek-100 çeşidinde ön uygulama gerçekleştirilen anterlerde büyüme düzenleyici konsantrasyonu arttıkça kallus rejenerasyonu oranı artmış (%61.33-%100), ancak Nazilli-143'de azalmıştır (%38-%0). Bu durumda elde edilen bu veriler, Zhang et al. (1996)'a ve Patil and Khadi (1997)'ye göre farklılık göstermekle birlikte, Morre et al. (1998) ile bağdaşmaktadır.

Çalışmada kullanılan PN2 ve PN3 besin ortamları incelendiğinde, Özbek-100 çeşidinde ön uygulamanın gerçekleştirildiği denemelerde PN2 besin ortamında kallus rejenerasyonu oranı %54 iken, NAA konsantrasyonunun arttığı PN3 besin ortamında %17.67 olarak gözlenmiş ve artan NAA konsantrasyonunun kallus rejenerasyonunu olumsuz yönde etkilediği belirlenmiştir. Yine PTD, PT ve PTM ortamları arasında yapılan incelemede, büyüme düzenleyicisinin konsantrasyonu arttıkça kallus rejenerasyonunda azalmalar gözlenmiştir. Fotoperiyot koşulda PTD ve PT ortamları incelendiğinde büyüme düzenleyicisinin konsantrasyonundaki değişiklik herhangi bir etki göstermezken, karanlık koşulda etkisi olumsuz olmuştur. Ayrıca fotoperiyot koşullarında $MgCl_2$ 'nin bir etkisi görülmemekle birlikte, karanlık koşullarda kallus rejenerasyonunu azalttığı da tespit edilmiştir. Zhang et al. (1996) tarafından kallus rejenerasyonu için belirlenen en iyi ortamda (0.1 mg/L 2,4-D ve 0.5 mg/L kinetin içeren MS besin ortamı) kallus rejenerasyon oranı %2.45 olarak belirlenmiştir. Türkoğlu (2004) gerçekleştirdiği çalışmasında 0.1 mg/L kinetin ve 0.1 mg/L 2,4-D içeren MS besin ortamında en iyi kallus rejenerasyonunu %11.1 olarak belirlemiştir. Bu kompozisyonlar ile araştırmamızdaki PB2 besin ortamının kompozisyonu karşılaştırıldığında, bugüne kadar kullanılan bu besin ortamı kompozisyonlarından daha yüksek oranda (%100) kallus rejenerasyonu sağlayan bir besin ortamı belirlenmiştir.

Kararma: Bitki doku kültürlerinde yüksek polifenolik içeriğe sahip olan bitkilerden alınan eksplantlar kültüre aktarıldığında fenolik bileşikler kesilen yüzeye doğru serbest hale geçer. Bu bileşiklerin enzimatik oksitlenmesi ile eksplant üzerinde kararma görülür ve eksplant gelişemez daha sonrasında da canlılığını kaybeder. Yapılan bu çalışmada, bu durumun tam tersi bir özellik gözlenmiştir. Kararan anterler üzerinden krem renkli kallus yığınları gelişmiştir. Özbek-100 çeşidinde karanlık kültür koşulunda (%59) fotoperiyot koşuluna (%36) göre daha yüksek oranda kararma gözlenirken, ön uygulamalı koşulda hiç kararma meydana gelmemiştir. Nazilli-143 çeşidinde ise sadece karanlık kültür koşulunda kararma engellenebilmiştir (%0). Nazilli-143 çeşidinde hem fotoperiyot, hem de karanlık kültür koşullarında büyüme düzenleyicisi konsantrasyonu arttıkça, kararan anter sayılarında da artış olmuştur. En az kararma ise PB2 ortamında kültüre alınan anterlerde (%0) gözlenmiştir. Özbek-100 çeşidinde büyüme

düzenleyicisi konsantrasyonundaki artışla birlikte kararma sayıları artmıştır. Ancak $MgCl_2$ kullanılan PTM ortamındaki kararan anter yüzdesinin (%57:67), aynı kompozisyonun sadece $MgCl_2$ içermeyen formu olan PT ortamındaki kararan anter yüzdesinden (%19.33) daha az olması, $MgCl_2$ 'nin kararmayı arttırdığını göstermiştir. Besin ortamları arasında, kararma ile ilgili belirgin farklılıklar olmamakla birlikte, $MgCl_2$ kullanımının kararmayı arttırdığı tespit edilmiştir.

Ön uygulamanın etkileri: İki çeşide ait anterlerden farklı besin ortamlarında kallus rejenerasyonunun sağlanması adına ön uygulamanın gerçekleştirilmesinin gerekli olup olmadığı incelenmiştir. Özbek-100 çeşidinde daha fazla sayıda kallus oluşturan anter sayısı tespit edilirken, bu oran Nazilli-143 çeşidinde daha düşük bulunmuştur. Elde edilen bu sonuç, genotipin etkili bir faktör olduğunu göstermektedir. Özbek-100 çeşidinde PB2 besin ortamında kültüre alınan ön uygulamalı anterlerin tamamında kallus oluşumu gözlenirken, aynı ortamdaki Nazilli-143 anterlerinde kallus oluşumu gözlenmemiştir. Bu durum kararma oranları için değerlendirilecek olursa, en fazla kararma ön uygulamanın gerçekleştirilmediği Nazilli-143 çeşidinde gözlenmiştir.

