



Farklı pamuk çeşitlerinde anter kültürü tekniğiyle kallustan embriyoid elde edilmesi Embryoid formation from anther culture derived calluses in different cotton cultivars

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,

MAKALEBİLGİSİ

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

Bu çalışmanın amacı, anter kültürü için pamukta en iyi embriyoidleri veren kallusların elde edilmesi için, en iyi besi ortamının seçilmesi ve en fazla kallus oluşumunu teşvik edecek bitki büyüme düzenleyicilerinin saptanmasıdır. Üç farklı pamuk çeşidi olan Aşkabat-100 (Gossypium barbadense L.), Coker-312 ve Stoneville-468 (Gossypium hirsutum L.)'den alınan taraklar kallus indüksiyonu için çalışılmıştır. Çalışmada farklı boylardaki olgunlaşmamış çiçek tomurcuklarından alınan pamuk anterleri kullanılmıştır. Aseptik koşullarda anterler yüzey sterilizasyonuna tabi tutulduktan sonra kallus indüksiyonu için bitki büyüme düzenleyicisi içeren besi ortamlarına aktarılmıştır.

Aşkabat-100 çeşidinde farklı uzunluktaki anterlerde en yüksek oranda embriyoidleri veren kallus, 2 mm uzunlukta (97.00), Stoneville-468 çeşidinde en yüksek embriyoidleri veren kallus, 5 mm uzunlukta (72.63), Coker-312 çeşidindeki anterlerde en yüksek embriyoidleri veren kallus oluşumu 3 mm anter uzunluğunda (55.80), başlatılan kültürler ve alt kültürlerde saptanmıştır.

Araştırma sonucunda, Aşkabat-100 çeşidi kallus, embriyoidleri veren kallus ve embriyoid oluşumu için en uygun sonuçları vermiştir. Daha sonra embriyoidlere dönüşen embriyoid kalluslar için en iyi değerler, hormonsuz (80.00) ve 0.1-0.5 mg/l kinetin ilaveli (66.00-61.60) ve 2.0 mg/l 2,4-D ilaveli (92.00), MS besi ortamlarında görülmüş ve ölçülmüştür. En yüksek embriyoid veren kallus ve embriyoid oluşumu alt kültürlerde (85.60) 0.5 mg/l kinetin içeren besi ortamında gerçekleşmiştir.

Anahtar Kelimeler: Pamuk, Tarak, Anter ve Kallus

ABSTRACT

Cotton is one of the products that has an important place in agricultural, industrial and trade sectors in the world with its diverse areas of use. The aim of the study is to obtain calluses that produce the best embryoids in cotton from anther culture, choosing the best nutrient media and finding the Plant Growth Regulators that produce the highest callus formation. In this study, using different anther sizes (2, 3, 4, 5 mm) obtained from cotton plant square, calluses that might provide MS (Muroshige and Skoog) embryoids will be obtained. The square taken from three different types of cotton, Aşkabat-100 (Gossypium barbadense L.), Coker-312 ve Stoneville-468 (Gossypium hirsutum L.) are studied for callus induction. In the study, cotton anthers taken from different length immature flower buds (square) are used. After anthers were subjected to surface sterilization in aseptic conditions, the anthers were isolated and then transferred to nutrient media containing plant growth regulators for callus induction. In Aşkabat-100 cultivar among the different length anthers, 2 mm (97.00) callus produced the highest percentage of embryoids, 5 mm (72.63) of callus resulted in the highest embryoid formation in the Stoneville cultivar and, 3 mm callus size in cv Coker-312 gave the thighest embryoid formation (55,80).

As a result of the study, the Aşkabat-100 cultivar callus produced the best results for embryoid producing calli and embryoid formation. After that, the best results for embryoid calli that turn into embryoids were seen and measured at medium containing no-hormone (80.00) and 0.1-0.5 mg/l kinetin supplemented (66.00-61.60) ve 2.0 mg/l 2,4-D supplemented (92.00) MS nutrient media. The embryoid formation and callus that produces the most embryoid formation were realized in feeding media in subcultures containing (85.60) 0.5 mg/l kinetin.

