



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

The effect of different hormone concentrations on anther culture derived embryo formation under *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 alınan anterlerin *in vitro* koşullarında farklı hormon konsantrasyonlarının anter kültürü ile embriyo oluşumuna etkisinin incelenmesidir. Pamuk bitkisinin üç farklı genotipi, 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. En yüksek oranda embriyogenik kallus, Aşkabat-100 genotipinde, 2 mm (97.00), Stoneville-468 genotipinde 5 mm (72.63), Coker-312 genotipinde 3 mm (55.80) büyüklüğe ulaşmış anterler ile başlatılan kültürlerden elde edilmiştir. Araştırma sonucunda, Aşkabat-100 çeşidi embriyoid kallus, embriyoid ve embriyo oluşumu için en uygun sonuçların alındığı genotip olarak saptanmıştır. 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 evreleri saptanmış, embriyoların olgunlaşmasıyla çoğaltılmış, çimlenme meydana gelmiş 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 squares to culture in appropriate medium by using the anther culture technique in cotton and ensuring that the shoots grow into plantlet from previously obtained embryos. Aşkabat-100 (*Gossypium barbadense* L.), Coker-312 and Stoneville-468 (*Gossypium hirsutum* L.) were studied for callus induction. In the research, cotton anthers taken from immature flower buds of different lengths (2, 3, 4, 5 mm) were used. In the initiated cultures; in different length anthers, in Aşkabat-100 type, the maximum rate of embryoid 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 embryoid callus formation obtained is at 3 mm anther length (55.80). As a result of the research, Aşkabat-100 type produced the best results for embryoid callus, embryoid and embryo formation. For embryogenic calluses later turning into embryoids, 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) medium. The highest embryo and shoot development were obtained in medium 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 shoots were obtained 0.5-10 cm in length.

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

Yazışma adresi: Medet Korkunç: medet.korkunc@dicle.edu.tr

1. Giriş

Pamuk, dünya üzerinde hem tropik, hem de subtropik bölgelerde yaygın olarak yetiştiriciliği yapılan bir sıcak iklim endüstri bitkisidir. Tekstil ve yağ sanayi sektörü başta olmak üzere yem, kozmetik, ilaç, plastik, savunma gibi birçok sektöre

hammadde sağlanması yönünden büyük önem taşımaktadır.

Çok yaygın olmamakla birlikte, *in vitro* kültür teknikleri, pamuğa ilişkin bazı sorunların çözümü için kullanılmaktadır. Kültürü yapılan pamuk çeşitleri yabancı tozlanma ve çirçirlama sırasında mekanik tohum karışımı nedeniyle hızlı bir şekilde

dejenere olmaktadır. Bu nedenle, pamuk çeşitlerinin genetik safiyetinin ve özellikle gen kaynağı koleksiyonlarının devamlılığı çok önemlidir. Klonal çoğaltma genotiplerinin safiyetini korumak için yardımcı olmakla birlikte, pamukta vejetatif üretim yoluyla konvensiyonel çoğaltma metodları yeterince hızlı ve güvenilir olmayıp, *in vitro* çoğaltma metodları, 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 çok azdır. 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, genomiks ve transformasyon çalışmalarında kullanılabilir. Çünkü, bu materyaller ekonomik olarak önemli tarımsal özelliklerine ait genlerinin lokasyonları ve QTL (Quantitative 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 ilgili olan bitki ıslah ve genetiğinde polen biyoteknolojisinin en önemli uygulamalarından biridir [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 henüz 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 ve Shamina [13] pamukta anter kültürü için besi ortamı kompozisyonunu optimize etmek amacıyla yürüttükleri çalışmada, farklı üç pamuk (*G. hirsutum* L.) hattı'na ait tek çekirdekli dönemde mikrosporlar 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 adet dikkate değer genotipik farklılık bulunduğu bildirmiştir.

Bu çalışmada, uygun ortam koşulları sağlanması, anter kültürü tekniği ile embriyoidleri verebilecek kallus oluşturulması, daha sonra embriyoidlerin çoğaltılıp embriyolara dönüşmesini sağlanması ve kısa sürede embriyoları olgunlaştırılıp sürgün elde edilmesine yönelik araştırma amaçlanmıştır.

