



Pamukta (*Gossypium* spp.) *in vitro* koşullarda farklı hormon konsantrasyonlarının anter kültürü ile embriyo oluşumuna etkisi

The effect of different hormone concentrations on anther culture and embryo formation *in vitro* conditions in cotton (*Gossypium* spp.)

Medet Korkunç¹, Adem Bardak², Remzi Ekinci³, Kamil Haliloğlu⁴

¹Dicle Üniversitesi, Diyarbakır Tarım Meslek Yüksekokulu, Tohumculuk Programı, Diyarbakır,

²Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Kahramanmaraş,

³Dicle Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Diyarbakır,

⁴Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Erzurum,

MAKALE BİLGİSİ

Geliş Tarihi: 20.11.2017
Revizyon Tarihi: 27.12.2017
Kabul Tarihi: 31.12.2017
Elektronik Yayın Tarihi: 31.12.2017
Basım: 31.12.2017

ÖZET

Çalışmanın amacı pamukta anter kültürü tekniğini kullanarak olgunlaşmamış taraklardan alınacak anterlerin uygun besi ortamlarında kültüre alınması ve embriyoların elde edilip sürgün oluşumunun bitkiciğe dönüşmesinin sağlanmasıdır. Pamuk bitkisinin üç farklı çeşidi, Aşkabat-100 (*Gossypium barbadense* L.), Coker-312 ve Stoneville-468 (*Gossypium hirsutum* L.)'den alınan taraklar kallus indüksiyonu için çalışılmıştır. Araştırmada farklı boylardaki olgunlaşmamış çiçek tomurcuklarından alınan pamuk anterleri (2, 3, 4 ve 5 mm) kullanılmıştır. Aseptik koşullarda anterler yüzey sterilizasyonuna tabi tutulduktan sonra, anterlerdeki olgunlaşmamış mikrosplar, izole edilerek kallus indüksiyonu için bitki büyüme düzenleyicisi içeren besi ortamlarına aktarılmıştır. Ekimler bittikten sonra petri kaplarının kapakları kapatılıp, içerisine hava giriş - çıkışını engellemek için parafilmle kapatılıp, ardından iklim odasında 30-60 gün aralığında karanlığa bırakılmıştır. Aşkabat-100 çeşidinde farklı uzunluktaki anterlerde en yüksek oranda embriyoid kallus 2 mm uzunlukta (97.00), Stoneville-468 çeşidinde en yüksek 5 mm uzunlukta (72.63), Coker-312 çeşidindeki anterlerde en yüksek embriyoid kallus oluşumu 3 mm anter uzunluğunda (55.80), başlatılan kültürlerde elde edilmiştir. Araştırma sonucunda, Aşkabat-100 çeşidi embriyoid kallus, embriyoid ve embriyo oluşumu için en uygun sonuçları vermiştir. Daha sonra embriyoya dönüşen embriyoid kalluslar için en iyi değerler, hormonsuz (90.73) 0.1-0.5 mg/l kinetin ilaveli (76.00-61.60) ve 2.0 mg/l 2,4-D ilaveli (97.00), ortamlarda ölçülmüştür. En yüksek embriyo ve sürgün oluşumu (66.47) 0.5 mg/l kinetin içeren besi ortamında gerçekleşmiştir. Embriyonun globüler, kalp, torpedo ve kotiledon evrelerine ait görüntüler elde edilmiştir. Daha sonra embriyoların olgunlaşmasıyla çoğaltılmış, çimlenme meydana gelmiştir ve 0.5-10 cm uzunluklarında sürgün elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: : Doku Kültürü, Tarak, Anter, Kallus ve Pamuk.

ABSTRACT

The aim of the study is taking the anthers obtained from immature combs to culture in appropriate feeding conditions by using the anther culture technique in cotton and ensuring that the offshoots grow into plantlet from previously obtained embryos. Squares taken from three different types of cotton plant, Ashkabat-100 (*Gossypium barbadense* L.), Coker-312 ve Stoneville-468 (*Gossypium hirsutum* L.) are studied for callus induction. In the research, cotton anthers taken from immature flower buds of different lengths (2, 3, 4, 5 mm) are used. After being subjected to surface sterilizations in aseptic conditions, the immature microspores in the anthers are isolated and transferred into feeding environments containing plant growth regulators for callus induction. After the seeding is over, the lids of the petri dishes are closed, they are covered with a parafilm to prevent air inflow and outflow and later they are left for dark in the climate room for about 30-60 days. In the initiated cultures; in different length anthers, in Ashkabat-100 type, the maximum rate of embriyoid callus obtained is at 2 mm (97.00), in the Stoneville-468 type at 5 mm length (72.63) and in the Coker-312 anther the highest rate of embriyoid callus formation obtained is at 3 mm anther length (55.80). As a result of the research, Askabat-100 type produced the best results for embriyoid callus, embriyoid and embryo formation. For embriyoid calluses later turning into embriyoids, the most suitable values are measured in non-hormone (90.73) 0.1-0.5 mg/l kinetin supplemented (76.00-61.60) and 2.0 mg/l 2,4-D supplemented (97.00) environments. The highest embryo and offshoot development has been realized in feeding environments containing (66.47) 0.5 mg/l kinetin. Embryo images for globular, heart, torpedo and kotiledon phases are obtained. After that, reproduction with maturing embryos and germination was observed and 0.5-10 cm length offshoots were obtained.

Key Words: Tissue Culture, Square, Anther, Kallus and Cotton

1. Giriş

Pamuk, dünya üzerinde hem tropik, hem de subtropik bölgelerde yaygın olarak ekimi yapılan bir sıcak iklim endüstri bitkisi. Tohumlarında % 17-24 oranında yağ bulunması, bu bitkinin yağ sanayi yönünden de çok önemli bir bitki durumuna gelmesine neden olmuştur. Pamuk yağı, margarin ve sıvı yağ endüstrisinin en önemli ham maddelerinden biridir. Aynı zamanda pamuk tohumu, içerdiği yağ asitleri sayesinde, balık ve kümes hayvanları yemi, organik gübre, sabun, gliserin, kauçuk, plastik, fungusit, insektisit, kozmetik v.b. maddelerin yapımında da kullanılmaktadır. Çok yaygın olmamakla birlikte, *in vitro* kültür teknikleri, pamuğa ilişkin bazı sorunların çözümü için kullanılmaktadır. Kültürü yapılan pamuk çeşitleri yabancı tozlanma ve çirçirleme sırasında mekanik tohum karışımı nedeniyle hızlı şekilde dejenere olmaktadır. Bu nedenle, çeşitlerin genetik safiyetinin ve özellikle gen kaynağı koleksiyonlarının sürdürülmesi çok önemlidir. Klonal çoğaltma genotiplerinin safiyetini korumak için yardımcı olmakla birlikte, pamukta vejetatif üretim yoluyla konvensiyonel çoğaltma metotları yeterince hızlı ve güvenilir değil ve *in vitro* çoğaltma, metotları mikro çoğaltma için uygulanabilmektedir [1].

