T51524

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

Şaire Ramiz TÜRKOĞLU

PAMUKTA (*Gossypium hirsutum* L.) *İN VİTRO* REJENERASYON OLANAKLARI ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR

TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

151524

ADANA, 2004

151524

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PAMUKTA (*Gossypium hirsutum* L.) *İN VİTRO* REJENERASYON OLANAKLARI ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR

Şaire Ramiz TÜRKOĞLU
DOKTORA TEZİ
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Bu tez 25/03/2004 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği / ~~Oyçokluğu~~ İle Kabul Edilmiştir.

İmza.....
Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU
DANIŞMAN

İmza.....
Prof. Dr. Oktay GENÇER
ÜYE

İmza.....
Prof.Dr. Selim ÇETİNER
ÜYE

İmza.....
Prof. Dr. İbrahim GENÇ
ÜYE

İmza.....
Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Tarla Bitkileri Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.
Kod No : 809

T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ 1923 FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

Prof. Dr. Fikri AKDENİZ
Enstitü Müdürü
İmza ve Mühür

Bu Çalışma, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.

Proje No: FBE 2002 D11

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

DOKTORA TEZİ

PAMUKTA (*Gossypium hirsutum* L.) *İN VİTRO* REJENERASYON OLANAKLARI ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR

Şaire Ramiz TÜRKOĞLU

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU
Yıl : 2004, Sayfa : 129
Jüri : Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU
Prof. Dr. Oktay GENÇER
Prof. Dr. Selim ÇETİNER
Prof. Dr. İbrahim GENÇ
Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN

Bu çalışmada farklı pamuk çeşitlerinin farklı eksplantlarından organogenesis ve somatik embriyogenesis yoluyla bitki elde edilmesinde farklı besi ortamlarının etkisi araştırılmıştır. Anter kültürü çalışmalarında, *Gossypium hirsutum* L. türünden Çukurova 1518, Coker 312, Nazilli 84, Erşan 92, Maraş 92, Adana 98 ve Sayar 314 pamuk çeşitlerinin anterleri; organogenesis çalışmalarında, Çukurova 1518, Coker 312 ve Erşan 92 pamuk çeşitlerinin 2 ve 5 haftalık *in vitro* fidelerinden elde edilen sürgün ucu ve kotiledon nodları, somatik embriyogenesis çalışmalarında, Çukurova 1518, Coker 312 ve Erşan 92 pamuk çeşitlerinin 5-7 günlük *in vitro* fidelerinden elde edilen hipokotilleri ve 14, 21 ve 28 günlük olgunlaşmamış zigotik embriyoları kullanılmıştır.

Anter kültüründe, Coker 312 dışında kullanılan çeşitlerde, genotiplere ve besi ortamlarına göre değişen oranlarda kallus elde edilmiş, kallus oluşumu açısından en yüksek değerler, 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 besi ortamlarında kültüre alınan Adana 98 ve Erşan 92 çeşitlerinde sağlanmış, ancak farklı rejenerasyon ortamlarına aktarılan kalluslardan bitki elde edilememiştir.

Organogenesis çalışmalarında, kullanılan çeşitlerde, en uygun eksplantın sürgün ucu olduğu; eksplant reaksiyon tepkisinin besi ortamlarına göre değiştiği; Çukurova 1518 ve Erşan 92 pamuk çeşitlerinden 2 mg/l kinetin ve 2 mg/l BAP içeren MSB (B5 ortamı vitaminlerini içeren MS ortamı) besi ortamında diğer uygulamalara göre en yüksek sürgün sayılarının elde edildiği; ancak büyüme düzenleyicisi içermeyen MSB besi ortamında kültüre alınan eksplantlardan çoğalma katsayısı düşük olmakla birlikte sağlıklı ve kısa sürede köklenen sürgünlerin elde edildiği gözlenmiştir.

Somatik embriyogenesis çalışmalarında ise; 0.1 mg/l kinetin ve 2 mg/l NAA içeren MSB besi ortamında elde edilen embriyogenik kallusun büyüme düzenleyicisi içermeyen sıvı besi ortamında kültüre alınmasıyla Çukurova 1518 çeşidinin hipokotillerinden ve Coker 312 çeşidinin hipokotil ve 28 günlük embriyolarından somatik embriyolar elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Gossypium hirsutum* L., anter kültürü, organogenesis, somatik embriyogenesis

ABSTRACT

PhD THESIS

RESEARCH ON *IN VITRO* REGENERATION OF COTTON (*GOSSYPIUM HIRSUTUM* L.)

Şaire Ramiz TÜRKOĞLU

DEPARTMENT OF FIELD CROPS
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF ÇUKUROVA

Supervisior : Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU

Year : 2004, Pages : 129
Jury : Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU
Prof. Dr. Oktay GENÇER
Prof. Dr. Selim ÇETİNER
Prof. Dr. İbrahim GENÇ
Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN

This study was conducted to determine the effects of different media on plant regeneration from various explants of different cotton varieties through organogenesis and somatic embriyogenesis. Anthers of Çukurova 1518, Coker 312, Nazilli 84, Erşan 92, Maraş 92, Adana 98 and Sayar 314 cotton varieties were used for anther culture. As the source of explant for organogenesis, shoot tips and cotyledon nodes excised from 2 or 5 weeks old *in vitro* plants of Çukurova 1518, Coker 312 and Erşan 92 varieties were used. For the somatic embryogenesis part of the study, hypocotyl explants excised from 7 days old *in vitro* plants and 14, 21 and 28 days old immature zygotic embryos were used.

Different callus induction rates from the anthers were obtained depending on the genotypes and media. The highest callus induction rates were obtained from the anthers of Adana 98 and Erşan 92 cotton varieties on MS medium with 0.1 mg/l kinetin and 0.1 mg/l 2.4D or 0.1mg/l kinetin and 0.5 mg/l 2.4-D whereas plant regeneration was not obtained from the calli transferred to different regeneration media.

For the organogenesis study, it was determined that the highest number of shoots per explant were obtained from shoot tips of Çukurova 1518 and Erşan 92 cultured on MSB (MS medium with vitamins of B5 medium) with 2 mg/l kinetin and 2 mg/l BAP. It was found that the healthy plantlets with vigorous root system were obtained from the explants cultured hormone free MSB medium in spite of the the lower number of shoots.

In the somatic embryogenesis part of the study, embryogenic calli were obtained on MSB medium with 0.1 mg/l kinetin and 2 mg/l NAA, and somatic embryos were obtained from embryogenic calli cultured on hormone free liquid MSB medium.

Key Words: *Gossypium hirsutum* L., anther culture, organogenesis, somatic embryogenesis

TEŞEKKÜR

Bana bu çalışma konusunda tez yapma olanağı veren ve çalışma sırasında her aşamada bilgi, deneyim ve önerileri ile hep yanımda hissettiğim, yakın ilgisi, desteği ve özverisi ile değerli yardımlarını gördüğüm sayın hocam Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU'na teşekkür ederim. Ayrıca, tez çalışmasının yürütülmesi sırasında bölüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan sayın Hocam Prof. Dr. İbrahim GENÇ'e teşekkür etmeyi borç bilirim. Çalışmanın yürütülmesi sırasında maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen Çukurova Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü idarecilerine, çalışma arkadaşlarıma ve Tarla Bitkileri Bölüm personeline teşekkür ederim. Aynı zamanda laboratuvar çalışmalarının yürütülmesi sırasında yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Nafiz ÇELİKTAŞ'a, Ar. Gör. Sevda ALTINTAŞ'a, Ar. Gör. İbrahim ATIŞ'a, Çukurova Tarımsal Araştırma Enstitüsü Pamuk Şubesi çalışma arkadaşlarım Ayten DOLANÇAY, Hacer KAYA ve Dr. Petek TOKLU'ya teşekkür ediyorum.