2. Gereç ve Yöntem

G. barbadense L. (Aşkabat-100) ve *G. hirsutum* L. (Coker 312 ve Stoneville-468) türlerine ait 3 adet genotip, çalışmada canlı materyal olarak kullanılmıştır. Her bir genotipten tarlada koşullarında tohum ekimleri yapılmıştır.

Taraklanma başlangıcından sonra genotiplerden 100'er adet tarak alınmış, alınan taraklar kumpas ile ölçülerek 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 tekrarlamalı olarak steril edilen bistüri ve pens yardımıyla ekimleri yapılmış, petri kaplarının kapakları kapatılıp, içerisine hava giriş-çıkışı engelleyen için parafilmle kapatılıp, iklim odasında 60 gün aralığında karanlığa bırakılmıştır. 8 haftalık karanlık ortam inkübasyonundan sonra embriyodlerin kallus büyüklükleri, embriyoid ve embriyo rejenerasyon oranları incelenmiştir.

Araştırmada elde edilen gözlemlere ait değerlerin varyans analizleri, tesadüf parselleri deneme desenine göre JMP 7.0 istatistik (Copyright © SAS Institute Inc.) paket programı kullanılarak yapılmış, ortalamalar, LSD testi ile gruplandırılmıştır.

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. Genotip ve anter uzunluğunun embriyogenik kallus oluşumuna etkisi

Yapılan ön çalışmalardan sonra ekimde direkt olarak 2.0 mg/l 2,4-D bitki büyüme düzenleyicisi kullanılmasıyla 60 günlük inkübasyon sonucunda embriyogenik kallusve embriyoid yapıları oluşmuştur. Alt kültürler sonucunda embriyoid ve embriyo oluşumu aşamaları görülmüştür. Dolayısıyla çalışmamızda ilk anter ekiminde embriyogenik kallus oluşturmak için direk 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.

16 haftalık kültür süresi sonucu kallus ve embriyogenik kallusgeliştiren kültürler belirlenmiştir.

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

Genotip ve anter uzunluğunun embriyogenik kallus kültürü başlatması üzerine etkisine ilişkin ortalama karşılaştırmaları, Çizelge 1'de verilmiştir. Embriyogenik kallus geliştiren anter ortalama oranları, 21.97 ile 76.00 adet arasında değişmiştir. En yüksek embriyogenik kallus oluşumu ortalaması, 53.70 adet ile Stoneville-468 genotipinde saptanırken, en düşük 42.57 adet ile Coker-312 genotipinde saptanmıştır. Anter uzunlukları interaksyonlarına baktığımızda, en yüksek embriyogenik kallus oluşumu 4 mm'de Stoneville-468 genotipi veririrken, diğer genotipler, 5 mm anter uzunluğunda vermiştir. 4 haftalık kültür süresi sonucu, farklı anter büyüklüğündeki kültürlerde pro-embriyogenik kallusoluşumu, 8 haftalık kültür süresi sonucu gelişen embriyoid kalluslardan, kallusun köken aldığı dokuya bağlı olarak farklı oranlarda pro-embriyogenik kallusdokusu oluşumu incelenmiştir (Çizelge 2).

Bu embriyoid ve embriyolardan sürgün ve sürgün benzeri yapılar oluştuğu binoküler ve sterio mikroskop görüntülerinden saptanmıştır.

Çizelge 1. Genotip ve anter uzunluğunun embriyogenik kallus kültürü başlatılması özelliğine ilişkin varyans analiz tablosu

Varyasyon Kaynakları	SD	KT	KO	F Değeri
Genotip	2	368.912	184.456	27.46**
Anter uzunluğu	3	843.760	281.253	41.87**
Genotip x anter uzunluğu	6	756.125	126.021	18.76**
Hata	24	161.178	6.716	
Genel	35	2129.977		
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 embriyoid kallus 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	2.18
	Anter Uzunluğu	2.52
	Genotip x Anter Uzunluğu	4.36