Haploid bitkilerin elde edilmesinde oldukça yoğun bir çalışma ve araştırma özenine ihtiyaç duyulmaktadır. Özellikle pamuk bitkisinde bu tekniğin başarılı örnekleri henüz saptanamamıştır. Bu durum, pamuk ıslah programlarının başarısını büyük oranlarda etkilemektedir. Bu alanda yapılacak yoğun çalışmalar ile sağlanacak başarılı sonuçlar, bu tekniğin uygulanmasını ve pamuk ıslahında önemli büyük avantajlar sağlayacaktır. Bu çalışmalar ile var olan sorunlar çözüm bulabilecektir. Ayrıca haploid ve diplohaploid (DH) bitkiler mutasyon, gen haritalaması, genomik ve transformasyon çalışmalarında kullanılabilir. Çünkü, bu materyaller ekonomik olarak önemli tarımsal özelliklerine ait genlerinin lokasyonları ve QTL (Quantitati ve Trait Locus)'leri üzerine güvenilir bilgi elde etmek için en iyi materyaldirler [14]. Haploidler ve DH'leri elde etme yeteneği, polen gelişim ve fonksiyonunun yeniden programlanması ve manipülasyonu ile de ilgili olan bitki ıslah ve genetiğinde polen biyoteknolojisinin en önemli uygulamalarından birisidir [12]. Erkek gametlerden bitki rejenerasyonu Solanaceae, Cruciferae ve Gramineae familyalarına ait 200'den fazla bitki türünde rapor edilmesine rağmen, birçok baklagil ve odunsu bitkinin hemen hemen bütün türlerinde rapor edilmemiştir [2-3-4-5-6-7-10-15].

Daha önce yapılan çalışmalarda polen gelişim aşamasının genellikle asetokarmin metodu ile çiçek tomurcuğundaki bir anterde test edildiği, farklı gelişim safhalarındaki anterler toplanılır asetokarmin boya solüsyonuyla (% 45'lik asetik asit içerisinde % 1 asetokarmin) muamele edilerek polen gelişim safhasının belirlendiği. DAPI (4,6 diamidino-2-2 fenilindoldihidroklorit) floresan boyasının da polen gelişim aşamasının belirlenmesinde kullanılabilir olduğu [11]; anter kültüründe besi ortamı katılaştırıcısı olarak genellikle ağarın yanında patates, buğday, mısır, arpa nişastası, gelritagaroz ve fikol gibi

katılaştırıcılarında kullanıldığı ve yarı katı besi ortamının yanında bazı bitki türlerinde sıvı besi ortamı ve iki aşamalı sıvı besi ortamının da anter kültürü çalışmalarında kullanıldığı [8]; anter kültürlerinin genellikle 24-27 °C arasında inkübe edildiği, 14-24 saat fotoperiyotta ışığa maruz bıraktıklarını ve farklı bitki türleri için farklı kültür koşulları rapor edilmişse de çalışılan her yeni bitki genotipi için kültür koşullarının optimize edilmesi gerektiği bildirilmiştir [9]. Turaev and Shamina [13] Pamukta anter kültürü için besi ortamı kompozisyonunu optimize etmek amacıyla yürüttükleri çalışmada, farklı üç pamuk (*Gossypium hirsutum*L.) hattı'na ait tek çekirdekli dönemde mikrosporer içeren anterleri kinetin ve 2,4-D'nin (0.1 mg/l ve 2.0 mg/l) iki farklı konsantrasyonunda (% 1 ve %5) glukoz içeren agar ile katılaştırılmış Nitsch ortamlarında kültüre alınmış kinetin kallus oluşumu için çok fazla gerekli olmadığı; ancak diğer faktörlerle kombinasyon halinde iken pozitif etkiler ortaya çıkardığı; 2,4-D'nin tüm incelenen hatlarda kallus indüksiyonunu sınırlayan bir faktör olduğu 2.0 mg/l konsantrasyonunda kallus indüksiyonunda pozitif bir etkiye sahip olduğu; glukozun % 3'ü geçmemek üzere gerekli olduğu % 5-10 glukozda, tüm hatlarda kallus oluşumunun inhibe olduğu; incelenen hatlar arasında androgenesis yönünden 3 dikkate değer genotipik farklılık bulunduğu bildirilmiştir.

Bu çalışmada, uygun ortam koşulları sağlanması, anter kültürü tekniği ile embrioidleri verebilecek kallus oluşturulması, daha sonra embrioidlerin çoğaltılıp embriyolara dönüşmesini sağlanması ve kısa sürede embriyoları olgunlaştırılıp sürgün elde edilmesi amaçlanmıştır. Şu ana kadar pamuk bitkisinde bu konuda pek fazla başarı elde edilememiş olması, çalışmamızın önemini arttırmaktadır. Ayrıca, anter kültürü ile elde edilecek sonuçların getirileri düşünüldüğünde çalışmamızın hem bitki ıslahçılara ve hem de tohumculuk sektörüne katkılar sağlayacağı kanaatine varılmıştır.

2. Gereç ve Yöntem

G. barbadense L. (Aşkabat-100) ve *G. Hirsutum* L. (Coker 312 ve Stoneville-468) türlerine ait 3 genotip, çalışmada materyal olarak kullanılmıştır.

Her bir genotipten tarlada koşullarında tohum ekimi yapılmıştır. Tohumların çimlenmesi ve bitkilerin büyümesi için gerekli diğer tüm (sulama ve bakım) işlemler zamanında gerçekleştirilmiştir.