Key Words: Cotton, Square, anther, callus

Yazışma adresi: Medet Korkunç

E-posta: medet.korkunc@dicle.edu.tr

1. Giriş

Pamuk bitkisi yaygın ve zorunlu kullanım alanıyla insanlık açısından yarattığı katma değer ve istihdam olanaklarıyla da üretici ülkeler açısından büyük

ekonomik öneme sahiptir. Gün geçtikçe artan nüfus, doğal elyaflara olan ilgi ve talebin giderek artması ve yaşam standardının yükselmesi ile pamuk bitkisine olan talebi de artırmaktadır. Buna

karşılık, sınırlı sayıda ülkenin ekolojisi, pamuk tarımına el verdiğinden, dünya üretiminin yaklaşık % 80'i, Türkiye'nin de içinde bulunduğu 8ülke tarafından gerçekleştirilmektedir [6]. Lifi tekstil sektöründe, tohumu ise yağ, yem, kozmetik, patlayıcı madde sanayisi gibibir çok sektörün ham maddesini oluşturmaktadır [1].

Hem kendine hem de yabancı döllenme özelliğine sahip pamuk bitkisinde, yeni çeşit geliştirme çalışmalarında melezleme ıslahı, büyük önemtaşımaktadır. Elde edilecek melez hatların kısa sürede homozigotlaşması ıslah programının başarısını etkileyen en önemli faktörlerden birisidir [3]. Bitkilerde bilinen klasik ıslah yöntemleriyle çözülemeyen veya çözümünü güç olan problemlere çözüm getirerek, daha ekonomik, kalite ve kantite yönünden daha yüksek bitkisel üretimin gerçekleştirilmesine yardımcı olmak amacıyla uygulanan *Bitki Biyoteknolojisi*; bitki organ, doku ve hücrelerinin steril yapay besi ortamlarında kültüre alınma ve genetik olarak değiştirilme tekniklerinden oluşan bir teknikler bütünüdür [7].

Daha önce yapılan çalışmalarda, oksinlerin türev ve konsantrasyonlarının mikrospor gelişim aşamasını belirlemede önemli olduğu, çoğu bitki türünde 2,4-D, IAA ve NAA direkt somatik embriyogenesis veya kallus oluşumunu başlatmak için besi ortamında mutlaka bulundurulması gerektiğini [8]; kültürdeki anterlerin embriyogenik gelişimini çok sayıda endojen ve eksojen faktörün etkilediği, *in vitro* besi ortamında kültüre alınan anterlerin bu ortama cevabını etkileyen faktörlerin genotip, dönor bitkinin fizyolojik durumu ve büyüme koşulları, polenin gelişim safhası, anterler veya çiçek tomurcuklarına yapılan ön uygulama, *in vitro* kültür ortamı ve koşulları, bunların kendi aralarındaki etkileşimlerinin [2]; anterlerin çiçek tomurcuğundan çıkarılmadan yüzey sterilizasyonu ile kontaminantlar, bakteri ve mantarlardan arındırılması gerektiği; kontaminantlardan arındırılmış anter elde etmek için birçok yüzey sterilizasyonu protokolünün tamamlandığı [9]; çoğu bitki genotipinde anterlerin fiziksel ve kimyasal ön işlem uygulanması sporofitik gelişimin teşviki için bir uyarıcı olarak kullanıldığı yüksek sıcaklık, yüksek nemlilik, su stresi, aneorobik işlem, sukroz, yüksek besi ortamı pH'sı ve ağır metal işlemi gibi işlemler anter kültüründe kullanılan ön işlem olduğu [12]; uzun zamandır polen embriyogenesis protokolleri hakkında birçok varsayım ve pratik deneyimler üzerine kurulduğu, fakat son bilimsel ve teknolojik inovasyonlar, son kullanıcı uygulamalarının büyüklüğü ve kontrol mekanizmasının daha çok anlaşılması, gelişmiş