*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 embriyogenik kallusve 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 farklılıklar, istatistiki olarak % 1 (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 endüyük embriyoid oluşumu saptanmıştır (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	2012.261	1006.13	201.66**
Anter Uzunluğu	3	1316.852	438.95	87.98**
Genotip * Anter Uzunluğu	6	3306.225	551.03	110.45**
Hata	24	119.736	4.98	
Genel	35	6755.075		
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 androgenik (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
	Genotip 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, 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*Genotip etkileşimlerinin arasındaki farkın, istatistiki olarak %1 (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	6206.760	313.31**
Anter Uzunluğu	3	4684.746	1561.580	78.82**
Anter Uzunluğu x Genotip	6	1814.479	302.413	15.26**
BBD	4	8541.855	2135.460	107.79**
Genotip x BBD	8	2300.560	287.570	14.51**
Anter Uzunluğu x BBD	12	1766.440	147.203	7.43**
Anter Uzunluğu x BBD x Genotip	24	1692.010	715.168	3.55**
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 genotipinde 3 mm anter boyunda, hormonsuz besi ortamında en yüksek embriyo oluşumu gerçekleştiği, en düşük embriyo oluşumunun Stoneville-468 genotipinin 0.5 mg/l TDZ içeren MS besi ortamında 5 mm anter boyunda gerçekleştiği saptanmıştır. Aşkabat-100 ve Coker-312 genotipleri en yüksek embriyoların elde edildiği grubu

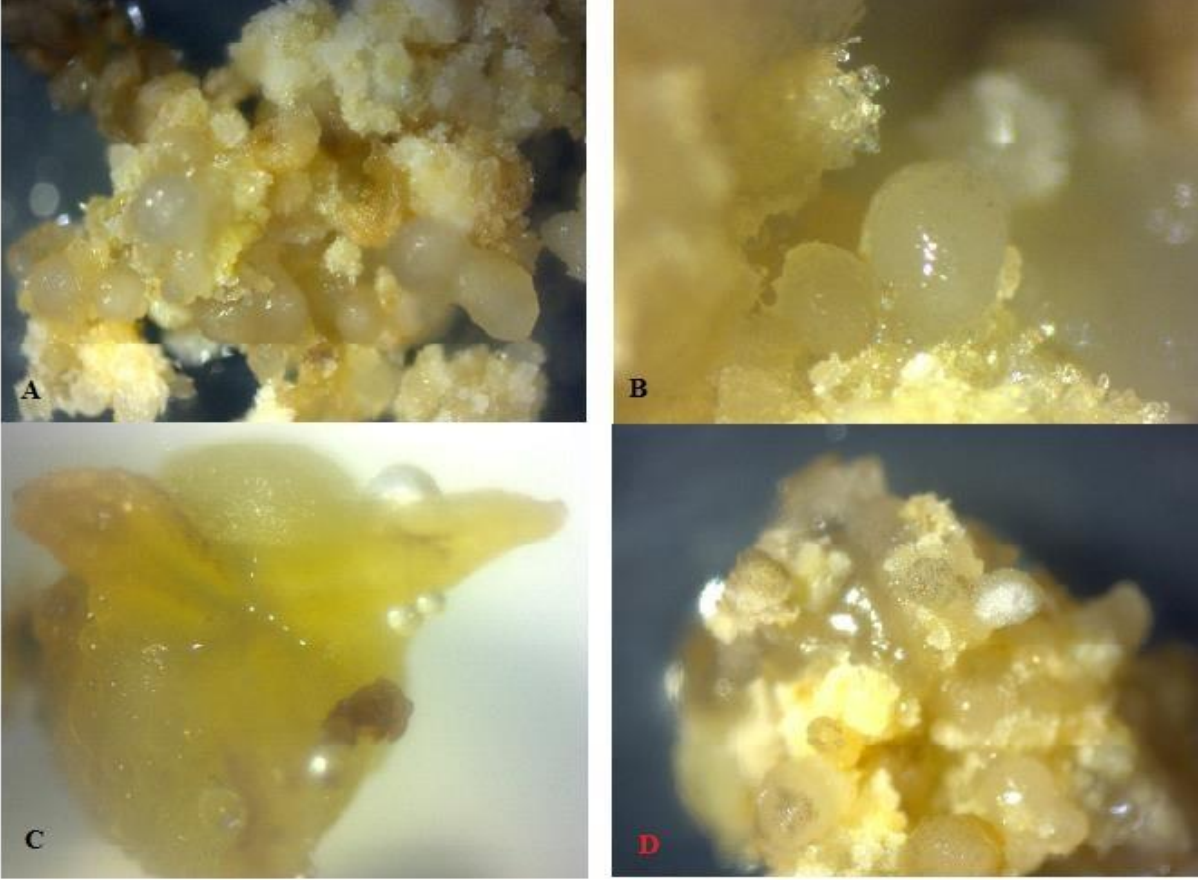
oluştururken, Stoneville-468 genotipi en düşük embriyoların, elde edildiği grubu oluşturmuştur. 3 mm anter uzunluğunda hormonsuz MS besi ortamında en yüksek embriyo oluşumu elde edilirken, 5 mm anter uzunluğunda ise, en düşük embriyo oluşumu elde edilmiştir.