Aynı zamanda sınıf öğretmenliği yaptığım dönemde, çok istediğim ama yapmayı hayal bile edemediğim bu çalışmaya başlamak için beni cesaretlendiren ve her döneminde değerli yardımlarıyla yanımda olduğunu hissettiğim Yrd. Doç. Dr. Yıldız AKA KAÇAR'a yürekten teşekkür ediyor, çalışmam sırasındaki teknik yardımlarının yanında dostluğuyla güç veren Yrd. Doç. Dr. Yeşim YALÇIN MENDİ'ye şükranlarımı sunuyorum.

Bu uzun süreli çalışma boyunca tüm sorumluluklarımı paylaşarak hep yanımda olan, sevgi, hoşgörü, özveri ve sabırla bana yardımcı olan çok özel iki kişiye, sevgili ablam Nedime'ye ve değerli annem Ayten KARADAĞ'a derin şükranlarımı sunuyorum. Aynı zamanda çalışmam sırasında teşvikleriyle bana güç veren AKTARAN ailesine, anlayış ve desteğini benden esirgemeyen eşim Serdar'a ve benimle yaşamı daha çok paylaşmayı sabırla bekleyen ve beklerken büyüyen sevgili oğlum Ahmet Can'a yürekten teşekkür ediyorum.

SİMGELER VE KISALTMALAR

BAP	6-benzil aminopurin
Kin	Kinetin
2İP	İzopentil adenin
2,4- D	2,4- diklorofenoksiasetik asit
GA3	Gibberellik asit
IAA	İndol-3-asetik asit
IBA	İndol-3-bütürik asit
NAA	Naftalen asetik asit
PBA	N-Benzyl-9(2-tetra-hydropyranyl)adenine
TDZ	Thidiazuron
Zea, ZT	Zeatin
EDTA	Ethilendiamintetra asetik asit
mg/l	Miligram /litre
M	Molar
µM	Mikromol
MS	Murashige ve Skoog (1962)
B5	Gamborg ve ark. (1968)
MSB	MS vitaminleri yerine B5 vitaminleri içeren Murashige ve Skoog (1962) besi ortamı

İÇİNDEKİLER **Sayfa No:**

ÖZ I

ABSTRACT II

TEŞEKKÜR III

SİMGELER VE KISALTMALAR IV

ÇİZELGELER DİZİNİ V

ŞEKİLLER DİZİNİ IX

1. GİRİŞ 1

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 6

2.1. Anter Kültürü 6

2.2. Organogenesis 9

2.3. Somatik Embriyogenesis 16

3. MATERYAL VE METOT 36

3.1. Materyal 36

3.1.1. Anter Kültürü Çalışmalarında Materyal 36

3.1.2. Organogenesis Çalışmalarında Materyal 36

3.1.3. Somatik Embriyogenesis Çalışmalarında Materyal 38

3.2. Metot 38

3.2.1. Besi Ortamlarının Hazırlanması 38

3.2.1.1. Makro ve Mikro Elementlerin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması 38

3.2.1.2. Demir Jelat ($FeSO_4.7H_2O$ ve Na_2EDTA) Stok Çözeltisinin Hazırlanması 40

3.2.1.3. Vitamin Stok Çözeltisinin Hazırlanması 41

3.2.1.4. Büyüme Düzenleyicilerinin Stok Çözeltisinin Hazırlanması..... 41

3.2.1.5. Stok Çözeltiler Kullanılarak Besi Ortamının Hazırlanması..... 41

3.2.2. Eksplantların Hazırlanması ve Kültür Aşamaları..... 42

3.2.2.1 Anter Kültüründe Eksplantların Hazırlanması ve Kültür Aşamaları..... 42

3.2.3.2 Organogenesis Çalışmalarında Eksplantların Hazırlanması ve Kültür Aşamaları..... 44

3.2.3.3 Somatik Embriyogenesis Çalışmalarında Eksplantların Hazırlanması ve Kültür Aşamaları..... 47

3.2.3.3.(1). Hipokotil Eksplantlarının Hazırlanması ve Kültürü..... 49

3.2.3.3.(2). Olgunlaşmamış Embriyo Eksplantlarının Hazırlanması ve Kültürü..... 54

3.2.3. İncelenen Özellikler..... 56

3.2.3.1 Anter Kültüründe İncelenen Özellikler..... 56

3.2.3.1.(1). Reaksiyon Gösteren Anter Oranı..... 56

3.2.3.1.(2). Kallus Büyüklüğü..... 56

3.2.3.2. Organogenesiste İncelenen Özellikler..... 57

3.2.3.2.(1). Eksplant Reaksiyon Oranı..... 57

3.2.3.2.(2). Sürgün Rejenerasyon Oranı..... 57

3.2.3.2.(3). Köklenme Oranı..... 57

3.2.3.2.(4). Yaşama Oranı..... 57
3.2.3.3. Somatik Embriyogenesiste İncelenen Özellikler..... 57
3.2.3.3.(1). Kallus İndüksiyon Oranı..... 57
3.2.3.3.(2). Embriyogenik Kallus Oluşturma Oranı.... 58
3.2.3.3.(3). Somatik Embriyo Sayısı..... 58
3.2.4. Araştırmada Elde Edilen Verilerin Değerlendirilmesi..... 58
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA..... 60
4.1. Anter Kültürü İle İlgili Bulgular ve Tartışma..... 60
4.1.1. Kallus İndüksiyonu 60
4.1.1.1. Reaksiyon Gösteren Anter Oranı (%)..... 62
4.1.1.2. Kallus Büyüklüğü 66
4.1.2. Bitki Rejenerasyonu..... 69
4.2. Organogenesis Araştırması İle İlgili Bulgular ve Tartışma..... 70
4.2.1. Sürgün Rejenerasyonu..... 70
4.2.1.1. Eksplant Reaksiyon Oranı (%)..... 73
4.2.1.2. Sürgün Rejenerasyon Oranı (Sürgün Sayısı/ Eksplant)..... 76
4.2.2. Köklenme..... 83
4.2.2.1. Köklenme Oranı (%)..... 83
4.2.3. Alıştırma Aşaması Bulguları ve Tartışma..... 87
4.3. Somatik Embriyogenesis Bulguları ve Tartışma..... 89
4.3.1. Hipokotil Eksplantı Bulguları ve Tartışma..... 89

4.3.1.1. Çukurova 1518 Pamuk Çeşidi İle Yürütülen Besi Ortamı Belirleme Denemesi İle İlgili Bulgular ve Tartışma..... 89

4.3.1.1.(1). Kallus İndüksiyonu Oranı (%)..... 90

4.3.1.2. Çukurova 1518, Coker 312 ve Erşan 92 Pamuk Çeşitleri İle Yürütülen Deneme İle İlgili Bulgular ve Tartışma..... 92

4.3.1.2.(1). Kallus İndüksiyon Oranı (%)..... 97

4.3.1.2.(2). Embriyogenik Kallus İndüksiyon Oranı (%)..... 98

4.3.1.2.(3). Somatik Embriyo Sayısı (somatik embriyo/ g kallus)..... 101

4.3.1.2.(4). Anormal Somatik Embriyo Oluşumu..... 105

4.3.2. Olgunlaşmamış Embriyo Eksplantı İle İlgili Bulgular ve Tartışma..... 108

4.3.2.1. Çukurova 1518 Pamuk Çeşidi İle Yürütülen Besi Ortamı Belirleme Denemesi İle İlgili Bulgular ve Tartışma..... 108

4.3.2.1.(1). Kallus İndüksiyon Oranı (%)..... 109

4.3.2.2. Çukurova 1518, Coker 312 ve Erşan 92 Pamuk Çeşitleri İle Yürütülen Deneme ile İlgili Bulgular ve Tartışma..... 111