Embriyogenez: Özbek-100 çeşidinde karanlık koşulda embriyogenez %31.67 oranında gerçekleşirken, ön uygulamanın gerçekleştirilmesi embriyogenez oranının artmasını sağlamıştır (%48). Nazilli-143 çeşidinde ise ön uygulamanın embriyogenez üzerinde hiçbir etkisi gözlenmezken, fotoperiyot koşulda düşük bir oranda (%25.33) embriyo oluşumu gerçekleşmiştir. PB1, PB2, PB3 ve PB4 ortamları incelendiğinde, 1 mg/L BA ve 1 mg/L NAA içeriğine sahip PB2 besin ortamının embriyo oluşumu teşvik ettiği, ancak artan büyüme düzenleyicisi konsantrasyonlarında olumsuz etkilerin gözlemlendiği elde edilen veriler ışığında ifade edilebilmektedir. PT, PTD ve PTM ortamları incelendiğinde, büyüme düzenleyicisi miktarındaki artış, embriyogenez üzerinde etkili bulunmamıştır. BAP ve NAA varlığının embriyo oluşumu üzerinde etkili olduğu belirlenirken, $MgCl_2$ kullanımının da embriyo oluşumunu azalttığı gözlenmiştir.

Ghaemi et al. (2011) tarafından 4 farklı genotipin Coker 2011 ile karşılaştırılması ile ilgili gerçekleştirilen çalışmada 3 genotipte embriyo eldesi sağlanırken, genotiplerden birinde embriyogenez gerçekleşmemiştir. Termez çeşidinde %22.4-24.6, Hashem abad çeşidinde %1.85-9.73, Sepid çeşidinde

%9.06-22.28 oranında embriyogenez elde edilirken Coker 312’de bu oran %66.66-94.33 şeklinde olmuştur. Kerman çeşidinde ise embriyogenez belirlenememiştir. Tarafımızdan gerçekleştirilen çalışmada ise elde edilen veriler; Özbek-100 çeşidi için %48 ve Nazilli-143 için %25.33 olarak belirlenmiştir. Bu değerler, Coker 312’ye göre düşükken, karşılaştırmaya alınan diğer 3 çeşide göre daha yüksektir.

Zhang et al. (2001)’de gerçekleştirdikleri çalışmada ise 2,4-D’nin somatik embriyo rejenerasyonunda negatif etkileri olduğunu belirtmişlerdir. Aynı şekilde Memon et al. (2010)’da gerçekleştirdikleri çalışma sonucunda 2,4-D’nin olumsuz etkisi olduğunu belirtmişlerdir. Ancak çalışmada elde edilen verilerde kültür koşullarının aynı olduğu durumlarda PTD ve PT besin ortamları karşılaştırıldığında Özbek-100 çeşidi için 2,4-D konsantrasyonu arttıkça embriyo sayısı ortalaması %3’den %9.67’ye artarken, Nazilli-143’de %0.67’den %3’e artmıştır. Bu bilgiler Zhang et al. (2001) tarafından elde edilen bilgilerle farklılık göstererek, 2,4-D’nin somatik embriyogenez üzerindeki etkileri ile ilgili yeni çalışmalar gerçekleştirilmesi gerektiğini göstermektedir.

Çalışma sonucunda gözlenen tüm embriyolar globuler safhadadır ve bitki rejenerasyonu için çalışmalara devam edilmektedir. Türkoğlu (2004) tarafından gerçekleştirilen çalışmada globuler safhada embriyolar elde edilmiş ancak tam bitki rejenerasyonu sağlanamamıştır. İki çalışma sonucunda benzer olarak elde edilen kallusların embriyogenik potansiyellerinin düşük olduğu görüşü benzerlik göstermektedir.

6. SONUÇ

Haploit bitkilerin eldesinin ardından kromozom katlaması yoluyla doubled haploit bitkilerin eldesi, birçok tarımsal üründe sıkça kullanılan önemli bir ıslah tekniğidir. Doubled haploit teknolojisi, geleneksel yöntemlerde gözlenen kendileme olayına ihtiyaç olmadan tek generasyon ile homozigot bitki eldesini sağlamaktadır. Haploit bitkilerin keşfi ve ardından androgenezin uygulanmaya başlamasının ardından yöntem hızla gelişmiş ve ıslah programları çerçevesinde değerlendirilmeye başlanmıştır.