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.

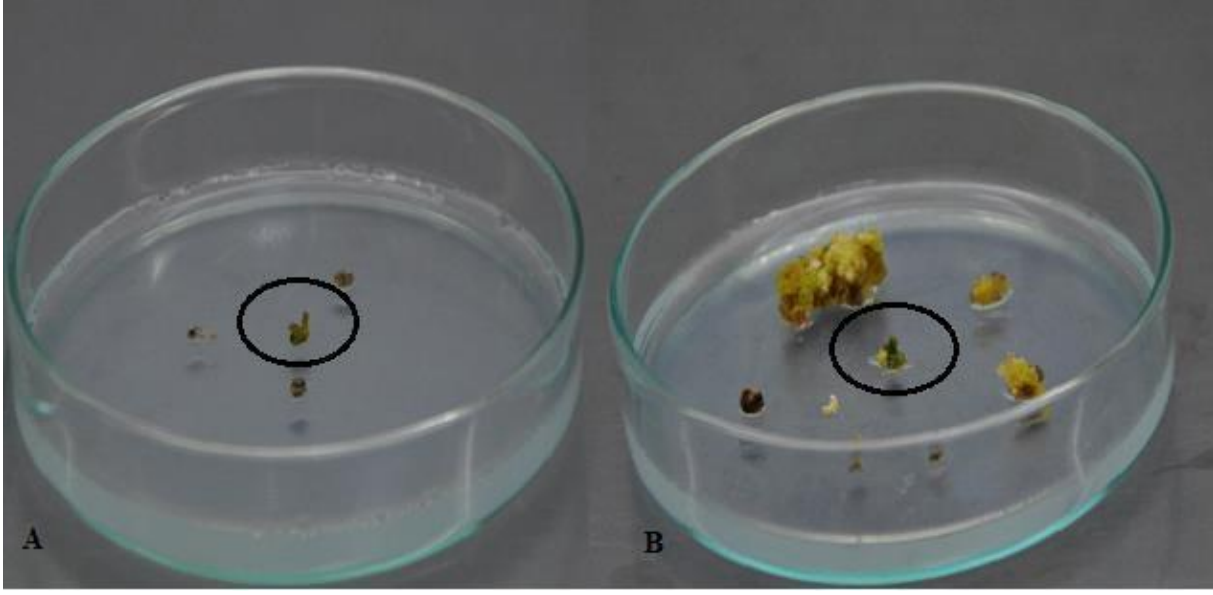


Şekil 2. MS besi ortamında kültüre alındıktan 16 hafta sonra Aşkabat-100 (3 mm) anterlerinden gelişen embriyoid kalluslar ve embriyoid oluşması (A, B, C ve D).