Taraklanma başlangıcından sonra genotiplerden 100'er adet tarak alınmıştır. Alınan taraklar kumpas ile ölçülmüş 2 mm, 3 mm, 4 mm ve 5 mm olmak üzere sınıflandırılmıştır. Anterler kültüre alınmadan önce taraklar buzdolabında +4°C'de 1 gün süreyle bekletilmiştir. Seçilen taraklar yüzey sterilizasyonu için ilk olarak % 80'lik otoklavlanmış saf su, sonra % 20'lik hypo solüsyonu ve üzerine 3 damla tween 20 damlatılarak 15 dakika çalkalanmış ve son olarak steril saf su ile 3 kez durulama işlemi yapılmıştır. Bu çalışmada daha önceden hazırlanmış olan MS (Murashige ve Skoog, 1962) besi ortamı ve oksin türevleri NAA, IBA ve 2,4-D nin farklı

konsantrasyonları ile sitokinin türevlerinden Kinetin, BA ve TDZ' nin farklı besi ortamlarına her bir petri kabına 5 adet anter gelecek şekilde ve 3'er farklı tekerrür olarak şekilde steril edilen bistüri ve pens yardımıyla ekimleri yapılmış, petri kaplarının kapakları kapatılıp, içerisine hava giriş - çıkışını engellemek için parafilmle kapatılıp, iklim odasında 60 gün aralığında karanlığa bırakılmıştır. 8 haftalık karanlık ortam inkübasyonundan sonra embriyodleri veren kallus büyüklükleri, embriyoid ve embriyo rejenerasyon oranları belirlenmiştir.

Araştırmada elde edilmiş gözlemlere ait değerlerin varyans analizleri tesadüf parselleri deneme desenine göre JMP 2.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır. Faktör ortalamaları arasındaki farklılıklar LSD testine ($p < 0.05$) göre analiz edilmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. Genotip ve anter uzunluğunun embriyoidkallus oluşumuna etkisi

Yapılan ön çalışmalardan sonra ekimde direkt olarak 2.0 mg/l 2,4-D bitki büyüme düzenleyicisi kullanılmasıyla 60 günlük inkübasyon sonucunda embriyoid kallus ve embriyoid yapıları oluşmuştur. Alt kültürler sonucunda embriyoid ve embriyo oluşumu aşamaları görülmüştür. Dolayısıyla çalışmamızda ilk anter ekiminde embriyoid kallus oluşturmak için direkt 2.0 mg/l 2,4-D oksinin türevi tek başına MS besi ortamında kullanılmış, pH'sı 5.8 ve ortamın agar oranı ise 6.4 gr olarak belirlemiştir.

Tarlada yetiştirilen *G. Barbadosense* L. (Aşkabat-100), *G. Hirsutum* L. (Coker-312 ve Stoneville-468) pamuk genotiplerinden embriyoidkallus üretmek için, anter büyüklüğünün embriyoid kallus üretimine etkisi çalışılmıştır. 16 haftalık kültür süresi sonucu kallus ve embriyoid kallus geliştiren kültürler belirlenmiştir.

Yapılan analiz sonucunda genotipler, anter uzunluğu ve Genotip*anter uzunluğu interaksyonları arasındaki fark $p < 0.01$ önem düzeyinde önemli olduğu bulunmuştur (Çizelge 1).

Genotip ve anter uzunluğunun embriyoid kallus kültürü başlatması etkisi üzerine ortalama karşılaştırmaları Çizelge 2'de verilmiştir. Embriyoid kallus geliştiren anter ortalama oranları 21.97 ile 76.00 adet arasında değişmiştir. En yüksek embriyoid kallus oluşumu ortalama 53.70 adet ile Stoneville-468 genotipinde olurken, en düşük 42.57 adet ile Coker-312 çeşidinde oluşmuştur. Anter uzunlukları interaksyonlarına baktığımızda en yüksek embriyoid kallus oluşumu 4 mm'de Stoneville-468 genotipi verirken, diğer genotipler 5 mm anter uzunluğunda vermiştir. 4 haftalık kültür süresi sonucu, farklı anter büyüklüğündeki kültürlerde pro-embriyoid kallus oluşumu da gözlenmiştir. Ayrıca, 8 haftalık kültür süresi sonucu gelişen embriyoid kalluslardan, kallusun köken aldığı dokuya bağlı olarak farklı oranlarda pro-embriyoid kallus dokusu oluşumu gözlenmiştir (Çizelge 2).

Bu embriyoid ve embriyolardan sürgün ve sürgün benzeri yapılar oluştuğu binoküler mikroskop ve stereo mikroskopta görüntüleri elde edilmiştir.

Çizelge 1: Genotip ve anter uzunluğunun embriyojenikkallus kültürü başlatılması özelliğine ilişkin varyans analiz tablosu

Varyasyon Kaynakları	SD	KT	KO	F Değeri
Genotip	2	368.91259	184.456	27.4661**
Anter uzunluğu	3	843.76049	281.253	41.8796**
Genotip x anter uzunluğu	6	756.12567	126.021	18.7649**
Hata	24	161.1785	6.716	
Genel	35	2129.9772		
CV (%)	5.99			

*: $P < 0.05$ düzeyinde istatistiki olarak önemli/farklı; **: $P < 0.01$, düzeyinde istatistiki olarak önemli/farklı

Çizelge 2: Genotip ve anter uzunluğunun embriyoidkallus kültürü başlatılması özelliğine ilişkin ortalama değerleri

Anter Uzunluğu (mm)	Genotipler			Embriyoidkallus Ortalaması (%)
	Aşkabat-100	Coker-312	Stoneville-468	
2	43.60 de	21.97 f	39.67 e	35.08 d
3	51.53 bc	40.50 e	40.83 ef	44.28 c
4	43.43 de	49.17 cd	76.00 a	56.20 a
5	45.73 cde	52.07 bc	58.33 b	52.04 b
Ortalama	46.86 b	42.54 c	53.70 a	46.90
LSD _{0,05}	Genotip			2.1835
	Anter uzunluğu			2.5213
	Genotip x anter uzunluğu			4.3670

*Aynı harfler istatistiki olarak aynı grupta yer almaktadır.

3.2. Genotip ve anter uzunluğunun embriyoid elde edilmesine etkisi (birinci alt kültür)

Bitki büyüme düzenleyicilerinden 2.0 mg/l 2,4-D konsantrasyonu kullanılarak 8 hafta sonunda oluşan embriyoid kallus ve embriyoidlerin aynı konsantrasyonda aynı besi ortamında alt kültüre aktarılmasıyla 6-8 haftalık alt kültür sonunda embriyoid gelişimi ve embriyoid oluşumu etkisi araştırılmıştır.