bitkilerde haploidlere olan ilginin yeniden güçlenmesine neden olduğu [5]; polen gelişim aşaması genellikle asetokarmin metodu ile çiçek tomurcuğundaki bir anterde test edildiği [13] bildirilmiştir. 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 fenilindol dihidroklorit) floresan boyası da polen gelişim aşamasının belirlenmesinde kullanılabilir olduğu [13]; aktif kömür ve antioksidant ilavesinin fenolik bileşikler tarafından oluşturulan kahverengi doku oluşumunu azalttığı için, kültür besi ortamına ilave edilebildiği ve glutamin, kazein, prolin, biotin, inositol, hindistan cevizi özütü, gümüş nitrat ve polyvinylprolidone gibi diğer maddelerde kültür besi ortamına ilave edildiği [11] bildirilmektedir. Anterlerin kültür ortamına cevaplarındaki mevsimsel değişimin öneminin çoğu bitki genotipinde gözlemlendiği, tarlada yetişen bitkilerden alınan anterlerin serada yetiştirilen bitkilerden alınan anterlerine göre daha iyi cevap verdiği, ayrıca, bir mevsimde ilk açılan çiçekten alınan anterlerin embriyogenesis için daha etkili olduğu [14]; bitki rejenerasyonunun ilk olarak iki yaşındaki *G. hirsutum* L. türüne ait Coker-310'un kallusunun embriyogenesisi üzerinden tanımlandığı, ovül ve anter kültürünün, kromozom çiftleştirme yoluyla homozigot diploid hatların üretimi ve haploid bitki üretimi avantajlarına sahip olduğu ve bu yüzden doğuştan hatlar üretmek için gerekli olan zamanı kısalttığı [4] 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 embriyolar olgunlaştırılarak sürgün elde edilmesine yönelik araştırma amaçlanmıştır.

2. Gerekçe ve Yöntem

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

Her bir genotipten serada farklı zaman aralıklarında toplam 40 adet saksıya, her bir saksıya 4 adet tohum gelecek şekilde serada ekim yapılmıştır. Daha sonra her saksıda bir bitki kalacak şekilde seyreltme yapılmıştır.

Taraklanma başlangıcından sonra her tarağa “*taraklanma tarihi*” yazılı etiket yapıştırılarak daha sonra her gün genotiplerden 100 adet tarak alınmıştır. Alınan taraklar kumpas ile ölçümler yapılarak 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. Mikrosporların tek çekirdekli oldukları dönemi belirlemek üzere bir ön çalışma yapılmıştır. Bu amaçla anterler aseto-karmin içinde ezilerek preparat hazırlanmış, mikroskopta mikrosporların çekirdek dönemi incelenmiş. 3-5 mm çiçek sürgünü taşıyan 5-8 mm tarak büyüklüğünün uygun olduğu saptanmış ve çalışma süresince bu büyüklükteki taraklar materyal olarak kullanılmıştır.

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 sonra steril saf su ile 3 kez durulama işlemi yapılmıştır. Bu çalışmada daha önceden hazırlanmış olan MS [10]; besi ortamı ve oksin türü NAA, IBA ve 2,4-D nin farklı konsantrasyonları ile Kinetin, BA ve TDZ nin farklı besi ortamlarına her bir petri (cam ve plastik) kabına 5 adet anter gelecek şekilde ve 3’er tekrerrük olmak üzere steril edilen anterler bistüri ve pens yardımıyla ekilmiştir. Ekimler bittikten sonra petri kaplarının kapakları kapatılıp, içerisine hava giriş-çıkışını engellemek için parafilmle kapatılıp, iklim odasında

30-60 gün aralığında karanlığa bırakılmıştır. Ekim işlemi üç günde bir tekrarlanmış ve 5 haftalık karanlık ortam inkübasyonundan sonra elde edilen embriyodleri veren kallus büyüklükleri ve embriyoid rejenerasyon oranları belirlenmiştir.

Araştırmada elde edilde verilerin varyans analizleri, JMP 7.0 istatistik (Copyright © SAS Institute Inc.) paket programı kullanılarak yapılmış, ortalamalar, LSD testi uyarınca gruplandırılmıştır.