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 * Anter Uzunluğu
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-1	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 i-o	8.87 i-p	1.50 t-z	1.40 t-z	8.20 i-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 hi	5.79 hi	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 hi	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				1.60	
		Anter Uzunluğu				1.85	
		BBD				2.07	
		Genotip * Anter Uzunluğu				3.21	
		Genotip * BBD				3.59	
		Anter Uzunluğu * BBD				4.15	
	Genotip * Anter Uzunluğu * BBD				7.19		

*Aynı harfler istatistiki olarak aynı grupta yer almaktadır.



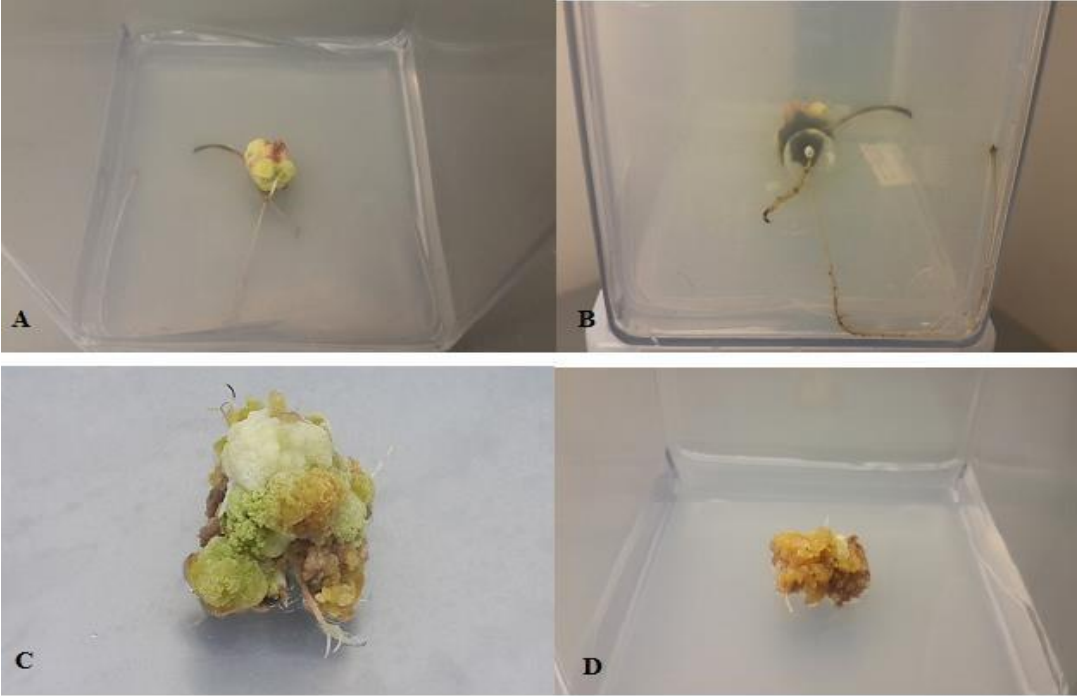
Şekil 3. MS besi ortamında alt kültüre alındıktan 5 hafta sonra Aşkabat-100 (3 mm) anterlerinden gelişen olgunlaşan embriyolardan 5 mm uzunluğunda sürgün gelişimi görülmesi (A: Kinetin hormonu içeren, B: Hormon içermeyen)



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.