Yapılan analiz sonucunda genotipler, anter uzunluğu ve Genotip*anter uzunluğu interaksiyonları arasındaki farkın $p < 0.01$ düzeyinde

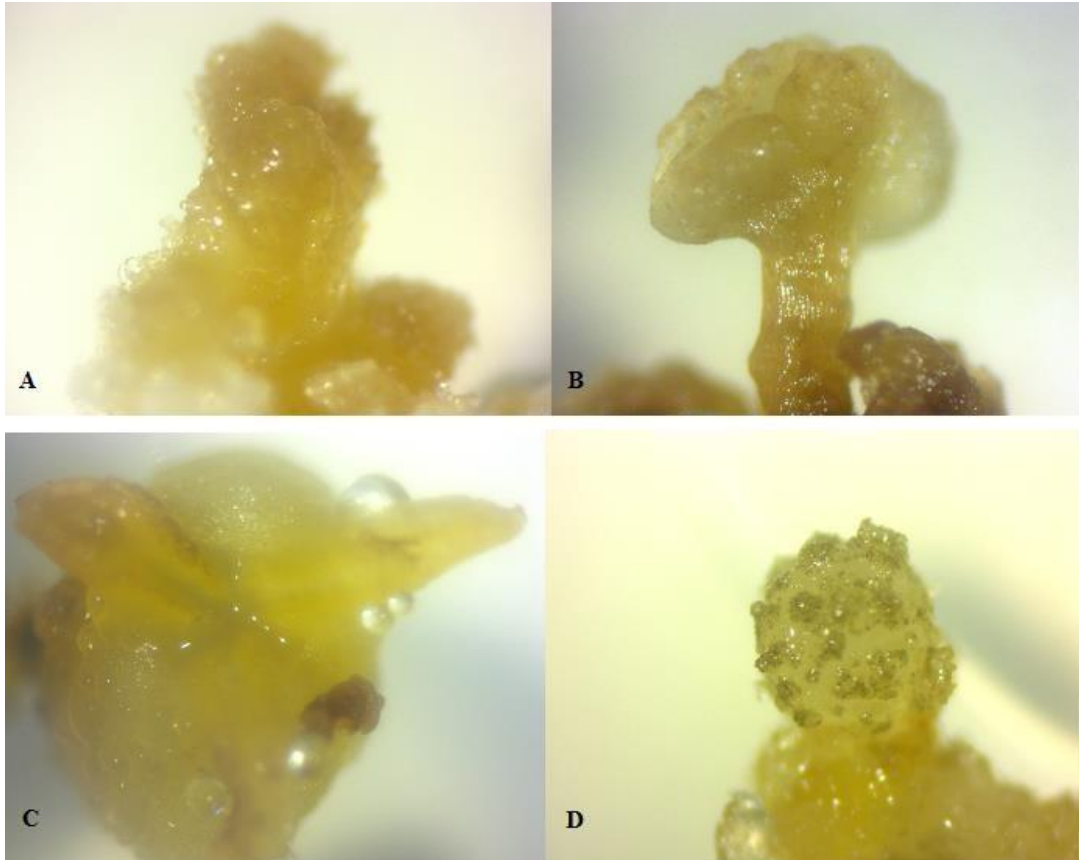
önemli olduğu bulunmuştur (Çizelge 3).

2.0 mg/l 2,4-D destekli besi ortamındaki embriyoid oluşumu genotip ortalamaları 21.58 ile 49.50 adet arasında değişim gösterirken, ortalama embriyoid oluşumu, 33.63 adet olduğu görülmektedir. Çalışma kapsamında materyal olarak kullanılan Aşkabat-100 çeşidinde 3 mm anter boyunda 73.53 adet ile en yüksek embriyoid oluşumu görülürken, Stoneville-468 genotipinde 5 mm anter boyun 8.00 adet ile en düşük embriyoid oluşumu gözlenmiştir (Şekil 1).

Çizelge 3: Genotip ve anter uzunluğunun embriyoid elde edilmesine etkisinin başlatılması özelliğine ilişkin varyans analiz tablosu

Varyasyon Kaynakları	SD	KT	KO	F Değeri
Genotip	2	2012.2616	1006.13	201.6695**
Anter uzunluğu	3	1316.8522	438.951	87.9836**
Genotip * Anter uzunluğu	6	3306.2254	551.038	110.4503**
Hata	24	119.7362	4.989	
Genel	35	6755,0755		
CV (%)	6.46			

*: $P < 0.05$ düzeyinde istatistiki olarak önemli/farklı; **: $P < 0.01$, düzeyinde istatistiki olarak önemli/farklı



Şekil 1: MS besi ortamında kültüre alındıktan 4 hafta sonra Aşkabat-100 (2 mm) anterlerinden meydana gelen androjenik (globüler, kalp ve torpedo) embriyolar (A ve B hormon içermeyen)

Çizelge 4: Genotip ve anter uzunluğunun embriyoid doku oluşumu özelliğine ilişkin ortalama değerleri

Anter Uzunluğu (mm)	Genotipler			Oluşan embriyoid ortalamaları
	Aşkabat-100	Coker-312	Stoneville-468	
2	54.80 b	9.40 f	72.63 a	45.61 a
3	73.53 a	29.83 cd	21.00 e	41.45 a
4	35.27 c	18.00 e	17.67 e	23.64 b
5	34.40 cd	29.10 d	8.00 f	23.83 b
Ortalama	49.50 a	21.58 c	29.82 b	33.63
LSD _{0.05}	Genotip			1.8820
	Anter uzunluğu			2.1731
	Genotipt x anter uzunluğu			3.7639

*Aynı harfler istatistiki olarak aynı grupta yer almaktadır.

3.3. Embriyo elde etme aşaması

2.0 mg/l 2,4-D bitki büyüme düzenleyicilerinde 16. hafta sonunda oluşan embriyoidlerden embriyoların elde edilmesi için; 0.5 mg/l kinetin + 30 g/l sukroz, 0.5 mg/l TDZ + 30 g/l sukroz, 0.1 mg/l kinetin + 30 g/l sukroz, 0.1 mg/l TDZ + 30 g/l sukroz ve bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen besi ortamları konsantrasyonu kullanılarak için ikinci bir alt kültüre aktarılmasıyla 4-6

hafta sonunda farklı kinetin ve TDZ'nin farklı konsantrasyonlarının embriyo çoğalması etkisi araştırılmıştır (Çizelge 5).