3. Bulgular

3.1. Genotip ve anter uzunluğunun embriyoid kallus oluşumuna etkisi

Bu çalışmada serada yetiştirilen Coker-312, Aşkabat-100 ve Stoneville-468 pamuk genotiplerinin tarakları kullanılmıştır. Taraklardan izole edilen anterlerden kallus oluşumu ve embriyoid kallus başlatılmasında her çeşit için 2 mm, 3 mm, 4 mm ve 5 mm uzunluğundaki anterler 30 g/l sükröz, 6.4 g/l agar ve 2.0 mg/l 2,4-D içeren tam kuvvetteki MS besi ortamında kültüre alınmıştır. Kallus ve embriyoid kallus gelişim morfolojisi haftalık periyotlarla gözlenmiştir. Kültürün 5.haftası sonunda ise kallus ve embriyoid kallus verileri varyans analizleri incelendiğinde, genotip, anter uzunluğu ve Genotip*Anter Uzunluğu interaksyonu istatistiki olarak % 1 düzeyinde önemli olduğu saptanmıştır [Çizelge 1].

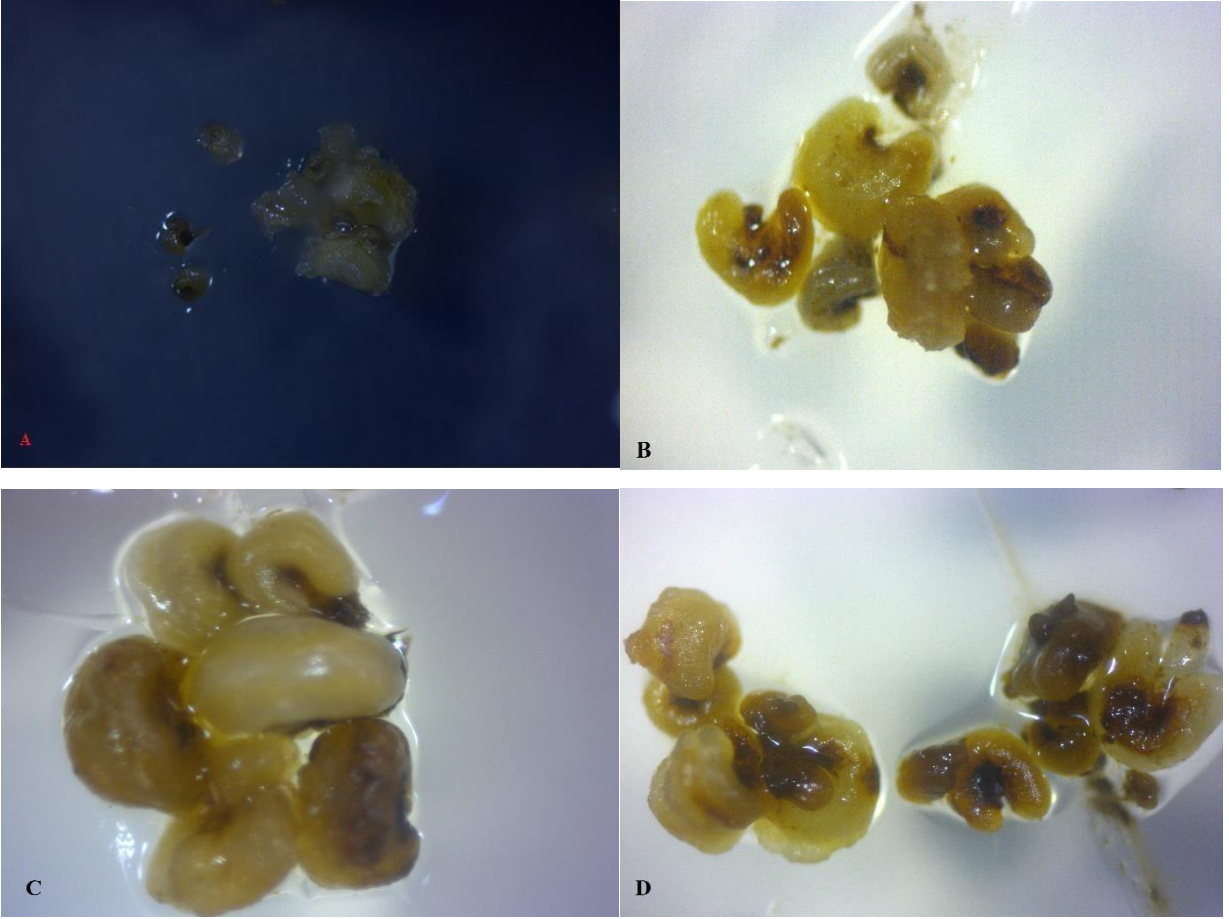
Çizelge 1. Genotip ve anter uzunluğunun embriyoid kallus kültürü başlatılması özelliğine ilişkin varyans analiz tablosu