Gerçekleştirilen bu çalışmada, pamuklarda anter kültürlerinde bitki rejenerasyonunun sağlanmasında genotipin, ön uygulamanın, kültür koşullarının ve besin ortamı kompozisyonlarının etkileri incelenmiştir. Ön uygulama olarak tomurcukların 3 gün +4°C'de soğukta bekletilmesi işlemi uygulanmış, kültür koşulları olarak 16 saat aydınlık/ 8 saat karanlık şeklinde ayarlanmış olan fotoperiyot koşulunun yanı sıra, devamlı karanlık koşul da kullanılmıştır. Ayrıca farklı büyüme düzenleyicisi kompozisyonlarında MS besin ortamları da kültüre etkileri açısından incelenmişlerdir.

Çalışma sonucunda elde edilen verilere göre, genotipin kültürden alınan cevap üzerinde çok etkili olduğu belirlenmiştir. Genel olarak Özbek-100 çeşidinde daha fazla kallus ve embriyo oluşumu gözlenmiştir. Yoğun şekilde kallus oluşumunun yanı sıra dolaylı embriyogenez ile en fazla embriyo oluşumunu sağlayan besin ortamı 1 mg/L BA ve 1mg/L NAA içeren PB2 kodlu ortam olmuştur. Bu besin ortamında genel olarak görülen kararma oranı da azdır.

PB2 besin ortamında kallus rejenerasyon oranı Özbek-100 ve Nazilli-143 için %100 olarak belirlenirken, embriyo rejenerasyon oranları Özbek-100 çeşidinde %48, Nazilli-143 çeşidinde ise %25.33 olarak saptanmış. Çalışmada bu şekilde en kısa sürede, daha yüksek kallus rejenerasyonunu ve daha yüksek oranda embriyogenezi sağlayan, anter kültürü çalışmaları için daha verimli bir protokol elde edilmiştir.

Yapılan çalışmada anterler kültüre alınmadan önce gerçekleştirilen ön uygulamanın etkileri incelenmiş, bunun için soğukta bekletme işlemi 3 gün

süreyle uygulanmıştır. İstatistiki analizler sonucunda ön uygulamanın anterlerde dolaylı embriyogenezin sağlanmasında etkili olduğunu gösterdiği gibi, aynı zamanda farklı faktörlerle bir arada olmasının da etkili olduğu belirlenmiştir. Bu durum stres koşullarının dolaylı embriyogenezin teşvikinde etkili olduğunu göstermektedir.

Gerçekleştirilen çalışmada literatürlerden belirtilenin aksine 2,4-D'nin embriyogenezi engellemediği, artan miktarlarının ise embriyogenezi arttırdığı belirlenmiştir. Şimdiye kadar gerçekleştirilen çalışmalarda elde edilenin aksine 2,4-D'nin anter kültüründe embriyogenez üzerine olan etkileri konu ile ilgili yeni çalışmaların yapılması gerektiğini göstermektedir.

Anterlerden gelişen kalluslar PKB5 ortamında altkültüre alındıklarında besin ortamının renginde değişiklikler gözlenmiştir. Bu durum, kallusların bazı metabolitleri ekstraselüler olarak salgıladıklarını göstermektedir. Bu salgının miktarı artıp renk koyulaştıkça da kallusların renklerinde de koyulaşmalar gözlenmiştir.

Bugüne kadar yapılan çalışmalardan farklı olarak gerçekleştirilen bu çalışmada $MgCl_2$ 'nin besin ortamında kullanılmasının anterlerin kararmasını teşvik ettiği, ancak gerçekleşen kararmanın kallus rejenerasyonu ya da embriyogenez üzerinde olumsuz etkiler göstermediği de belirlenmiştir. Elde edilen bu bilgi ile ileride gerçekleştirilecek çalışmalara yeni bir ufuk kazandırılmıştır.

7. ÖNERİLER

Anter kültürü çalışmalarında başarıyı etkileyen pek çok faktör bulunmaktadır. Bu faktörlerin de değerlendirilmeleri ile başarılı sonuç alma yönünde önemli adımlar atılabilecektir. Gerçekleştirilen çalışmada arazi koşullarında yetiştirilen bitkiler kullanılmıştır. Literatür bilgileri, donör bitkinin yetiştirme koşullarının anter kültüründe önemli faktörlerden olduğunu göstermiştir. Bundan sonraki çalışmalarda, serada yetiştirilen bitkilerle arazideki yetiştirilen bitkiler karşılaştırılarak, yetiştirme koşullarının anter kültürü üzerine ne gibi etkileri olduğu incelenmelidir.

Arazide pamuk yetiştiriciliğinde uygun boyutta tomurcuklar Haziran-Eylül ayları arasında elde edilebilmektedir. Ancak sezon içindeki mevsimsel farklılıklar bitki fizyolojisini de etkilemektedir. Gerçekleştirilen bu çalışmada bu farklılıklar ihmal edilmiştir. Ancak bundan sonra gerçekleştirilecek çalışmalarda tomurcukların kültüre alındığı ay bir değişken olarak incelenmelidir.