Yapılan analiz sonucunda genotip, anter uzunluğu, anter uzunluğu*genotip, BBD, genotip*BBD, anter uzunluğu*BBD ve anter uzunluğu*BBD *genotipinter aksiyonları arasındaki farkın p<0.01 önem düzeyinde önemli olduğu bulunmuştur.

Çizelge 5: Kinetin ve TDZ'nin farklı konsantrasyonlarının embriyo oluşumuna etkisi özelliğine ilişkin varyans analiz tablosu

Varyasyon Kaynakları	SD	KT	KO	F Değeri
Genotip	2	12413.520	6206,76	313.3195**
Anter uzunluğu	3	4684.746	1561,58	78.8292**
Anter uzunluğu x genotip	6	1814.479	302,413	15.2659**
BBD	4	8541.855	2135,46	107.7990**
Genotip x BBD	8	2300.560	287,57	14.5166**
Anter uzunluğu x BBD	12	1766.440	147,203	7.4309**
Anter uzunluğu x BBD x genotip	24	1692.010	715.168	3.5589**
Hata	120	2377.162	19.810	
Genel	179	35590.773		
CV (%)	25.78			

*: P< 0.05 düzeyinde istatistiki olarak önemli/farklı; **: P< 0.01, düzeyinde istatistiki olarak önemli/farklı

5 farklı MS besi ortamı konsantrasyonlarında elde edilen embriyo ortalamaları % 1.13 ve 87.13 adet arasında değiştiği, hormonsuz besi ortamında Aşkabat-100 çeşidinde genotipinde 3 mm anter boyunda, hormonsuz besi ortamında en yüksek embriyo oluşumu gerçekleştiği, en emriyo oluşumunun Stoneville-468 genotipinin 0.5 mg/l

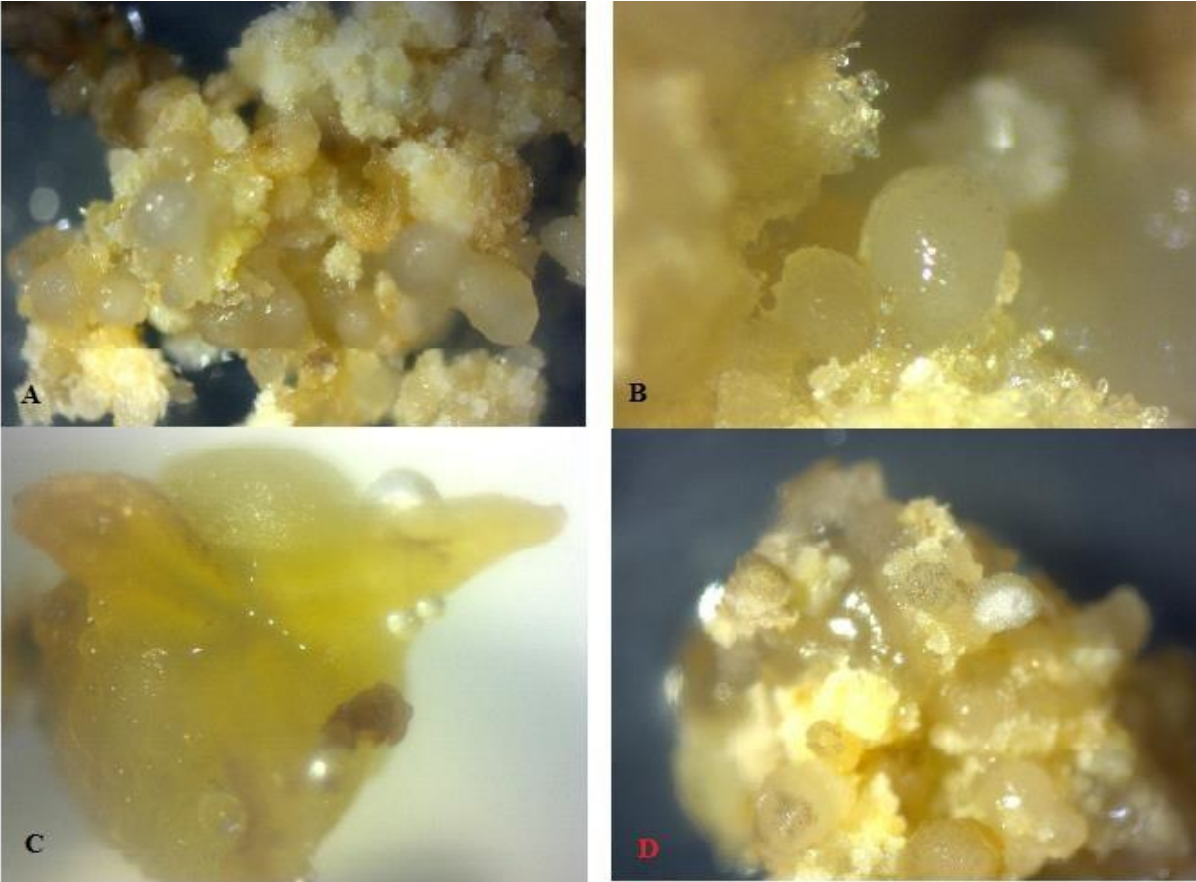
TDZ içeren MS besi ortamında 5 mm anter boyunda gerçekleştiği bulunmuştur Aşkabat-100 ve Coker-312genotipleri en yüksek embriyoların elde edildiği grubu oluştururken, Stoneville-468 çeşidi en düşük embriyoların, elde edildiği grubu oluşturmuştur. 3 mm anter uzuluğunda hormonsuz MS besi ortamında en yüksek embriyo oluşumu elde edilirken, 5 mm anter uzunluğunda ise, en düşük embriyo oluşumu

elde edilmiştir.

6 haftalık kültür aşamasından sonra gelişen embriyoların tamamen olgunlaşmasıyla, globüler, kalp, torpedo ve kotiledon devreleri binoküler mikroskop altında gözlemlenmiştir. Daha sonra bu embriyolar çimlenip sürgüne dönüşmüştür. Oluşan sürgünler yaklaşık olarak 0.5 – 10 cm arasında olduğu görülmüştür (Şekil 2-3-4-5-6-7-8-9).