Varyasyon Kaynakları	SD	KT	KO	F Değeri
Genotip	2	4878.899	2439.45	176.98**
Anter Uzunluğu	3	714.007	238.002	17.26**
Genotip*Anter Uzunluğu	6	1982.885	330.481	23.97**
Hata	24	330.809	13.784	
Genel Toplam	35	7906.602		
CV (%)	7.07			

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

Şekil 1’de kültüre alındıktan 1 hafta sonra farklı uzunluktaki anterlerdeki gelişmeler görülmektedir. 5 haftalık kültür sonucu çalışılan bütün genotiplerde

farklı formlarda kallus oluşmuş, en hızlı kallus gelişimi Aşkabat-100 genotipinde saptanmıştır.



Şekil 1. Kültüre alındıktan 1 hafta sonra farklı uzunluktaki anterlerden alınan mikrosporların gelişmeleri (A: Aşkabat 100, B: Coker 312, C ve D Stoneville 468).

İncelenen 3 farklı pamuk çeşidinin 2.0 mg/l 2,4-D besli ortamındaki gelişen kallus embriyoid (%) ortalamaları, [Çizelge 2]'de verilmiştir. Gelişen kallus embriyoid ortalamaları, çeşitlere bağlı olarak % 50.13 ile % 65.54 arasında değişim göstermiştir. İncelenen genotipleri içerisinde en yüksek gelişen kallus embriyoid oranı ortalaması, % 84.78 ile Aşkabat-100 genotipinde saptanmıştır. Bu genotipi % 61.84 ile Stoneville-468 genotipi izlemiştir. Söz konusu Aşkabat-100 genotipinin gelişen embriyoid kallusları, Stoneville-468 ve Coker-312 genotiplerine göre daha yüksek ($p < 0.01$) bulunmuştur.

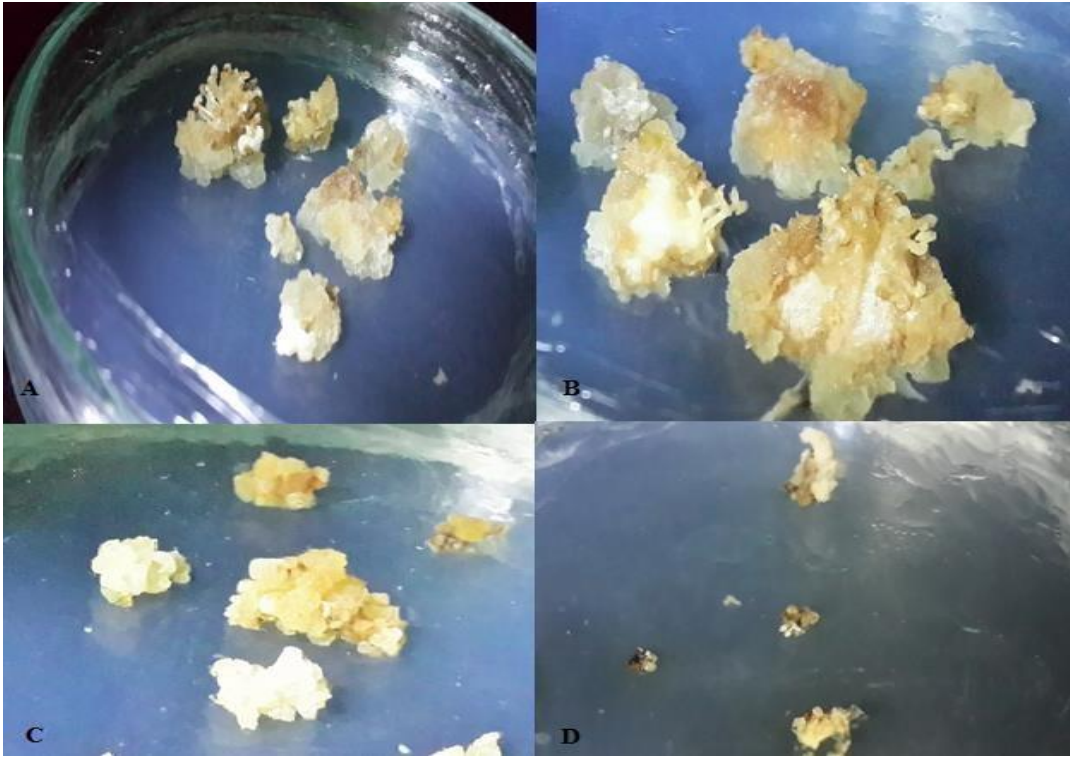
Aşkabat-100 genotipinde, 2 mm tarak boyunda en yüksek oranda embriyoid kallus (% 97) gelişimi elde edilmiştir [Çizelge 2]. Coker-312 genotipinde 3 mm tarak boyunda en yüksek embriyoid kallus elde edilirken, Stoneville-468 genotipinde, 5 mm tarak boyunda, en yüksek embriyoid kallus elde edilmiştir. Bu sonuçlar ışığında genotipler arasında tepkinin farklı olduğu ve daha sonra yapılacak çalışmalarda