Gerçekleştirilen çalışmada ön uygulama olarak 3 gün +4°C de soğuk uygulaması gerçekleştirilmiştir. Buna alternatif farklı ön uygulamaların da gerçekleştirilmesi ve embriyogenezin teşviki üzerindeki alternatiflerinin belirlenmesi gerekmektedir. Kültür koşulu olarak aydınlık ve karanlık yöntemler ayrı ayrı kullanılmış ve karşılaştırmalar bu koşullara göre yapılmıştır. Ancak elde edilen veriler alternatif denemelerin gerçekleştirilebileceğini göstermiştir. İlk olarak karanlık kültürde kallus gelişimleri başlatılan kültürlerin daha sonra aydınlık koşullara alınması gibi farklı kültür koşullarının çeşitli kombinasyonları ile yeni denemelerin oluşturulması yerinde olacaktır.

Anterlerden gelişen kallusların altkültüre alınması ile besin ortamına metabolit salgısında artış olmuş, bu durum gözle görülebilir ölçüde gerçekleşmiştir. Eğer bu metabolitlerin analizi yapılır ve embriyogenez üzerindeki etkileri belirlenebilir ise, yol izlerine müdahale edilerek sentezleri azaltılabilir ya da teşvik edilebilir. Bu tip çalışmaların kurulması için sıvı kültürler, iyi birer alternatif yol sunabilir niteliktedir.

Oluşan embriyolardan tam bitki rejenerasyonunun sağlanmasına yönelik protokollerin geliştirilmesi de incelenmesi gereken konular arasındadır. Çalışma sonucunda elde edilen kalluslarda embriyogenez gözlenmiştir, ancak embriyolar globuler safhada kalmış ve gelişmemişlerdir. Bundan sonra gerçekleştirilecek olan çalışmalarda embriyo oluşum aşamaları arttırılmalı ve embriyo gelişimleri üzerine yoğunlaşılmalıdır. Bu amaçla, farklı büyüme düzenleyicisi kombinasyonlarının yanı sıra, besin ortamının mineral madde içerikleri de incelenmelidir. Farklı karbon kaynaklarının embriyogenez üzerindeki etkileri literatürde verilmiştir. Bu doğrultuda farklı karbon kaynaklarının farklı konsantrasyonlarda besin ortamlarına ilave edilmesinin etkileri incelenmelidir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abak, K.**, 1983. Biberde (*Capsicum annuum* L.) anter kültürü yoluyla haploid bitki elde etme üzerinde araştırma. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yıllığı. Cilt: 33, 155-163s.
- Açıkgöz, N., İlker, E. ve Gökçöl, A.**, 2004, Biyoteknolojik Araştırmaların Bilgisayarda Değerlendirilmeleri, E.Ü. Tohum Teknolojisi Uygulama ve Araştırma Merkezi No:2.
- Alkaya, E.** 2010. Lif Pamuk Üretimi Yan Ürünlerinin/Artıklarının Katma Değerli Ürünlere Dönüştürülmesi: Mevcut Uygulamalar ve Teknolojik Gelişmeler. Mersin Üniversitesi 2. Ulusal Katı Atık Yönetimi Kongresi - UKAY 2010.
- Alremi, F., Taşkın, H., Sönmez, K., Büyükalaca ve S., Ellialtıoğlu, Ş.** 2014. Biber (*Capsicum annuum* L.)’de Genotip ve Besin Ortamının Anter Kültürüne Etkileri. Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi 1(2): 108–116s.
- Andrews, J.**, 1985. Peppers. The Domesticated Capsicum. University of Texas.
- Anonim,2014a.**<https://www.uoguelph.ca/plant/research/biotech/haploid/anther.htm> (Erişim tarihi: 6.12.2014)
- Anonim, 2014b.** <http://www.extension.org/pages/10525/cotton-squares-to-bloom/print/#.VIWubjGsXaw> (Erişim tarihi: 8.12.2014)
- Anonim,2014c,**<http://www-plb.ucdavis.edu/labs/rost/cotton/reproduction/fanat.html> (8.12.2014)
- Anonim,2014d.** http://dtsdenizli.awardspace.com/articles.php?article_id=41 (25.12.014)
- Anonim, 2014e,** <http://www.prota4u.org/protav8.asp?p=Gossypium+hirsutum> (Erişim tarihi 29.12.2014)
- Anonim,2014f.**http://www.kahramanmaras.bel.tr/images/stories/Sempozyumlar/kahramanmaras_sempozyumu/c3/17_Yrd_Doc_Dr_Lale_EFE.pdf (Erişim tarihi 29.12.2014)