4.3.2.2.(1). Kallus İndüksiyon Oranı (%)..... 113

4.3.2.2.(2). Embriyogenik Kallus İndüksiyon Oranı (%)..... 114

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER..... 117

KAYNAKLAR..... 121

ÖZGEÇMİŞ..... 129

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No:

Çizelge 3.1. Denemede Kullanılan Pamuk Çeşitlerinin Özellikleri..... 37

Çizelge 3.2. Araştırmada Kullanılan MS (Murashige ve Skoog, 1962) Besi Ortamının Bileşimi 39

Çizelge 3.3. MS ve B5 Vitaminleri..... 40

Çizelge 3.4. Anter Kültüründe Kallus İndüksiyon ve Kallus Çoğaltma İçin Kullanılan MS Ortamlarının Büyüme Düzenleyicisi İçerikleri.... 43

Çizelge 3.5. Anter Kültüründe Bitki Rejenerasyonu İçin Kullanılan Farklı MS Ortamlarının Büyüme Düzenleyicisi ve Şeker İçerikleri..... 44

Çizelge 3.6. Organogenesis Çalışmalarında Kullanılan MSB Besi Ortamlarının Büyüme Düzenleyicisi İçerikleri 46

Çizelge 3.7. Hipokotil Eksplantlarının Kullanıldığı Çukurova 1518 Pamuk Çeşidi İle Yürütülen Besi Ortamı Belirleme Çalışmasında Kullanılan Besi Ortamları..... 48

Çizelge 3.8. Olgunlaşmamış Embriyo Eksplantlarının Kullanıldığı Çukurova 1518 Pamuk Çeşidi İle Yürütülen Besi Ortamı Belirleme Çalışmasında Kullanılan Besi Ortamları..... 48

Çizelge 3.9. Hipokotil ve Olgunlaşmamış Embriyo Eksplantlarının Kullanıldığı Çukurova 1518, Coker 312 ve Erşan 92 Pamuk Çeşitleri İle Yürütülen Çalışmada Kullanılan Besi Ortamları..... 49

Çizelge 3.10. Somatik Embriyogenesis Çalışmalarında Kullanılan Sıvı Kültür, Embriyo Olgunlaştırma ve Embriyo Çimlenmesi İçin Kullanılan Besi Ortamları..... 51

Çizelge 4.1. Farklı Pamuk Genotiplerinin Farklı Besi Ortamlarındaki Anter Reaksiyon Oranları ile İlgili Varyans Analiz Sonuçları..... 62

Çizelge 4.2. Farklı Pamuk Genotiplerinin Farklı Besi Ortamlarındaki Anter Reaksiyon Oranı Ortalamaları (%)..... 63

Çizelge 4.3. Farklı Pamuk Genotiplerinin Anterlerinden Farklı Besi Ortamlarında Oluşan Kallusların Büyüklükleri (mm^2)..... 67

Çizelge 4.4. Farklı Pamuk Genotiplerinin Farklı Yaştaki *İn Vitro* Fidelerinden Elde Edilen Farklı Eksplantların Farklı Besi Ortamlarındaki Eksplant Reaksiyon Oranlarına (%) İlişkin Varyans Analiz Sonuçları..... 74

Çizelge 4.5. Farklı Pamuk Genotiplerinin 2 ve 5 Haftalık Fidelerinden Alınan Sürgün Ucu ve Kotiledon Nodu Eksplantlarının Farklı Besi Ortamlarında Eksplant Reaksiyon Oranı (%) Ortalamaları.. 75

Çizelge 4.6. Farklı Pamuk Genotiplerinin Farklı Yaştaki *İn Vitro* Fidelerinden Elde Edilen Farklı Eksplantların Farklı Besi Ortamlarındaki Sürgün Rejenerasyon Oranlarına (Sürgün Sayısı/Eksplant) İlişkin Varyans Analiz Sonuçları..... 77

Çizelge 4.7. Farklı Pamuk Genotiplerinin 2 ve 5 Haftalık Fidelerinden Alınan Sürgün Ucu ve Kotiledon Nodu Eksplantlarının Farklı Besi Ortamlarında Sürgün Rejenerasyon Oranı (Sürgün Sayısı/Eksplant) Ortalamaları..... 78

Çizelge 4.8. Farklı Pamuk Genotiplerinin Farklı Yaştaki *İn Vitro* Fidelerinden Alınan Farklı Eksplantlarından Farklı Besi Ortamlarında Elde Edilen Sürgün Rejeneratlarının Büyüme Düzenleyicisi İçermeyen MSB Besi Ortamındaki Köklenme Oranlarına (%) İlişkin Varyans Analiz Sonuçları..... 84

Çizelge 4.9. Farklı Pamuk Genotiplerinin 2 ve 5 Haftalık Fidelerinden Alınan Sürgün Ucu ve Kotiledon Nodu Eksplantlarından Farklı Besi Ortamlarında Elde Edilen Sürgün Rejeneratlarının Köklenme Oranı (%) Ortalamaları 85

Çizelge 4.10. Çukurova 1518 Pamuk Çeşidi Hipokotillerinin Farklı Besi Ortamlarındaki Kallus İndüksiyon Oranları ile İlgili Varyans Analiz Sonuçları 90

Çizelge 4.11. Çukurova 1518 Hipokotillerinin Farklı Besi Ortamlarındaki Kallus İndüksiyon Oranı (%) Ortalamaları..... 91

Çizelge 4.12. Farklı Pamuk Çeşitlerinin Hipokotil Eksplantlarının Farklı Besi Ortamlarındaki Kallus İndüksiyon Oranları ile İlgili Varyans Analiz Sonuçları..... 97

Çizelge 4.13. Farklı Pamuk Çeşitlerinin Hipokotil Eksplantlarının Farklı Besi Ortamlarındaki Kallus İndüksiyon Oranı (%) Ortalamaları..... 98

Çizelge 4.14. Farklı Pamuk Çeşitlerinin Hipokotil Eksplantlarının Farklı Besi Ortamlarındaki Embriyogenik Kallus Oluşturma Oranları ile İlgili Varyans Analiz Sonuçları..... 98

Çizelge 4.15. Farklı Pamuk Genotiplerinin Hipokotil Eksplantlarının Farklı Besi Ortamlarındaki Embriyogenik Kallus Oluşturma Oranı (%) Ortalamaları..... 99

Çizelge 4.16. Farklı Pamuk Çeşitlerinin Hipokotil Eksplantlarının Farklı Besi Ortamlarında Oluşturdukları Kalluslardan Elde Edilen Somatik Embriyo Sayıları ile İlgili Varyans Analiz Sonuçları..... 103

Çizelge 4.17. Farklı Pamuk Çeşitlerinin Hipokotil Eksplantlarının Farklı Besi Ortamlarında Oluşturdukları Kalluslardan Elde Edilen Somatik Embriyo Sayıları (somatik embriyo sayısı / gram kallus) Ortalamaları..... 104

Çizelge 4.18. Çukurova 1518 Pamuk Çeşidinin Farklı Yaşlardaki Olgunlaşmamış Embriyolarının Farklı Besi Ortamlarındaki Kallus İndüksiyon Oranları ile İlgili Varyans Analiz Sonuçları. 110

Çizelge 4.19. Çukurova 1518 Pamuk Çeşidinin Farklı Yaşlardaki Embriyolarının Farklı Besi Ortamlarındaki Kallus İndüksiyon Oranı (%) Ortalamaları ve Kallus Özellikleri..... 111

Çizelge 4.20. Farklı Pamuk Çeşitlerinin 28 Günlük Olgunlaşmamış Embriyolarının Farklı Besi Ortamlarındaki Kallus İndüksiyon Oranları ile İlgili Varyans Analiz Sonuçları..... 113