Çalışmamızda elde edilen bulgulara göre hormon içermeyen besi ortamlarında tüm genotiplerde olumlu sonuçlar alındığı, embriyo oluşumu

bakımından en iyi sonucun 3 mm anter uzunluğunda elde edildiği ve 3mm anter uzunluğunda Aşkabat-100 0.5 mg/l kinetin MS besi ortamında embriyoların oluştuğu dikkati çekmektedir. Bu durum, kinetinin bitki büyüme düzenleyicisinin 0.1 mg/l ile 2.0 mg/l farklı dozlarının da incelenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. *G.barbadense L.* türüne ait Aşkabat-100 genotipinde embriyo oluşumu bakımından en iyi sonuç elde edilmesinden dolayı bu türün farklı genotipleri ya da Aşkabat-100 ile elde edilmiş melez kombinsayonları ile yapılacak çalışmada başarı elde edilebileceği sonucuna varılmıştır.

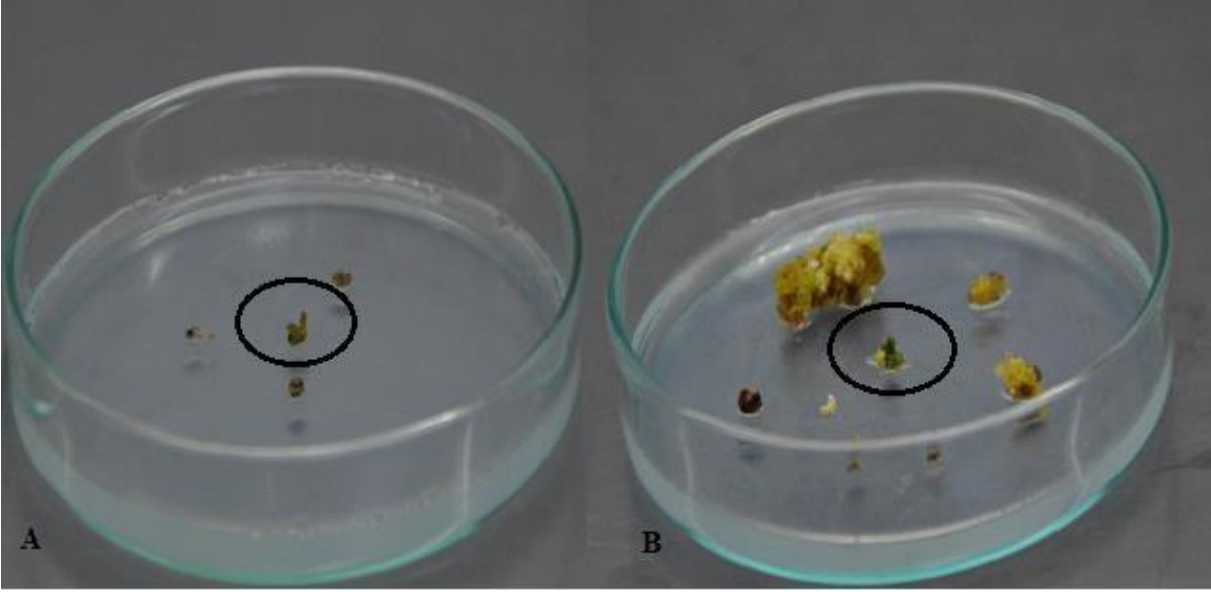


Şekil 2: MS besi ortamında kültüre alındıktan 16 hafta sonra Aşkabat-100 (3 mm) anterlerinden gelişen embriyoid kalluslar ve embriyoid oluşması (A, B, C ve D).

Çizelge 6: Kinetin ve TDZ' nin farklı konsantrasyonlarının embriyo oluşumuna etkisi

BBD/AU	AU	0.1 KIN	0.5 KIN	0.1 TDZ	0.5 TDZ	KONTROL	Ort. genotip * uzunluk
Aşkabat- 100	2	30.87 de	55.97 c	8.10 j-s	11.80 h-l	72.37 b	35.82 b
	3	35.13 d	66.47 bc	10.40 h-n	12.40 h-k	87.13 a	42.31 a
	4	23.47 efg	29.70 de	6.00 k-u	7.30 j-s	25.23 def	18.34 c
	5	16.03 f-ı	6.43 k-u	3.27 p-y	4.00 n-w	10.43 h-m	8.03 de
Ort. BBD * genotip		26.38 c	39.64 b	6.94 f	8.88 ef	48.79 a	26.13 a
Coker- 312	2	11.03 h-l	10.97 h-l	2.50 t-y	1.83 r-w	14.20 hij	8.11 de
	3	13.63 h-k	12.77 h-k	3.67 o-x	2.97 q-w	23.67 efg	11.34 d
	4	9.57 ı-o	8.87 ı-p	1.50 t-z	1.40 t-z	8.20 ı-q	5.91 e
	5	3.53 p-y	4.43 l-v	0.60 yz	1.00 v-z	5.90 k-t	3.09 f
Ort. BBD * genotip		9.44 ef	9.26 ef	2.07 gh	1.80 gh	12.99 d	7.11 b
Stonevill e-468	2	3.63 p-y	4.17 q-y	1.00 w-z	1.00 w-z	10.07 h-n	3.97 f
	3	3.73 o-y	4.33 q-v	2.50 r-y	2.00 t-y	18.53 fgh	6.22 e
	4	3.00 r-y	2.00 t-y	1.00 v-z	1.33 u-z	7.47 j-r	2.96 f
	5	1.77 u-z	1.00 w-z	0.00 x	0.50 w-z	4.70 l-v	1.59 g
Ort. BBD * genotip		3.32 g	2.59 gh	1.13 h	1.21 gh	10.19 de	3.69 b
Ort. uzunluk * BBD	2	15.36 ef	23.52 cd	3.87 ijk	4.98 ij	32.21 b	15.97 b
	3	17.70 de	27.66 c	5.52 hı	5.79 hı	43.11 a	19.96 a
	4	12.01 fg	13.52 ef	2.83 jk	3.34 ijk	13.63 ef	9.07 c
	5	7.11 hı	3.96 ijk	1.29 l	1.83 kl	7.01 gh	4.24 d
Ort. BBD		13.04 c	17.16 b	3.38 d	3.96 d	23.99 a	
LSD _{0.05}	Genotip					1.6088	
	Anter uzunluğu					1.8577	
	BBD					2.0770	
	Genotip * anter uzunluğu					3.2177	
	Genotip * BBD					3.5975	
	Anter uzunluğu * BBD					4.1541	
	Genotip * anter uzunluğu * BBD					7.1952	

*Aynı harfler istatistiki olarak aynı grupta yer almaktadır.