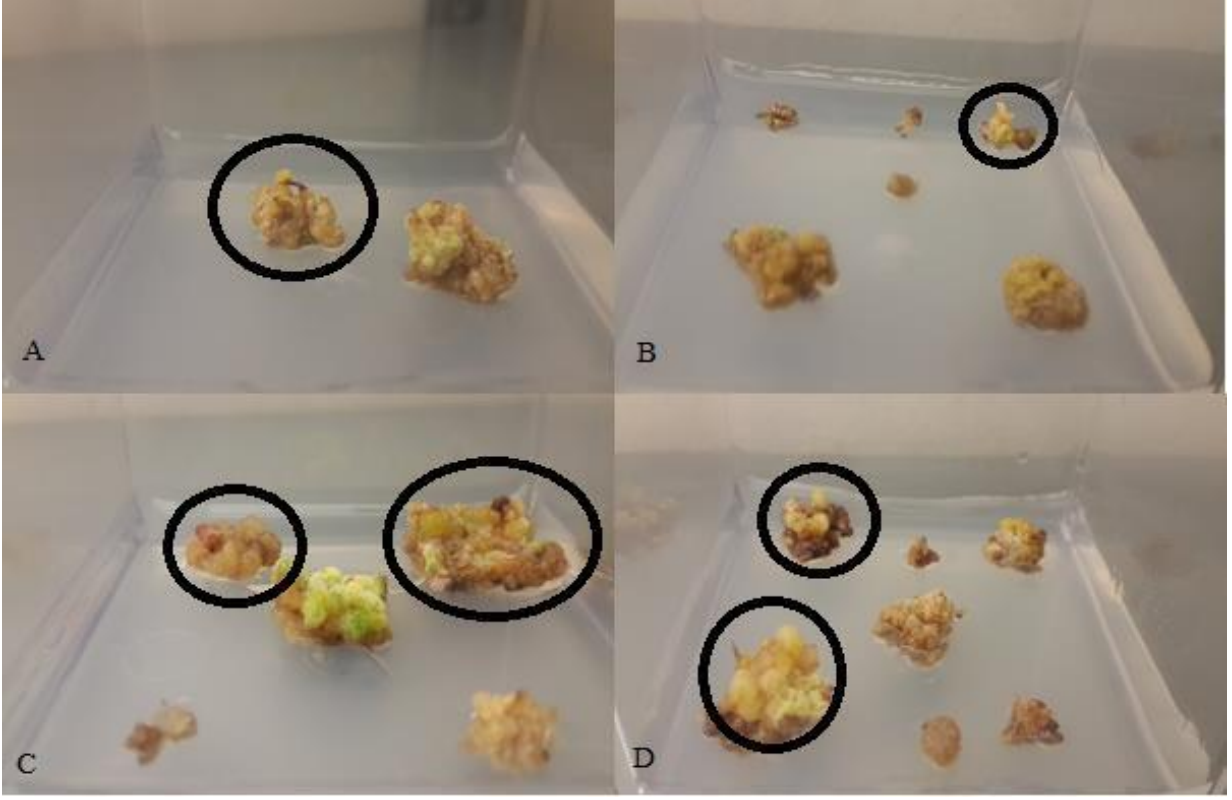
Şekil 6. MS besi ortamında alt kültüre alındıktan 20 hafta sonra Aşkabat-100 (3 mm) anterlerinden olgunlaşan embriyolarda çimlenme ve sürgün oluşumu (A, B, C ve D hormon içermeyen)



Şekil 7. Hormonsuz MS besisi 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 besisi 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 embriyogenik kallı 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

söylenbilir.

Şuana kadar pamuk bitkisinde bu konuda başarı elde edilememiş olması çalışmamızın önemini arttırmaktadır. Ayrıca anter kültürü ile elde edilecek sonuçların getirileri düşünüldüğünde çalışmamız hem bitki ıslahçalarına 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 spp.*). Biotechnology in Agriculture and Forestry 19, High-Tech and Micropropagation 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. Doubledhaploidproduction 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.,vanHartrigik, J. (eds). Progress in plant cellular and Molecularbiology. I.A.P.T.C. Kluwer. Dordrecht. 213–221.
- [8] Reinert, J.,Bajaj, Y.P.S. 1977a. Anther culture: haploidproductionandits significance. 249-340
- [9] Reinert, J.,Bajaj, Y.P.S. 1977b. Applied and fundamental spectrs of plant cell. Tissue and organ culture. Springer. Berlin Heidelberg New Yok. 341-464
- [10] Sangwan-Norreel, B.S.,Sangwan, R.S., Pare, J., 1986. Haploıdie et embryogene`seprovoque`e in vitro. Bull Society of BotanyFr 133. Actual Bot 4: 7–39.
- [11] Sharma, A.K., Sharma, A. 1972. Chromosometechniques. Butter worths/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 changesac company there programming of the microsporeto embryogenesis. J StructBiol 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) Curren tissues in plant molecular and cellular biology. Kluwer. Dordrecht. 127–135.