Çizelge 4.21. Farklı Pamuk Genotiplerinin Farklı Besi Ortamlarında 28 Günlük Embriyolardan Kallus İndüksiyon Oranı (%) Ortalamaları..... 113

Çizelge 4.22. Farklı Pamuk Çeşitlerinin Olgunlaşmamış Embriyo Eksplantlarının Farklı Besi Ortamlarındaki Embriyogenik Kallus Oluşturma Oranları ile İlgili Varyans Analiz Sonuçları.. 114

Çizelge 4.23. Farklı Pamuk Genotiplerinin 28 Günlük Olgunlaşmamış Embriyo Eksplantlarının Farklı Besi Ortamlarındaki Embriyogenik Kallus Oluşturma Oranı (%) Ortalamaları..... 115

ŞEKİLLER DİZİNİ **Sayfa No:**

Şekil 3.1. Pamukta Anter Kültürü..... 42

Şekil 3.2. Organogenesis Çalışmalarında Sürgün Ucu ve Kotiledon Nodlarının Kültürü..... 45

Şekil 3.3. Hipokotillerin Kültüre Alınması..... 50

Şekil 3.4. Somatik Embriyogenesis Çalışmalarında Sıvı Kültür..... 51

Şekil 3.5. Somatik Embriyogenesis Çalışmalarında Sıvı Kültür Sonrası Uygulamalar..... 53

Şekil 3.6. Olgunlaşmamış Embriyoların (28 günlük) Kültüre Alınması..... 55

Şekil 4.1. Pamuk Anterlerinden Kallus Oluşumu..... 61

Şekil 4.2. Farklı Pamuk Genotiplerinde Farklı Besi Ortamlarının Anter Reaksiyon Oranına Etkisi..... 65

Şekil 4.3. Farklı Besi Ortamlarının Farklı Pamuk Genotiplerinin Anterlerinden Oluşan Kallusun Büyüklüğüne Etkisi..... 68

Şekil 4.4. Anter Kültüründe Farklı Çoğaltma Ortamlarında Elde Edilen Kallusların Farklı Rejenerasyon Ortamlarındaki Tepkileri..... 69

Şekil 4.5. Organogenesis Çalışmalarında Sürgün Oluşumu..... 72

Şekil 4.6. Farklı Besi Ortamlarının Farklı Pamuk Genotiplerinde Sürgün Rejenerasyon Oranına Etkisi..... 80

Şekil 4.7. Farklı Besi Ortamlarının Farklı Pamuk Genotiplerinde Sürgün Rejenerasyon Oranına Etkisi..... 82

Şekil 4.8. Organogenesis Çalışmalarında Köklenme ve Dış Koşullara Alıştırma Aşamaları..... 88

Şekil 4.9. Pamukta Hipokotillerden Oluşan Kallusun Sıvı Ortamda Kültürü Sonrası Elde Edilen Embriyogenik Yapılar ve Farklı Gelişme Aşamalarındaki Somatik Embriyolar..... 93

Şekil 4.10 Somatik Embriyoların Köklendirilmesi ve Bakteri Enfeksiyonu. 96

Şekil 4.11. Farklı Besi Ortamlarının Farklı Pamuk Genotiplerinde Embriyogenik Kallus Oluşturan Hipokotil Oranı (%) Üzerindeki Etkileri..... 102

Şekil 4.12 Farklı Pamuk Çeşitlerinde Farklı Besi Ortamlarının Hipokotillerden Elde Edilen Embriyogenik Kalluslardan Oluşan Somatik Embriyo Sayısı Üzerine Etkisi..... 106

Şekil 4.13 Somatik Embriyogenesis Çalışmalarında Oluşan Anormal Somatik Embriyolar ve Üzerlerinde İkincil Somatik Embriyo Oluşumları..... 107

1. GİRİŞ

654 bin ha ekim alanı, 880 bin ton üretimi ve 1345 kg/ha verimi (Özüdoğru, 2002) ile Dünya'nın en önemli pamuk üretici ülkelerinden biri olan ülkemiz, 1924'lerden başlayarak sürdürülen pamuk ıslah çalışmaları ve geliştirilen üretim tekniklerinin üreticilere başarılı şekilde aktarılması sayesinde lif pamuk verimi bakımından da önemli pamuk yetiştiricisi ülkeler arasında ilk sıralarda yer almaktadır.

Dünya'da uzun yıllardır uygulanmakta olan ıslah çalışmaları ile verim, erkencilik, bitki tipi, hastalıklara, fırtınaya dayanıklılık ve lif kalitesi açısından istenilen özelliklere sahip pek çok pamuk çeşidi elde edilmiştir. Ancak, günümüzde de yaygın olarak kullanılmakta olan klasik ıslah yöntemleri; yoğun işgücü ve uzun bir zamana gereksinim duyan yöntemlerdir. Buna karşılık, insan nüfusundaki hızlı artış ve tüketici talebindeki değişime uygun olarak pamuk üretiminin miktar ve kalite açısından artırılması gerekmektedir. Diğer taraftan, bugüne kadar pamuk verim ve kalitesinin artırılmasına büyük katkılar sağlayan tarım tekniklerinin (gübreleme, sulama, yabancı ot ve zararlıların kontrolü vb.), özellikle bilinçsiz bir şekilde kullanıldıklarında, çevreyi olumsuz yönde etkilediği ve doğal dengeyi bozduğu ortaya çıkmıştır. Diğer kültür bitkilerinin ıslahında olduğu gibi, pamuk ıslahında karşılaşılan en önemli sorunlardan birisi de; ıslahta kullanılan pamuk gen kaynaklarındaki varyasyonun her geçen gün azalmasıdır.

Bitki fizyolojisi, bitki biyokimyası ve moleküler genetik alanında 20. yüzyılın ikinci yarısından itibaren sağlanan hızlı gelişmeler, insanoğlunun bitkisel üretimde verim ve kaliteyi artırma yönündeki çalışmalarında karşılaşılan yukarıda bahsedilen sorunların çözümüne yardımcı olabilecek yeni yöntemlerin geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Başlangıçta daha çok model bazı bitkilerde uygulanabilen ve biyoteknolojik yöntemler adı verilen bu yöntemler, son 25-30 yıl içerisinde ekonomik öneme sahip kültür bitkilerinde de uygulanmaya başlanmış ve 8-10 yıldır başarılı örnekleri uygulamaya aktarılmıştır.

Bitkilerde bilinen klasik ıslah yöntemleriyle çözülemeyen veya çözümü 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 suni besi ortamlarında kültür edilme ve genetik olarak değiştirilme tekniklerinden oluşan bir teknikler bütünüdür (Hatipoğlu, 2002). Bilinen bitkisel üretim ve bitki ıslahı yöntemlerini bütünleyici nitelikte olan biyoteknolojik yöntemler; *İn vitro* Kültür Teknikleri ve Genetik Manipulasyon Teknikleri (Genetik Mühendisliği) olarak iki grup altında toplanabilmektedir. Bu iki gruptaki teknikler, birbirinden bağımsız değildir. Özellikle ikinci gruptaki teknikler, birinci gruptaki tekniklere büyük bağımlılık göstermektedir. Nitekim gen mühendisliğinde kullanılan hücre ve protoplastlar, *in vitro* kültür teknikleri yardımıyla elde edilmekte ve gen aktarılmış hücre veya protoplastlardan yine *in vitro* kültür teknikleri ile bitki rejenerasyonu gerçekleştirilmektedir.