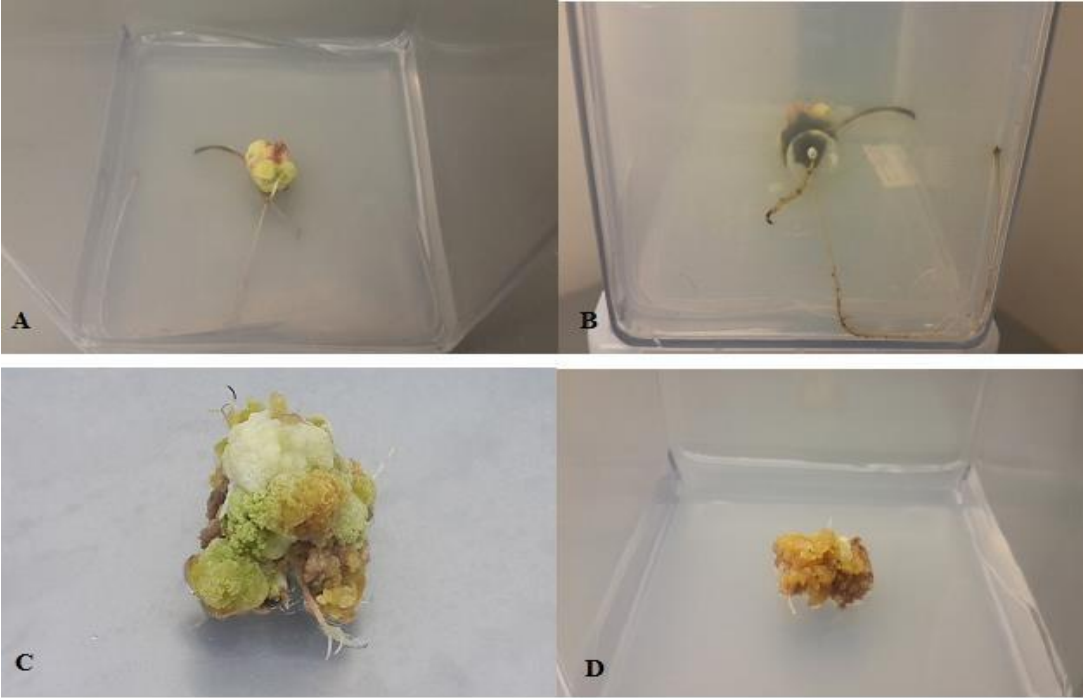
Şekil 3: MS besi ortamında alt kültüre alındıktan 5 hafta sonra Aşkabat-100 (3 mm) anterlerinden gelişen olgunlaşan embriyolardan 5 mm uzunluğunda sürgün gelişimi görülmesi (A: Kinetin hormonu içeren, B: Hormon içermeyen)



Şekil 4: Kinetin MS besi ortamında alt kültüre alındıktan 12 hafta sonra Aşkabat-100 (3 mm) anterlerinden olgunlaşan embriyolardan 5 mm sürgün oluşumu.



Şekil 5: Hormon içermeyen MS besi ortamında alt kültüre alındıktan 12 hafta sonra Aşkabat 100 embriyoidlerinden 5 mm uzunluğunda sürgün oluşumu.



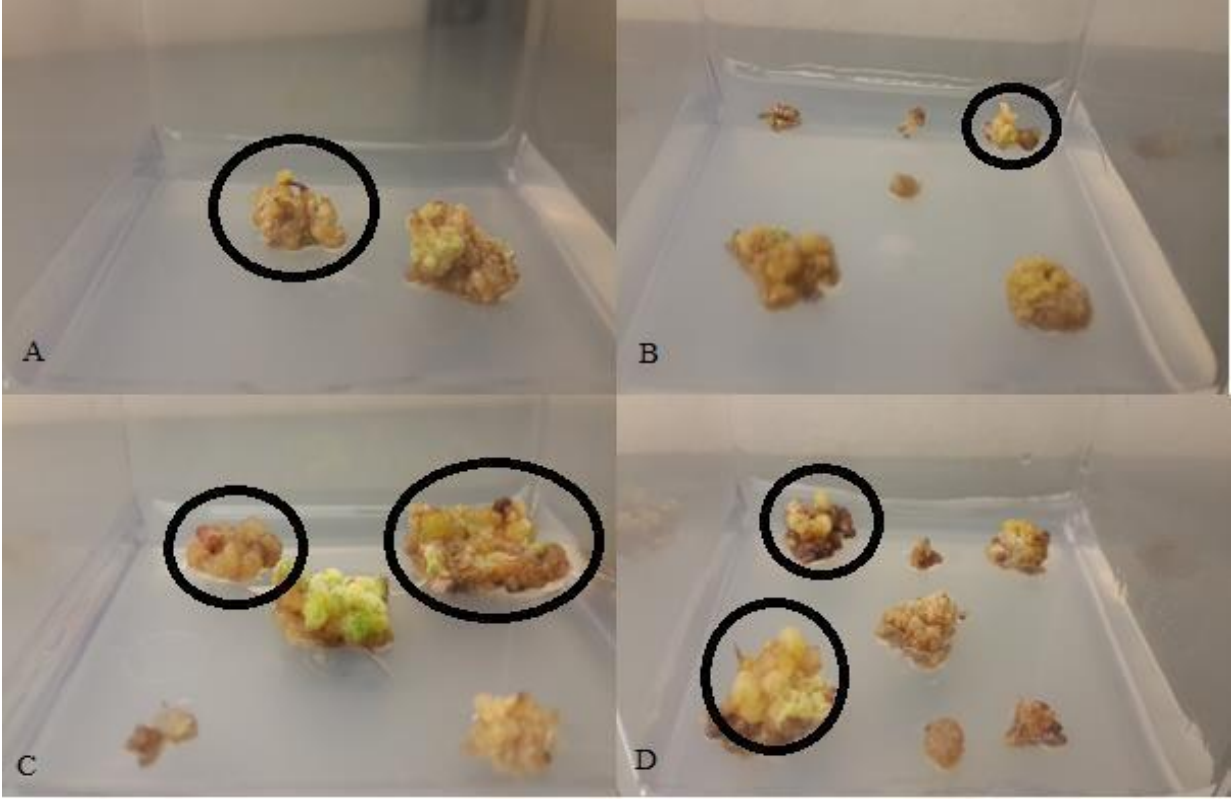
Şekil 6: MS besi ortamında alt kültüre alındıktan 20 hafta sonra Aşkabat-100 (3 mm) anterlerinden olgunlaşan embriyolarda çimlenme ve sürgün oluşumu (A, B, C ve D hormon içermeyen)