2-5 mm arasındaki anter boylarının çalışılması gerektiği sonucuna varılmıştır [Şekil 2]. Anter uzunluklarının gösterdikleri reaksiyonun çeşitlere bağlı olarak farklılık göstermesi, *G. barbadense* L. türüne ait Aşkabat-100 genotipi dışındaki genotiplerinde materyal olarak kullanılması veya eklenmesi tavsiye edilebileceğini sonucunu ortaya koymaktadır.

Çizelge 2. Genotip ve anter uzunluğunun embriyoid kallus kültürü başlatılması özelliğine ilişkin ortalama değerleri

Anter uzunluğu (mm)	Genotipler			Embriyoid kallus Ortalamaları (%)
	Aşkabat-100	Coker-312	Stoneville-468	
2	97.00 a	51.00 de	43.33 ef	63.77 a
3	87.70 b	55.80 d	43.66 ef	62.38 a
4	58.50 d	32.30 g	59.60 d	50.13 b
5	90.00 b	34.00 fg	72.63 c	65.54 a
Ortalama	84.78 a	52.68 b	61.84 c	66.43
LSD _{0.05}	Genotip			3.128
	Anter Uzunluğu			3.612
	Genotip*Anter Uzunluğu			6.256

**Aynı harfler istatistiki olarak aynı grupta yer almaktadır.



Şekil 2. 5 haftalık kültür sonucu çalışılan bütün genotiplerde farklı formlarda oluşan embriyoid kalluslar: (A: Aşkabat-100'den gelişen granüler kallus, B: Coker-312, C ve D: Stoneville-468'den gelişen kırılğan yumuşak kallus tipleri)

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

Embriyoid kalluslar 5.haftadan itibaren 8. haftaya kadar aynı ortam olan 2.0 mg/l 2,4-D konsantrasyonunda alt kültüre alınmıştır. Alt kültüre aktarılan embriyoid kalluslar iklim odasında yarı ışıklı ortamda 3 hafta bekletildikten sonra ışıklı ortama alınmıştır. Embriyoid kallus gelişimlerinin devam etmesi için belli aralıklarla binoküler mikroskop altında incelenmiş ve sonunda kallus büyüklüğü, embriyoid kallus ve embriyoid oluşumu

görüntüleri kaydedilmiştir. Ardından kalluslardan oluşan embriyoid benzer yapıları, embriyoid oluşumu 8. haftada binoküler mikroskop altında sayılmıştır. Embriyoid ve embriyoid benzeri yapıların oluşumunu teşvik etmek için 8. haftada aynı ortamda alt kültüre alınmıştır.

Yapılan analiz sonucunda genotipler, anter uzunluğu ve *GenotiptxAnter Uzunluğu* interaksiyonları arasındaki farkın, istatistiki olarak %1 ($p<0.01$) düzeyinde önemli olduğu bulunmuştur [Çizelge 3].