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Arı, E.**, 2006. Türkiye’de doğal olarak yetişen *Anemone coronaria* var. *coccinea*’da anter kültürü çalışmaları. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı Doktora Tezi (Danışman: Prof. Dr. Saadet BÜYÜKALACA)
- Ata, A.** 2011. Biberlerde (*Capsicum Annuum* L.) Anter Kültüründe Mevsim Etkisi Ve Mikrospor Gelişimi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi (Danışmanı: Prof. Dr. Saadet BÜYÜKALACA)
- Ayaz, M. ve Emiroğlu, Ş. H.** 2003. Bazı Pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) Çeşitlerinde Değişik Koza Olgunluğu Dönemlerinde Yapılan Defoliant Uygulamalarının Etkileri Üzerine Araştırmalar. ANADOLU, J. of AARI 13 (2), 48 – 72 MARA
- Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S.** 2002. Bitki Biyoteknolojisi I: Doku Kültürü ve Uygulamaları. S.Ü. Vakfı Yayınları, Konya.
- Bal, U.**, 2002. Domateste (*Lycopersicon esculentum* Mill.) İzole Edilmiş Mikrospor Kültürü, Ovaryum Kültürü ve *Solanum sisymriifolium* Lam. İle Tozlama Yöntemleri ile Haploid Embriyo Oluşumunun Uyartılması. Doktora Tezi. Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
- Baluch, Z.A.M.**, 1979. *In Vitro* Anther Culture of *Gossypium* Species.The Pakistan Cottons, Pakistan Central Cotton Committee, Karachi, January, 161- 162p.
- Bhojwani, S.S. and Razdan, M.K.**, 1996. Haploid Production. Studies in Plant Science, 5. Plant Tissue Culture: Theory and Practice, A Revised Edition. Elsevier.
- Bürün, B. ve Emiroğlu, Ü.** 2008. A Comparative Study on Colchicine Application Methods in Obtaining Doubled Haploids of Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). Turk J Biol 32 (2008) 105-111s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chawla, H. S.**, 2002. Introduction to Plant Biotechnology, Science Publishers, Inc., Enfield, NH, USA.
- Chuong, P.V., and Beversdorf, W.D.**, 1985. High frequency embryogenesis through isolated microspore culture in *Brassica napus* L. and *B. Carinatabraun*. Plant Science, Volume 39, 3:219-226p.
- Çetin, F. ve Karadeniz, E.**, 2013. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı GAP Uluslararası Tarımsal Araştırma ve Eğitim Merkezi. Tarımsal Ekonomi ve Politika Araştırmaları Bölüm Başkanlığı Pamuk Raporu / Nüsha 2.
- Davidonis, G. and Hamilton, R.H.**, 1983. Plant Regeneration from Callus Tissue of (*Gossypium hirsutum* L.) Plant Science Letters, 32: 89-93p.
- Darlington, C.D. and L.F. La Cour.** 1962. The handling of chromosomes. 4th ed. Hafner Publishing Co., New York.
- Ekici, N.** 2006. *Leucojum aestivum* L.'da Sitolojik ve Sitoembriyolojik Çalışmalar. Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Hücre Biyolojisi Programı Doktora Tezi (DANIŞMAN: Doç. Dr. Feruzan DANE)
- Ellialtıoğlu, Ş., Başay, S., Kuşvuran, Ş.** 2012. Patlıcanda Polen Dimorfizmi ve Anter Kültürü İlişkisinin İncelenmesi. Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi 5 (1): 149-152. ISSN: 1308-3945
- Ellialtıoğlu, Ş., Sarı, N. ve Abak, K.**, 2001. Haploid Bitki Üretimi (M.Babaoğlu, E. Gürel, S. Özcan, editörler), Bitki Biyoteknolojisi-I.Doku Kültürü ve Uygulamaları. S.Ü.Vakfı Yayınları, Konya,syf:137-189s.
- Ellialtıoğlu, Ş., ve Tıpırdamaz, R.**, 2002. Soğuk uygulamaları ve aktif kömürün biberde (*Capsicum annuum* L.) Anter Kültürü Süresince Absisik Asit Miktarındaki Değişim Üzerine Etkisi. Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi; 15(1):9-18s.
- Emiroğlu, Ü.** 1982. Haploidi ve Bitki Islahındaki Önemi, E.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları, No:450, Ofset Basımevi, Bornova-İzmir