Şekil 7: Hormonsuz MS besi ortamında alt kültürde 20 hafta sonra Aşkabat-100 (3 mm) anterlerinden olgunlaşan embriyoların çimlenmesi ve sürgüne dönüşmesi



Şekil 8: 0.5 mg/l kinetin MS besi ortamında alt kültürde 20 hafta sonra Aşkabat-100 (3 mm) anterlerinden olgunlaşan embriyoların çimlenmesi ve sürgüne dönüşmesi



Şekil 9: Kinetin MS besi ortamında alt kültüre alındıktan 12 hafta sonra Aşkabat-100 (3 mm) izole edilen mikrosporların verdiği embriyoidler (A: Çimlenme. B: Kotiledon embriyo. C: Embriyoların olgunlaşması ve D: Globüler, kalp ve torpedo embriyo dönemleri)

4. Sonuç

Sonuç olarak; anter kültürü çalışmalarımızda, embriyo elde edilerek, embriyonun globüler, kalp, torpedo ve kotiledon evreleri görülüp görüntüleri elde edilmiştir. Daha sonra bunlar olgunlaştırılıp, 5 mm uzunluğunda sürgün elde edilmiştir. Fakat bu sürgünler tam bir bitkiciğe dönüşmediğinden, performans yönünden beklendiği gibi sonuç elde edilememiştir. Ardından devam eden embriyolar çimlenmiş ve kök oluşumu meydana gelmiştir.

Bu konuda yapılacak çalışmalarda, anterlerden izole edilen mikrospordan embriyoid kallus oluşması için kullanılacak oksinin veya sitokinin türevlerinin iyi araştırılıp seçilmesi gerekmektedir.

Ayrıca bitki büyüme düzenleyicileri dışında rejenerasyon olayının gerçekleşmesi için inkübasyon süresinin çok önemli olduğunu ve inkübasyondan sonra hemen ışıklı ortama alınmayıp, yarı ışıklı ortama ve daha sonra aydınlık ortam alınması şartlarında haploid embriyolar elde edilebileceği söylenebilir.

Şu ana kadar pamuk bitkisinde bu konuda başarı elde edilememiş olması çalışmamızın önemini arttırmaktadır. Ayrıca anter kültürü ile elde edilecek sonuçların getirileri

düşünüldüğünde çalışmamız hem bitki ıslahçılarına hem de bu işle uğraşan tohumculuk sektörüne büyük katkılar sağlayacaktır.

5. Teşekkür

Bu çalışmayı maddi yönden destekleyen Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na ve TÜBİTAK- BİDEB (2211-C Yurtiçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı)'e teşekkür ederiz. Bu çalışma danışmanlığını Yrd. Doç. Dr. Adem BARDAK' ın yaptığı, Medet KORKUNÇ'un doktora tezinin bir parçasıdır.

6. Kaynaklar

[1] Bajaj, Y.P.S. and Gill, M.S., 1992. Micropropagation of Cotton (*Gossypium* Species). Biotechnology in Agriculture and Forestry 19, High-Tech and Micro propagation III, Ed. By Bajaj, Y.P.S. 483-504. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York.

[2] Dunwell, J.M., 1986. Pollen. Ovule and embryo culture. astools in plant breeding. In: Withers LA. Alderson P.G. (eds). Plant tissue culture and its agricultural applications. Butter worths. London. pp 375-

404. Germana, M.A., 1997. Haploidy in Citrus. In: Jain, S.M., Sopory, S.K., Veilleux, R.E. (eds). In vitro haploid production in higher plants. vol 5. Kluwer. Dordrecht. 195–217

[3] Germana, M.A. 2006. Doubled haploid production in fruitcrops. *Plant Cell Tissue Organ* 86: 131–146

[4] Germana, M.A., 2007. Haploidy. In: Khan I (ed) Citrus. Genetics, Breeding and Biotechnology. CABI. Wallingford. 167–196

[5] Germana, M.A., 2009. Haploid and doubled haploids in fruittrees. In: Touraev, A., Forster, B., Jain, M. (eds). Advances in haploid production in higher plants. Springer. Heidelberg. 241–263.

[6] Hu, H., Yang, H.Y. (eds). 1986. Haploids in higher plants in vitro. China Academic Publishers/Springer, Beijing/Berlin.

[7] Raghavan, V., 1990. From microspore to embryo: faces of the angiosperm pollen grain. In: Nijkamp, H.J.J. van der Plas, L.H., van Hartrigik, J. (eds). Progress in plant cellular and Molecular biology. I.A.P.T.C. Kluwer. Dordrecht. 213–221.

[8] Reinert, J., Bajaj, Y.P.S. 1977 a. Anther culture: haploid production and its significance. 249-340

[9] Reinert, J., Bajaj, Y.P.S. 1977 b. Applied and fundamental aspects of plant cell. Tissue and organ culture. Springer. Berlin Heidelberg New York. 341-464

[10] Sangwan-Norreel, B.S., Sangwan, R.S., Pare, J., 1986. Haploidie et embryogene`se provoqu`e in vitro. *Bull Society of Botany Fr* 133. *Actual Bot* 4: 7–39.

[11] Sharma, A.K., Sharma, A. 1972. Chromosome techniques. Butterworths/University Park Press, London/Baltimore. 575

[12] Testillano, P.S., Coronado, M.J., Segui`-Simarro, JM., Domenech, J., Gonzalez-Melendi, P., Raska I., Risueno M.C., 2000. Defined nuclear changes accompany there programming of the microspore to embryogenesis. *J Struct Biol* 129:223–232.

[13] 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. Translated from *Fiziologiya Rastenii*.

[14] Türkoğlu, Ş.R., 2004. Pamukta (*Gossypium hirsutum* L.) in vitro rejenerasyon olanakları üzerinde araştırmalar. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora tezi. Adana

[15] Wenzel, G., Frei, U., Jahoor, A., Graner, A., Foroughi-Wehr, B., 1995. Haploids—an integral part of applied and basic research. In: Terzi. M., et al (eds) *Current tissues in plant molecular and cellular biology*. Kluwer. Dordrecht. 127–135.