Çizelge 3. Genotip ve anter uzunluğunun embriyoid oluşumu üzerine etkisinin başlatılması özelliğine ilişkin varyans analiz tablosu

Varyasyon Kaynakları	SD	KT	KO	F Değeri
Genotip	2	5027.396	2513.700	433.12**
Anter uzunluğu	3	1926.816	642.272	110.66**
Genotip* anter uzunluğu	6	590.227	98.371	16.94**
Hata	24	139.287	5.804	
Genel Toplam	35	7683.728		
CV (%)	6.17			

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

İncelenen pamuk genotiplerinin 2.0 mg/l 2,4-D besi ortamındaki gelişen embriyoid (adet) ortalamalarına ilişkin karşılaştırmalar [Çizelge 4] verilmiştir. Gelişen embriyoid ortalamaları, çeşitlere bağlı olarak 9 ile 85.60 adet arasında değişmiştir. İncelenen çeşitler içerisinde en yüksek gelişen embriyoid oranı ortalaması, 63.00 adet ile Aşkabat-100 genotipinde saptanmış, 27.61 adet ile Stoneville-468 izlemiştir. Aşkabat-100 genotipinde gelişen embriyoid Stoneville-468 ve Coker-312 elde edilen embriyoidlere göre daha yüksek bulunmuştur.

2.0 mg/l 2,4-D destekli besi ortamındaki Aşkabat-100, Coker-312 ve Stoneville-468 genotiplerinde en yüksek embriyoid oluşumu 2 mm anter boyunda olduğu görülmektedir. Çalışma kapsamında materyal olarak kullanılan Aşkabat-100 ve çeşitleri en yüksek embriyoid elde edilen grubu oluştururken, Coker-312 çeşidi en düşük embriyoid elde edilen grubu oluşturmuştur. 2 mm arter uzuluğunda en yüksek; 5 mm anter uzuluğunda ise, en düşük embriyoid oluşumu elde edilmiştir.

Çalışmamızda elde edilen bulgulara göre, 2.0 mg/l 2,4-D destekli besi ortamlarında tüm çeşitlerde çalışılan konsantrasyonlarda olumlu sonuçlar alındığı, embriyo oluşumu bakımından en iyi sonucun 2 mm anter uzunluğunda tüm çeşitlerde elde edildiği dikkati çekmektedir. Bu durum, 2,4-D bitki büyüme düzenleyicisinin 0.5 mg/l'dan daha düşük dozlarında incelenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. İnteraksiyonun önemli çıkması ile farklı çeşitlerde farklı sonuçlar oluşturacağı anlaşılmaktadır. Böylece çalışmanın yapılacağı çeşitlerin seçiminde ve uygulanacak BBD'nin farklı konsantrasyonlarının seçiminde dikkat edilmesi gerekmektedir. *G.barbadense* L. türüne ait Aşkabat-100 çeşidinden embriyoid oluşumu bakımından en iyi sonuç elde edilmesi, bu türe ilişkin çeşitlerden daha iyi sonuçlar elde edilebileceği ve ileriki çalışmalarda *G.barbadense*L. türüne ait çeşit/çeşitlerin materyal olarak kullanılmasının tavsiye edilebileceği kanısını oluşturmuştur.

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

Anter Uzunluğu (mm)	Genotipler			Embriyoid Oluşumu Özelliği Ortalama Değerleri
	Aşkabat-100	Coker-312	Stoneville-468	
2	85.60 a	39.43 c	34.77 cd	53.26 a
3	83.20 a	33.53 cd	30.63 d	49.12 b
4	48.93 b	14.97 f	24.00 e	29.32 c
5	48.57 b	9.00 g	28.67 de	28.74 c
Ortalama	63.00 a	21.98 c	27.61 b	37.53
LSD _{0.05}	Genotip			2.029
	Anter uzunluğu			2.343
	Genotip x anter uzunluğu			4.059

*Aynı harfler istatistiki olarak aynı grupta yer almaktadır.