Çok yaygın olmamakla birlikte, *in vitro* kültür teknikleri, pamuğa ilişkin bazı sorunların çözümü için kullanılmaktadır. Kültürü yapılan pamuk çeşitleri yabancı tozlanma ve çırçırlama sırasında mekanik tohum karışımı nedeniyle hızlı şekilde dejenere olmaktadır. Bu nedenle, çeşitlerin genetik safiyetinin ve özellikle gen kaynağı koleksiyonlarının sürdürülmesi çok güçtür. Klonal çoğaltma genotiplerin safiyetini korumak için yardımcı olmakla birlikte, pamukta vejetatif üretim yoluyla konvensiyonel çoğaltma metotları yeterince hızlı ve güvenilir değildir ve *in vitro* çoğaltma metotları mikroçoğaltma için uygulanabilmektedir (Bajaj ve Gill, 1992). Pamukta, sürgün uçları, meristemler, genç ovuller ve embriyoların *in vitro* kültürü yoluyla bitkiler üretilmektedir. Sürgün ucu / meristem kültürü, en yaygın olarak kullanılan *in vitro* çoğaltma metotlarından birisidir. Böyle bitkiler bazı patolojik çalışmalar ve genotip çevre interaksiyonu çalışmaları, tohum elde edilemeyen yabani türlerin gen kaynağı koleksiyonları, türlerarası melezlerin çoğaltılması (Bajaj ve Gill, 1992) ve bazı genetik mühendisliği çalışmaları (Momtaz, 1998; Mc Naughton ve Rey, 1998; Djatev ve ark., 1998; Morre ve ark., 1998) için kullanılabilmektedir. Son yıllarda somatik embriyogenesisin genotipe bağımlılığının üstesinden gelmek için, tüm bitkilerin organogenesis ile rejenere edilebildiği bir yöntem olan sürgün uçlarının rejenerasyonu ve transformasyonunu optimize etmeye yönelik pek çok çalışma yapılmaktadır (Thea ve ark., 2000). Genç ovul ve embriyoların kültürü, normal

koşullarda elde edilmesi zor veya olanaksız olan türlerarası melezlerin üretimi için ümitvar bir teknik olarak görülürken, embriyo kültürü, aynı zamanda yaşama şansı düşük embriyolar veya uzun dormansiye sahip tohumlara sahip pamuk türlerinin üretimi için de kullanılmaktadır (Bajaj ve Gill, 1992). Kallus/süspansiyon kültürlerinden somatik embriyogenesis yoluyla mikroçoğaltma (Trolinder ve Goodin, 1988a ; Trolinder ve Goodin, 1988b; Gawel ve Robacker, 1990; Carvalho ve ark., 1992; Zhang ve ark., 1998 b) en hızlı çoğaltma yöntemlerinden birisi olmakla birlikte, *Gossypium hirsutum*'un çok az sayıdaki genotipi ile sınırlıdır (Bajaj ve Gill, 1992; Trolinder, 1995). Pamukta; anter kültürü (Zhang ve ark., 1998 a) ve protoplast kültürlerinin hala gelişmeye gereksinimi vardır (Bajaj ve Gill, 1992).

Tarımsal üretimin artırılmasında modern biyoteknolojik yöntemler arasında en fazla ilgi çekeni, gen aktarma teknikleridir. 1970'li yıllarda başlayan gen teknolojisi, herhangi bir organizmadan izole edilen genlerin herhangi bir taksonomik sınırlama olmaksızın bir organizmadan diğer bir organizmaya aktarılmasına olanak sağlamaktadır (Hatipoğlu, 2002). Pamukta gen aktarımı çoğunlukla *Agrobacterium* yöntemi kullanılarak, somatik embriyogenesis yoluyla ve özellikle son yıllarda sürgün uçları/ meristemlere gen transferini sağlayan partikül tabancası (biyolistik) yöntemi ile yapılmaktadır (Trolinder, 1995). Ancak bu yöntemlerin, özellikle daha etkin olduğu bilinen *Agrobacterium* yönteminin uygulanabilmesi için *in vitro* kültürde çok zor tepki veren pamuk bitkisinin rejenerasyonu en önemli sorunlardan birisidir ve ne yazık ki *Gossypium hirsutum*'un çok az sayıdaki genotipinde somatik embriyogenesis yoluyla bitki rejenerasyonu gerçekleştirilebilmektedir (Bajaj ve Gill, 1992). *Agrobacterium* ile gen aktarmada, rejenerasyon yeteneği yüksek olan Coker pamuk çeşitleri kullanılmaktadır. Bu amaçla istenilen genler, önce Coker 312' ye transfer edilmekte ve daha sonra bu genler istenilen çeşitlere geri melezlemeler yoluyla aktarılmaktadır (Trolinder, 1995).

1985 yılına kadar, moleküler biyoloji tekniklerini kullanarak gen aktarmak amacıyla *in vitro* koşullarda kültüre alınan pamuk bitkisi, yeterince yüksek etkinlikte rejenere edilememiş ve pamukta gen mühendisliği ilk kez 1987 yılında uygulanmıştır (Trolinder, 1995). Dünya'da transgenik pamuk yetiştiren ilk ülke olan ABD'de tüm düzenleyici formaliteler 1995 yılı sonunda tamamlanmış; *Bacillus thuringiensis*

bakterisinden izole edilen endotoksin geninin aktarılmasıyla Lepidoptera familyasında bazı böceklere karşı dayanıklı hale getirilen pamuk çeşitleri (Bt'li çeşitler) ve total herbisitlere dayanıklılık kazandırılan pamuk çeşitleri 1996-1997 sezonunda ilk kez ticari boyutlu olarak yetiştirilmeye başlanmıştır. Ayrıca, son yıllarda transgenik pamuk çeşitleri, Avustralya, Çin, Meksika ve Hindistan'da da yetiştirilmeye başlanmıştır (James, 2003). Dünya'da transgenik pamuk alanı 1996 yılında 0.8 milyon ha iken 2003'de 7.2 milyon hektara yükselmiştir (James, 2003). Bugün insektisitlerle kontrolü çok güç olan Lepidopterlere (özellikle koza kurtlarına) karşı dayanıklı Bt'li pamuk ve herbisitlere toleranslı ve her iki özelliği tanımlayan genleri birlikte taşıyan transgenik pamuk çeşitleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Gen aktarma çalışmaları sürmekte olan yaprak kıvırcıklık virüsüne karşı dayanıklı pamuk, doğal renkli pamuk, polyester-tipi kaliteye sahip pamuk, gossypolsüz tohumlu pamuk, yanmaya dayanıklı ve kırışmayan lif kalitesine sahip pamuk, gelecekte ticari üretimi yapılacak transgenik pamuk çeşitleri arasında olabilecektir (ICAC, 1997).

ABD ve Avustralya dışındaki ülkeler için kendi transgenik pamuk çeşitlerini geliştirmenin çok uzun zaman alacağı; bu ülkelerin iki seçeneğinin bulunduğu belirtilmektedir: (1) Birkaç yıl yoğun biçimde çalışarak kendi transgenik çeşitlerini geliştirmek veya (2) Teknoloji bedelini ödeyip mevcut transgenik çeşitleri hemen yetiştirmeye başlamak. Bazı ülkeler kendi spesifik yetişme koşulları nedeniyle diğer ülkelerden gelen çeşitleri tercih etmemekte; uzun süre ve yoğun işgücü gerektirmesine rağmen kendi programlarını geliştirmeye çalışmaktadırlar. Arjantin, Bolivya, Çin, Kolombia, Yunanistan, Meksika, Paraguay, Güney Afrika ve Zimbabwe gibi ülkeler kendi transgenik çeşitlerini geliştirmek amacıyla gen aktarma çalışmalarını sürdürmektedirler (ICAC, 1997).

Ülkemizde bitki biyoteknolojisi araştırmaları ve uygulamaları henüz başlangıç aşamasında olmakla birlikte, gelecekte ülkemiz açısından büyük ekonomik öneme sahip olan pamuğun, biyogüvenlik koşulları da dikkate alınarak hastalık ve zararlılara dayanıklılık, herbisitlere tolerans ve özellikle lif kalitesinin iyileştirilmesine yönelik genetik transformasyon programlarının geliştirilmesi beklenmektedir.