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Finer, J. J., Reilley, A. A. and Smith, R. H.** 1983. Stimulation of Somatic Embryogenesis in Cotton (*Gossypium klotzschianum* Anders.). *In Vitro*, 19(3 II): 250.
- Finer, J.J.** 1988. Plant Regeneration from Somatic Embryogenic Suspension Cultures of Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Reports*, 7(6): 399-402p.
- Firoozabady, E. and DeBoer, D.L.,** 1993. Plant regeneration via somatic embryogenesis in many cultivars of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 29:166-173p.
- Gamborg, O. L., Miller, R. A. and Ojima, K.,** 1968. Nutrition Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells, *Experimental Cell Research*, 50: 151-159p.
- Gawel, N.J. and Robacker, C.D.,** 1990. Genetic Control of Somatic Embryogenesis in Cotton Petiole Callus Cultures. *Euphytica*, 49: 249-253p.
- Gençer, O., Özüdoğru, T., Kaynak, M.A., Yılmaz, A. ve Ören, N.** 2005. Türkiye’de Pamuk Üretimi ve Sorunları. VI. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi, Ankara.
- George, E.** 1996. Plant Propagation by Tissue Culture. Part 2: In Practice. 2. Edition. Exegetics Limited.
- Ghaemi, M., Majd, A., Fallahian, F. and Bezdi, K.G.** 2011. Comparison of callus induction and somatic embryogenesis of some Iranian cottons (*Gossypium* Spp.) with Coker 312 and histology of somatic embryogenesis. *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(15), 2915-2922pp.
- Gürel, A., Tosun, M., Demir, İ. ve Friedt, W.,** 1992. Arpa Islahında Haplodoidi Teknikleri ve Anter Kültürünün Önemi, 2. Arpa-Malt Semineri, 25-27 Mayıs, Konya. 312-326s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gürel, A. ve Sezener, V.** 2012. Recent Devolepments in Cotton Breeding and Biotechnology Fields in Turkey, International Cotton Advisory Committee. (<https://www.icac.org/wp-content/uploads/2012/11/01-ICAC-Antalya-Sunu-1-5-SON.pdf>)
- Hamaoka, Y., Fujita, Y. and Iwai, S.** 1991. Effects of temperature on the mode of pollen development in anther culture of *Brassica campestris*. *Physiologia Plantarum* Vol. 82, Issue 1, 67–72p.
- Han, D.S. and Niimi, Y.,** 2005. Production of Haploid and Doubled Haploid Plants from Anther-derived Callus of *Lilium formosanum*. *Proc. IXth Intl. Symp. on Flower Bulbs* Eds.: H. Okubo, W.B. Miller and G.A. Chastagner *Acta Hort.* 673.
- Hatipoğlu, R.,** 1997. Bitki Biyoteknolojisi. Ç.Ü.Z.F. Genel Yayın No:190, Ders Kitapları Yayın No: A-58, Adana. 178s.
- Heberle-Bors, E.,** 1985. *In vitro* Haploid Formation From Pollen: A Critical Review. *Theoretical and Applied Genetics.* 71: 361-374p.
- Heiser, C.B. Jr.,** 1976. Peppers, In *Evoluation of Crop Plants.* (Edited by N. W.Simmonds, 1986). Longman Sci.& Tech. Report, 265-268p.
- Hemphill, J.K., Maier, C.G.A. and Chapman K.D.,** 1998. Rapid *in vitro* Plant Regeneration of Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Reports* 17: 273-278p.
- Islam, S.M.S.** 2010. The effect of colchicine pretreatment on isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Australian Journal of Crop Science,* Vol. 4, No. 9, 660-665p., ISSN 1835-2693
- Jia, Y., Zhang, Q.X., Pan, H.T., Wang., S.Q., Liu, Q.L. and Sun, L.X.,** 2014. Callus induction and haploid plant regeneration from baby primrose (*Primula forbesii* Franch.) anther culture. *Scientia Horticulturae* 176, 273–281p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jones, G.D. and McCurry, H.** 2012. Differentiating pollen from four species of *Gossypium*. *Palynology* Vol. 36, No. 1, 80–85p.
- Kaya, Z.,** 2001. Bitki Biyoteknolojisi I Doku Kültürü Uygulamaları sayfa XIV
- KGM,** 2013. 2012 Yılı Pamuk Raoru, T.C. Gümrük Ve Ticaret Bakanlığı Kooperatifçilik Genel Müdürlüğü.
- Kim, M., Kim, J., Yoon, M., Choi, D-Ii. and Lee, K-M.,** 2004. Origin of Multicellular Pollen and Pollen Embryos in Cultured Anthers of Pepper (*Capsicum annuum*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77: 63-72p.
- Kott, L.S., Polsoni, L., Ellis, B., and Beverdorf, W.D.,** 1988. Autotoxicity in Isolated Microspore Cultures of *Brassica napus*. *Canadian Journal of Botany*, 66: 1665-1670p.
- Li, X. L., Wen, L. Y., Guo, X. M., Li, E. L. and Shi, C. M.,** 1989. Study on Regeneration of Cotton Plants through Somatic Cultures. *China Cottons*. 6:13-15p.
- Mascarenhas, J.P.,** 1990. Gene activity during pollen development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.*, 41: 317–338p.