4. Sonuç

Biyoteknolojik yöntemlerden kısa sürede haploid saf hatlar elde etmek amacıyla genelde polen ve anter kültürü kullanılmaktadır. Bu nedenle pamuk ıslah çalışmalarında çeşit geliştirme süresinin kısaltılması ve ekonomik kazanç sağlanması bu çalışma planlanmıştır. Aşkabat-100 gentipinde alınan farklı uzunluktaki anterlerde en yüksek oranda embriyoid kallus 2 mm uzunlukta (% 97.00), Stonevill-468 çeşidinde alınan farklı uzunluktaki anterlerde en yüksek 5 mm uzunlukta (% 72.63), Coker-312 genotipinden de alınan farklı uzunluktaki anterlerde en yüksek embriyoid kallus oluşumu 3 mm anter uzunluğunda (% 55.80), başlatılan kültürlerde elde edilmiştir. En yüksek embriyoid oluşumu Aşkabat-100' genotipinde (% 85.60), en düşük embriyoid oluşumu ise, Stoneville-468 (9.00), genotiplerinde görülürken, Aşkabat-100' de 2 mm anter uzunluğunda en düşük ise; Stoneville-468' de 4 mm anter uzunluğunda 16 haftalık inkübasyon süresi sonunda embriyoyu verecek embriyoidler oluşmuştur. Kallus oluşumu için 2-5 mm anter uzunluğu ve 2.0 mg/l 2,4-D hormon konsantrasyonunda 30-60 günlük inkübasyon süresi, 24±3°C'de ve % 70±5 nem şartlarında iklim odasında karanlıkta, pro-embriyoid oluşumu için alt kültürde 2.0 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l kinetin ve hormonsuz MS besi ortamı konsantrasyonunda 4-6 haftalık yarı aydınlık inkübasyon süresi, 24±3°C'de ve % 70±5 nem şartlarında, embriyoid oluşumu ve çoğaltılması için 0.5 mg/l kinetin ve hormonsuz MS besi ortamı konsantrasyonunda 6 haftalık aydınlık inkübasyonda, 24±3°C'de ve % 70±5 nem ve şartlarında embriyoları verebilecek embriyoidler elde edilebilmiştir.

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] Anonim. 2015. <https://www.icac.org/getattachment/Home-International-Cotton-Advisory-Committee-ICAC/measuring-sustainability-cotton-farming-full-english.pdf>
- [2] Atanassov, A., Zagorska, N., Boyadjiev, P., Djilianov, D., 1995. In vitro production of haploid plants, World J, Microbiol Biotechnol. 11: 400–408.
- [3] Christidis, B.G. and Harrison, G.F. 1955. Cotton Growing Problems. McGraw-Hill, New York
- [4] Davidonis, G.H., Hamilton R.H., 1983. Plant regeneration from callus tissue of (*Gossypium hirsutum* L.) Plant Science Letter, 32: 89-93
- [5] Forster, B.P., Heberle-Bors, E., Kasha, K.J., Touraev, A., 2007. The resurgence of haploids in higher plants. Trends in plant science, 12(8), 368-375.
- [6] Gencer, O., Özudoğru, T., Kaynak, M.A., Yılmaz, A., Ören, M. N. 2004. Türkiye'de Pamuk üretimi ve sorunları. www.zmo.org.tr/etkinlikler/6tk05/022oktaygencer.pdf
- [7] Hatipoğlu, R., 2002. Bitki Biyoteknolojisi. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Genel Yayın No: 190, Ders Kitapları Yayın No: A-58, Ç.Ü. Yayınları No: 47, Adana.
- [8] Liang, G.H., Xu, A., Tang, H., 1987. Direct generation of wheat haploids via anther culture. Crop Sci 27: 336–339.
- [9] Maluszynski, M., Kasha, K.J., Forster, B.P., Szarejko, I. (eds). 2003. Doubled haploid production in crop plants: A manual. Kluwer. Dordrecht.
- [10] Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plantarum 15: 473–497.
- [11] Reinert J., Bajaj, Y.P.S., Heberle, E., 1977 a. Factors enhancing in vitro production of haploid plants in anther and isolated microspore cultures. In: Gautheret, R., (eds). La culture des tissue et des cellules des ve'ge'taux. Mason. Paris. 47–58.
- [12] Shariatpanahi, M.E., Bal, U., Heberle-Bors, E., Touraev, A., 2006. Stresses applied for the reprogramming of plant microspores towards in vitro embryogenesis. Physiologia Plant 127:519–534.
- [13] Sharma, A.K., Sharma, A. 1972. Chromosome techniques. Butterworths/University Park Press, London/Baltimore.
- [14] Vasil, I.K., 1980. Androgenic haploids. Int. Rev. Cytol. Suppl. 11A: 19