Bu çalışmada; pamuk bitkisinde biyoteknolojik tekniklerin uygulanmasına bir alt yapı oluşturulmasına yardımcı olmak üzere, ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen bazı pamuk çeşitlerimizin rejenerasyon çalışmalarında yaygın olarak kullanılan Coker 312 pamuk çeşidi ile de kıyaslanarak, *in vitro* kültürde rejenerasyon yeteneklerinin belirlenmesi ve rejenerasyon protokolünün geliştirilmesi amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Bu çalışmada; 1) anter kültürü tekniği ile haploid pamuk bitkilerinin elde edilmesi, 2) farklı eksplantlardan organogenesis yoluyla bitki rejenerasyonu ve 3) farklı eksplantlardan somatik embriyogenesis yoluyla bitki rejenerasyonu olmak üzere üç farklı konuda çalışılmıştır. Aşağıda, her çalışma konusu ile ilgili literatür özetleri ayrı bölümler halinde verilmiştir.

2.1. Anter Kültürü

Baluch (1979), *Gossypium* Türleri üzerinde sürdürdüğü anter kültürü çalışmasında; *G. hirsutum* L.ve *G. arboreum* L. x *G .anomalum* L.ve *G. arboreum* L.x *G. hirsutum* L. melezlerinin geç mayoz safhasından tetrad safhasına kadar değişen gelişme dönemlerinde mikrosporlar içeren anterlerini, karbon kaynağı olarak sakkaroz ve büyüme düzenleyicisi olarak ise 5 mg/l NAA ve 1 mg/l kinetin eklenmiş olan Gresshof ve Doy (1972) besi ortamında, 25±1°C sıcaklık koşullarında kültüre almıştır. Kültüre alındıktan üç hafta sonra anterlerin dışına doğru çıkan beyazımsı kallus oluşumunu gözlemiş ve bu kallusun, mikrospor orijinli gibi göründüğünü bildirmiştir. Çalışmada kültüre alınan *G. hirsutum* türü ve *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 kallus elde edilememiştir.

Turaev ve Shamina (1985), pamukta anter kültürü için besi ortamı kompozisyonunu optimize etmek amacıyla yürüttükleri çalışmada, farklı üç pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) hattı'nın tek çekirdekli dönemde mikrosporlar içeren anterlerini iki farklı konsantrasyonda (0.1 mg/l ve 2 mg/l) kinetin ve 2,4-D ve iki farklı konsantrasyonda (% 1 ve % 5) glukoz içeren agar ile katılaştırılmış Nitsch ortamlarında kültüre almışlardır. Araştırıcılar, kinetinin kallus oluşumu için mutlaka gerekli olmadığını; ancak diğer faktörlerle kombinasyon halinde iken pozitif etkiler ortaya çıkardığını; 2.4-D'nin, tüm incelenen hatlarda kallus indüksiyonunu sınırlayan bir faktör olduğunu ve 2 mg/l konsantrasyonunda kallus indüksiyonunda pozitif bir

etkiye sahip olduğunu; glukozun %3'ü geçmemek üzere gerekli olduğunu ve %5-10 glukozda, tüm hatlarda, kallus oluşumunun inhibe olduğunu saptamışlardır. Ayrıca, incelenen hatlar arasında androgenesis yönünden dikkate değer genotipik farklılık bulunduğunu bildirmişlerdir.

Zhang ve ark. (1996) tarafından yabani pamuk türü *Gossypium klotzschianum* Anderss'te yürütülen anter kültürü araştırmalarında, tek çekirdekli mikrosporlar içeren anterleri taşıyan taraklara yüzey sterilizasyonu (1 dk % 70'lik alkol, 7-10 dk %0.1'lik $HgCl_2$, 3 kez steril destile su ile yıkama) uygulanmış ve anterler farklı besi ortamları içeren kaplarda kallus indüksiyonu için karanlıkta kültüre alınmıştır. Kallus oluşumu, 30 günlük kültür süresinin sonunda görülmüştür. 1 ve 3 mg/l zeatin içeren besi ortamında anterlerde kallus oluşumu ortaya çıkmamış, 7 mg/l zeatin içeren ortamda ise oluşan kallus yavaş büyümüş ve daha sonra kahverengi bir renk alarak ölmüştür. Anterlerden kallus indüksiyon ve kallus gelişimi için en iyi besi 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 saptandığı bildirilmiştir. Yüksek konsantrasyonlu büyüme düzenleyicilerinin mikrospor bölünmesi ve kallus üretimi için avantajlı olduğu, kallusun yaşama şansı ve çoğalmasının büyüme düzenleyicisi çeşidi ve konsantrasyonlarından etkilendiği ve kültür süresinin uzamasının kallus indüksiyon oranını artırdığı sonucuna varılmıştır. Anterlerin kültüre alınmasından 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 birincisinden daha hızlı gelişen ve yüksek yaşama şansına sahip olan kallus olmak üzere iki farklı kallus tipi ayırt edilmiştir. İkinci tip kallusun embriyogenik olduğu ve uygun besi ortamında embriyo üretebildiği bildirilmiştir. Üretilen embriyolar, MS inorganik 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 haploid bitkiler olduğunu göstermiştir. İnce, zayıf yapılı olan bu bitkiler kısa sürede ölmüştür.

Mavromatis ve ark. (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 besi ortamının [(B5 + 0.1mg/l 2.4-D + 1mg/l kinetin+ 0.5mg/l GA3 ve MS + 0.2 mg/l NAA + 0.5 mg/l BA] üç farklı tipinde (sıvı, katı ve çift katlı) kültüre almışlardır. Tüm kültürler, 28 °C'de karanlıkta inkübe edilmiştir. Sonuç olarak kallus üretiminin genotiplere bağlı olduğu, türlerarası F1 melezlerinden elde edilen anterlerin daha iyi gelişen kırılgan kalluslar ürettikleri ve bu tip kallusun fazla sayıda haploid çekirdek içeren hücrelere (%60-72) sahip kallus olduğu saptanmıştır. Aynı zamanda kallus gelişiminin, katı besi ortamında sıvı besi ortamına göre daha iyi olduğu, kallus oluşturma oranının % 4 – 72.9 arasında değiştiği saptanmıştır. Diğer taraftan, Coker 310 ve Acala-Sindos çeşitlerinin anterleri 0.1mg/l 2,4-D, 1mg / l kinetin ve 0.5mg/l GA3 eklenmiş katı B5 besi ortamında kültüre alındıklarında embriyoidler gözlenmiş, ancak bu embriyoidler daha fazla gelişememişler ve bitkiye dönüşememişlerdir.

Zhang ve ark. (1998a), pamukta anter kültürü yoluyla bitki rejenerasyonu amacıyla *Gossypium* cinsinin kültür ve yabani 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. klothzschianum* Anderss'ten embriyo ve rejeneratif bitkiler elde etmişlerdir. Araştırmada, *G. klotzschianum* Anderss anterlerinden, 2, 4-D 0.1 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l kinetin içeren MS besi ortamında direkt olarak embriyogenik kallus oluşmuş, *G. hirsutum* anterlerinden ise sakkaroz içermeyen besi ortamında embriyogenik kallus elde edilmiştir. Çalışmada pamuk anter kültüründe hem haploid, hem de diploid hücrelerin oluştuğu, haploid hücre oranının % 10 alarak belirlendiği ve rejeneratif bitkilerin bazılarının haploid bitkiler olduğu bildirilmiştir. Pamuk anter kültürlerinden embriyogenik kallus ve haploid bitki elde edilmesinde, genotipin çok önemli etkiye sahip olduğu, alt kültür sayısının fazlalığının embriyogenik kallus oluşumunu olumsuz yönde etkilediği vurgulanmıştır. Ayrıca, pamuk anter kallusunda embriyogenesis indüksiyonuna etkilerini saptamak için incelenen çeşitli şeker kaynakları arasında farklılık bulunmuş, indüksiyonun en kolay amylum ile sağlandığı, bunu maltozun izlediği, sukroz, glukoz ve laktozun ise embriyogenesisi indükte etmek için etkisiz kaldıkları bildirilmiştir.