- Mavromatis, A.G., Vlachostergios, D.N. and Roupakias, D.G.,** 1998. Haploid Induction in Cotton: A Future Perspective. *FAO Interregional Cooperative Research Network on Cotton, Meeting of Working Group 9., 6-12 September, Athens-Greece*, 134-139p.
- Memon, S., Mari, S.N., Mari A.K. and Gaddi, N.H.** 2010. Induction of Callus Through Anther and Ovule Culture in Upland Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) *World Appl. Sci. J.*, 8 (Special Issue of Biotech. & Genet. Engineer.): 76-79 p.
- Mishra, R., Wang, H.Y., Yadav, N. R. and Wilkins T.A.,** 2003. Development of a Highly Regenerable Elite Acala Cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. Maxxa) – A Step towards Genotype-Independent Regeneration Plant Cell , *Tissue and Organ Culture* 73: 21–35p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mityko, J., Andrasfalvy, A., Csillery, G. and Fari, M.,** 1995. Anther culture response in different genotypes and F1 hybrids of pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Breeding, 114: 78-80p.
- Morre, J.L., Permingeat, H.R., Romagnoli, M.V., Heisterbor, C.M. and Vallejos, R.H.,** 1998. Multiple Shoot Induction and Plant Regeneration from Embryogenic Axes of Cotton. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 54 (3) 131-136p.
- Murashige, T., and Skoog, F.,** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant, 15:473-497p.
- Murovec, J. and Bohanec, B.** 2012. Haploids and Doubled Haploids in Plant Breeding, Plant Breeding, Dr. Ibromkhim Abdurakhmonov (Ed.), ISBN: 978-953-307-932-5
- OGTR,** (Australian Government Department of Health and Ageing Office of the Gene Technology Regulators). 2008. Australian Government Department of Health and Ageing Office of the Gene Technology Regulators.
- Oosterhuis, D.M. and Cothren, J.T.** 2012. FLOWERING AND FRUITING IN COTTON. (Executive Editor and Publishing Coordinator ROBERTSON, W. C.) The Cotton Foundation Cordova, Tennessee, U.S.A.
- Ozias-Akins, P. and Vasil, I.K.,** 1985. Nutrition of plant tissue culture. In: Cell culture and somatic cell genetics of plants. Vol:2, IK VASIL, ed. Academic Press Inc. George (1996)
- Özkan, İ ve Kaynak, M.A.** 2009. Farklı pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) Çeşitlerinde Gün-Derece Değerlerinin, Verim, Verim Unsurları ve Lif Kalite Özelliklerine Etkinin Saptanması. ADÜ Ziraat Fakültesi Dergisi; 6(2): 39-42s.
- Pathi, K. M. and Tuteja, N.** 2013. High-frequency regeneration via multiple shoot induction of an elite recalcitrant cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv Narashima) by using embryo apex. Plant Signaling & Behavior 8:1.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Patil, S.B. and Khadi, B.M.** 1997. Anther culture studies in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). J. Cotton Res. Dev. 11 (2).134-137p.
- Pierik, R.L.M.,** 1987. *In Vitro* Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 344p.
- Rao, A.Q., Hussain S.S., Shahzad M. S., Bokhari S. Y. A., Raza M. H., Rakha A., Majeed A., Shahid A. A., Saleem Z., Husnain T. and Riazuddin S.** 2006. Somatic embryogenesis in wild relatives of cotton (*Gossypium spp.*). Journal of Zhejiang University SCIENCE B. 7(4):291-298p. ISSN 1673-1581.
- Reynolds, T.L.,** 1997. Pollen Embriyogenesis (Review). Plant Molecular Biology. 33: 1-10p.
- Sakhanokho, H. F., Ziph, A., Rajasekaran, K., Saha, S. and Sharma, G. C.,** 2001. Induction of Highly Embryogenic Calli and Plant Regeneration in Upland (*Gossypium hirsutum* L.) and Pima (*Gossypium barbadense* L.) Cottons. Crop Science, Vol. 41:1235-1240.
- Senechal, N.P., El-Zik, K.M. and Trolinder, N.L.** 1994. Inheritance of 126 Somatic Embryogenesis In Upland Cotton. Reprinted from Proceedings of the 1994 Beltwide Cotton Conferences, 706p.
- Sezener, V., Barut, A., Özkan, İ., Erdoğan, O., Göre, M. E.** 2008. Ülkesel Pamuk Çeşitlerinin Geliştirilmesin Moleküler Yöntemlerin Kullanılması (Çatı Proje) Verticillium İçin Yeni İşaretleyici Geliştirme (Alt Proje). PROJE NO: TAGEM/TA/04/02/02/008
- Shtereva, L.A., Zagorska, N.A., Dimitrov, B.D., Kruleva, M.M. and Oanh, H.K.,** 1998. Induced Androgenesis in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). II. Factors Affecting Induction of Androgenesis. Plant Cell Reports. 18: 312-317p.
- Sirtioğlu, İ.** 2014. 2014 Turkey Cotton and Products Annual Report. (App. by: Jess K. Paulson). Gain Report Number: TR4010. Global Agricultural Infirmatin Network.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Slama-Ayed, O., De Buyser, J., Picard, E., Trifa, Y. and Amara, H.S.,** 2010. Effect of pre-treatment on isolated microspores culture ability in durum wheat (*Triticum turgidum* subsp. *Durum* Desf.). *J. Plant Breed. Crop Sci.* 2: 30-38p.
- Summers, W.L., Jaramillo, J. and Bailey, T.,** 1992. Microspore Developmental Stage and Anther Length Influence the Induction of Tomato Anther Callus. *Hortscience*, 27 (7): 838-840p.
- Testillano, P.S., Gonzales-Melendi, P., Ahmadian, P., Fadon, B. and Risueno, M.C.,** 1995. The immunolocalization of nuclear antigens during the pollen developmental program and the induction of pollen embryogenesis. *Exp. Cell Res.* 221: 41-54p, 1995.
- Touraev, A., Vicente, O. and Heberle-Bors, E.,** 1997. Initiation of Microspor Embryogenesis by Stress. *Trends in Plant Science Vol:2* (8): 297-302p.
- Trolinder, N.L. and Xhixian, C.,** 1989. Genotype Specificity of the Somatic Embriyogenesis Response in Cotton. *Plant Cell Reports*, 8: 133-136p.
- Trolinder, N. L. and Goodin, J. R.,** 1988a. Somatic Embriyogenesis in Cotton (*Gossypium*) . II. Requirements for Embryo Development and Plant Regeneration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, V.12 (1) 43-53p.
- Trolinder, N. L. and Goodin, J. R.,** 1988b. Somatic Embriyogenesis in Cotton (*Gossypium*) . I. Effects of Source of Explant and Hormone Regime . *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, V.12 (1) 31-42p.
- Turaev, A.M., and Shamina, Z.B.,** 1985. Optimization of the Medium for Cotton Anther Culture. K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow.
- Türkoğlu, Ş.R.,** 2004. Pamukta (*Gosypium hirsutum* L.) *İn Vitro* Rejenerasyon Olanakları Üzerine Araştırmalar, Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 129s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wang, J.Z., Li, K.Q., Zhang, D.L., Hao, L.F., Guo, D.Z., Liu, Q.H., Xiao, Y.P. and Zhang, S.F.** 1994. Variation and high frequency somatic embryogenic callus *Gossypium hirsutum*. *Acta Plant Sinica* 36(5): 331-338p.
- Wu, F. A., He, Z. Y., Zong, Q. L. and Song, Q. Q.,** 1992. The Role of Genotypes in Cotton Tissue Culture. *China Cottons*, 4:13-14p.
- Zamir, D., Jones, R.A. and Kedar, N.,** 1980. Anther Culture of Male-Sterile Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Mutants. *Plant Science Letters* 17: 353-361p.
- Zhang, B., Feng, R., Li, X. and Li, F.,** 1996. Anther Culture and Plant Regeneration Cotton (*Gossypium klotzschianum* Anderss). *Chinese Science Bulletin*, 41(2):145-148p.
- Zhang, B., Feng, R., Li, F., Li X. and Li, F.,** 1998. Plant Regeneration from Anther Culture Cultivated and Wild Species of *Gossypium* Genus. *World Cotton Research Conference-2*, 6-12 Sep. Athens-Greece, 103p.
- Zhang, B.H., Liu, F., Yao, C.B. and Wang, K.B.** 2000. Recent progress in cotton biotechnology and genetic engineering in China. *Current Science*, Vol. 79, No. 1.
- Zhang, B.H., Feng, R., Liu, F., Wang, Q.** 2001. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration of an elite Chinese cotton variety. *Bot. Bull. Acad. Sin.* (2001) 42: 9-16p.
- Zhang, X., Ye, Z., Wang., T., Xiong, H., Yuan, X., Zhan, Z., Yuan and Y., Liu, Z.** 2014. Characterization of the global transcriptome for cotton (*Gossypium hirsutum* L.) anther and development of SSR marker. *Gene* 551. 206–213p.
- Zhu, S.J., Li, L., Chen, J.H., He, Q.L., Fang, X.X., Ye, C.Y., Yan, S.F., Huang, Z.R. and Mei, L.** 2011. Advance in researc and utilizatio of cotton biotechnology in China. *Plant Omics Journal* 4(6):329-338p. ISSN: 1836-3644

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Zimmerman, T.W. and Robacker, C.D.**, 1988. Media and Gelling Agent Effect on Cotton Callus Initiation from Excised seed Hypocotyls. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 15: 269-274p.
- Zülkadir, G. ve Bölek, Y.** 2014 Bazı Pamuk Genotiplerinde Lif Kalite Özellikleri Bakımından Fenotipik Analizi. Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi. Cilt 3(1). 56-68p.

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Manisa’da doğdu. Lise öğrenimini Kırklarelin’in Lüleburgaz ilçesinde Lüleburgaz Anadolu Lisesi’nde tamamladıktan sonra 2007 yılında Ege Üniversitesi, Mühendislik fakültesi, Biyomühendislik Bölümü’nü kazandı. 2011 yılında lisans öğrenimini tamamlayarak Biyomühendis ünvanını aldı. 2012 yılında Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsüne bağlı Biyomühendislik Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisansa başladı. 2014 yılında Ahi Evran Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümüne Arş. Gör. olarak atandı.