2.2. Organogenesis

Bajaj ve Gill (1986) tarafından yürütülen çalışmada, *G. arboreum, G. hirsutum* ve üç türlerarası melez *G. arboreum* x *G. anomalum*, *G. arboreum* x *G. stoksii* ve *G. herbaceum* x *G. stoksii* 'nin sürgün uçları (1 cm) ve meristemleri (1 mm) IAA, NAA, kinetin ve BA'nın farklı kombinasyonlarını içeren MS besi ortamında kültüre alınmışlardır. MS + 0.5 mg/l IAA+ 1-2 mg/l kinetin ortamında kültüre alınan meristemler yavaş gelişip kallus oluştururlarken, kültürdeki sürgün uçlarında 4-5 gün sonra yapraklar açılmış, 10-14 gün sonra bu yapraklar solmuşlar ve kahverengine dönüşmüşlerdir. Yeni yan sürgün çıkışları, sürgün oluşumu genotiplere göre değişmek üzere 20-30 gün içinde olmuştur. IAA kinetin ile kombinasyon halinde kullanıldığında 2 mg/l kinetin düzeyinde en iyi tepki elde edilmiştir. Kinetin konsantrasyonunda artış ile sürgünlerin büyümesi yavaşlamış ve yan sürgünler oluşmuştur. Bununla birlikte sürgünler yüksek konsantrasyonlardaki (4-6 mg/l) kinetine uzun süre maruz kaldıklarında, yapraklarda şişme ve şekil bozukluğu ortaya çıkmış, sürgünler ölmüştür. *İn vitro* koşullarda büyüyen sürgünler 2 mg/l IAA içeren besi ortamına aktarıldıklarında 4 hafta içinde kök oluşturmuşlardır. Elde edilen bitkiler toprağa transfer edilene kadar daha fazla gelişmişlerdir.Türlerarası melezlerin sürgünleri, MS + 1 mg/l kinetin ortamında en iyi tepkiyi vermişlerdir. Farklı melezlerde başarı oranı, % 41.6 - % 72.7 olmuştur. *G.arboreum* x *G anomalum* melezi en iyi tepkiyi vermiş ve bu melez aynı zamanda tarla koşullarında da en iyi büyüme göstermiştir.

Wu ve She (1990), kültür ve yabani *Gossypium* türleri ve bazı uzak akraba melezleri içeren 40 farklı genotipin sürgün uçlarını ve yan sürgün gözlerini *in vitro* kültüre almışlardır. 0.1 mg/l zeatin + 0.02 mg/l IBA + 1.9 g/l KNO_3 + 30 gr/l sukroz içeren MS besi ortamında bitki indüksiyon oranının %87.5 olduğunu belirtmişlerdir. Köklenme ve bitki yaşama şansının önemine dikkat çekmişler ve bitki rejenerasyonunun genotiplere bağlı olduğunu bildirmişlerdir.

Gould ve ark. (1991), bazı *G. hirsutum* L. ve *G. barbadense* L. çeşitlerinde sürdürdükleri araştırmalarında, delinte edildikten sonra yüzey sterilizasyonu [%20 hipo + Tw 20 (15 dak) ve steril destile su ile yıkama (3 kez)] uygulanan tohumları,

10 gr/l agar ile katılaştırılmış MS ortamında çimlendirerek, 3 ve 5 günlük fidelerden izole ettikleri sürgün uçlarını farklı konsantrasyonlarda büyüme düzenleyicileri (IAA ve Kinetin) ve farklı karbon kaynağı içeren MS ortamlarında kültüre almışlardır. Araştırıcılar, kontamine olmayan fidelerin oranının tohum örneğine ve genotiplere göre farklılık gösterdiğini ve ilk kültür aşamasında kaybedilen dokuların çoğunluğunun tohumdan kaynaklanan kontaminasyona bağlı olabileceğini bildirmişlerdir. 3 ve 5 günlük fidelerden izole edilen sürgün uçları, kültürün ilk iki haftasında test edilen tüm ortamlarda çok iyi büyüme göstermişlerdir. Ortamların etkisi, kültürün 3. ve 4. haftalarında ortaya çıkmıştır. Sürgün uçlarının normal büyümesi için IAA içermeyen veya 0.01 mg/l IAA içeren ortamın yeterli olduğu, ortamda 0.5 mg/l veya daha yüksek konsantrasyonda IAA bulunmasının yaprak uzamasını teşvik ettiği ve aynı zamanda kallus oluşumuna neden olduğu saptanmıştır. 0-0.5 mg/l kinetinin sürgün uçlarının normal büyümesi için yeterli olduğu, 1 mg/l veya daha yüksek konsantrasyondaki kinetinin bazı genotiplerde doku kararmasına neden olduğu ortaya çıkmıştır. Araştırıcılar, kinetinin genellikle yaprak gelişmesini teşvik ettiğini, sürgün gelişmesini ise engellediğini bildirmektedirler. En iyi kültür başlangıç ortamının alt kültür için de en iyi ortam olduğu ortaya çıkmış, alt kültür ortamında bulunan 0.01-0.1 mg/l kinetinin, sürgün gelişimine zararlı etkisinin olmadığı saptanmıştır. Araştırıcılar, test edilen genotiplerin her birisi için en etkin ortamın, farklılık gösterdiğini; ancak 100 mg/l inositol+ 0.1 mg/l thiamin ve 20 gr/l sakaroz veya glukoz içeren, büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamının, tüm genotiplerde çok iyi sonuç verdiğini; dokular bu ortamda 2 hafta ara ile alt kültüre alındığında 5-6 hafta içerisinde 4 yapraklı sürgünlerin oluştuğunu bildirmektedirler. Çalışma sonucunda, 3-5 günlük fidelerden izole edilen sürgün uçlarının kültürü için en iyi sonuçları veren protokolün, sürgün uçlarının bir hafta süre ile 0.1 mg/l kinetin içeren MS ortamında kültür edilmesi, daha sonra kültürlerin büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamına aktarılması ve bu ortamda 1-2 hafta bırakılması ve bu süre sonunda % 0.3 aktif karbon içeren MS ortamına aktarma ve bu ortamda kökler oluşuncaya kadar 2-3 hafta kültür etme olduğu sonucuna varılmıştır. Araştırıcılar, denedikleri bir çok büyüme düzenleyicisi kombinasyonunun, *in vitro* kök oluşturmada başarısız olduğunu ve köklenme açısından en başarılı sonucun aktif

karbon içeren, büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamında elde edildiğini bildirmişlerdir.

Dani ve ark. (1993), çalışmalarının ilk bölümünde 4 *Gossypium* türünün 1-2 ve 4-5 yapraklı gelişme aşamasındaki fidelerinin uç ve yan meristem dokularını, poly (vinyl pyruvat) (10 mg /l) içeren hormonsuz besi ortamında kültüre almışlardır. Sürgün oluşumunun iki hafta sonra gözlendiğini ve *G. hirsutum* ve *G. barbadense* 'nin 25 gün içinde rhizogenesis gösterdiklerini saptamışlardır. Köklenme oranının 1-2 yapraklı fidelerden alınan eksplantlarda % 60-80; 3-4 yapraklı fidelerden alınan eksplantlarda % 6-25 olduğunu belirtmişlerdir. *G. hirsutum* 'un taban kısmından kesilerek alınan sürgün uçlarının anormal gelişme semptomları gösterdiklerini ve zayıf rejeneratif tepki verdiklerini belirtmişlerdir.

Mandeswar (1995), 6 adet *G. hirsutum* türü çeşidinin farklı yaşlardaki fidelerinden izole ettiği sürgün uçlarını, farklı kombinasyonlarda IAA, Kin, 2.4-D ve BAP eklenmiş, meso inositol (100 mg/l) + thiamine (0.4 mg/l) + glukoz veya sukroz (%3) içeren MS besi ortamlarında kültüre almıştır. Rejenerasyon yeteneğinin çeşitlere göre ve eksplantların alındığı fidelerin yaşına bağlı olarak, önemli düzeyde farklı olduğunu saptamıştır. En iyi rejenerasyon oranını, Coker 417-68 çeşidinin 14 günlük sürgün ucu eksplantlarını 2 mg/l IAA + 1 mg/l kinetin içeren besi ortamında kültüre aldığında elde ettiğini bildirmiştir.

Carvalho ve ark. (1997), karbon kaynağı, katılaştırıcı madde ve eksplant tipinin *in vitro* bitki rejenerasyonu üzerindeki etkilerini inceledikleri çalışmalarında, *in vitro* bitkiciklerden elde edilen apikal gözler ve yan gözleri, şeker kaynağı olarak sukroz veya glukozun kullanıldığı ve agar veya Gelrite ile katılaştırılmış besi ortamlarında kültüre almışlar, sürgün ve kök gelişimi açısından genel olarak en iyi sonuçların, apikal gözler, glukoz ve Gelrite kullanıldığında elde edildiğini bildirmişlerdir.

Gupta ve ark. (1997), bazı Hindistan pamuk çeşitlerinin *in vitro* rejenerasyonu ve sürgün çoğalması üzerinde yürüttükleri çalışmalarında, eksplant olarak *in vitro* koşullarda çimlendirilmiş bitkiciklerden elde ettikleri, (1) her iki kotiledonu birlikte, (2) tek kotiledonlu, (3) kotiledonsuz olmak üzere 0,5 cm hipokotil parçası taşıyan sürgün uçlarını kullanmışlar, bu üç tip eksplantı farklı

konsantrasyonlarda BA, kinetin ve 2iP eklenmiş; MS tuzları, 0.5 mg/l pyridoksin-HCl, 10 mg/l thiamine-HCl, 0.5 mg/l nicotinic acid, 2.0 mg/l glycine, 100 mg/l myo-inositol ve 30 g/l glukoz içeren modifiye edilmiş MS besi ortamında kültüre almışlar, oluşan sürgünleri NAA içeren köklenme ortamına, kalan bazal kütleleri ise parçalara ayırarak yeniden sürgün elde etmek amacıyla aynı besi ortamında iki kez alt kültüre almışlardır. Araştırıcılar, tek kotiledonlu 0.5 cm hipokotil parçası içeren sürgün uçlarının en iyi eksplant, 22.2 µM BA içeren besi ortamının sürgün oluşumunda en etkin ortam, köklenmeyi sağlayacak en uygun büyüme düzenleyicisinin 2.7 µM NAA olduğunu saptamışlardır. Ayrıca, üzerinde çalışılan 8 adet *G. hirsutum* L.ve 2 adet *G. arboreum* L.çeşidi içinde *G. hirsutum* L. Khandwa-2'nin en yüksek sürgün sayısını ürettiğine dikkat çekerek, primer ve sekonder sürgün çoğalmasının genotiplere bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Aynı zamanda sürgün oluşumunun herhangi bir kallus oluşumu aşaması olmaksızın direkt olarak ortaya çıktığını belirtmişlerdir. Araştırıcılar, besi ortamında NAA bulunmadığında kök oluşumunun baskı altında kaldığını gözlemişler ve Khandwa-2 çeşidinden NAA (2.7 µM) içeren besi ortamında elde ettikleri köklenmiş bitkileri ototrofik büyüme için Hoaglands solusyonuna aktarmışlar, aynı inkübasyon koşulları altında ilk iki hafta polietilen torbalar ile kapatarak bitkiciklerin dış ortama adaptasyonunu sağlamışlar, daha sonra saksılara geçirmişler ve bu protokolun izlenmesi ile bitkilerin % 90'ının olgunluğa ulaşarak normal olarak çiçeklendiklerini ve fertil olduklarını saptamışlardır.

Agrawal ve ark. (1997), Hindistan pamuk çeşidi Angali-LRK 516 ile sürdürdükleri çalışmada, delinte edilmiş ve yüzey sterilizasyonu uygulanmış tohumların petri kaplarında nemlendirilmiş steril filtre kağıdı üzerinde (% 80-90 çimlenme), büyüme düzenleyicisi içermeyen agarlı MS basal besi ortamı içeren test tüplerine (%25-30 çimlenme) inokule edilenlere göre daha iyi çimlendiklerini saptamışlardır. 48-72 saat sonra çimlenen tohumları büyüme düzenleyicisi içermeyen agarlı MS basal ortamı içeren polipropilen kapaklı cam şişelere (70 x125mm) veya pamuk ile kapatılmış kültür tüplerine (25 x 150 mm) aktararak *in vitro* koşullarda inkübe edildiklerini (5-35 gün boyunca) ve cam şişelerde fide gelişmesinin daha iyi olduğunu; 5-20-35 günlük fidelerden alınan apikal meristem ve kotiledonları

uzaklaştırılmış kotiledon nodlarının, BAP, kinetin ve her ikisinin farklı kombinasyonlarını içeren MS basal ortamlarına aktardıklarını, çoğalan sürgünlerin daha sonra uzayabilmeleri için katı veya sıvı büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besi ortamına ve daha sonra köklenme ortamına geçirildiklerini bildirmişlerdir. Araştırıcılar, maksimum sürgün sayısının 35 günlük fidelerden alınan eksplantların 2.5 mg/l BAP + 2.5 mg/l kinetin eklenmiş MS basal besi ortamında kültüre alınması ile elde edildiğini; sürgün uzamasının büyüme düzenleyicisi içermeyen özellikle sıvı MS besi ortamında daha iyi olduğunu, köklenmenin ise 0.05 - 0.1 mg/l NAA içeren ½ MS basal besi ortamında sağlandığını ve dış ortama adaptasyon için seraya aktarılan bitkilerin yaşama şansının % 95 olarak saptandığını bildirmişlerdir. Bitkiler saksıya aktarıldıktan 4 ay sonra tamamında koza oluşumu gözlenmiştir.

Djataev ve ark. (1998), pamuk apikal meristemlerinden bitki rejenerasyonu ve transformasyonu üzerinde yürüttükleri araştırmada, S 6524, S 4880 ve Gulbakhor pamuk çeşitlerinin 7 günlük steril bitkiciklerinden çıkarılan apikal meristemleri, farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarda büyüme düzenleyicisi (2,4 D, IAA, BAP, kinetin) içeren agar ile katılaştırılmış MS ortamlarında kültüre almışlar ve en uygun besi ortamının, kinetin veya BAP ile birlikte NAA (5mg/l) içeren ortam olduğunu, kültür süresinin uzaması ile sürgünlerde kök oluşumunun başladığını saptamışlardır.

Hemphill ve ark. (1998), farklı BA konsantrasyonlarının farklı eksplantlardan sürgün oluşumuna etkisini incelemişler ve 28 günlük fidelerden izole edilen meristem, sekonder yaprak nodu, primer yaprak nodu ve kotiledon nodlarının sürgün oluşturma yeteneklerinin besi ortamındaki BA konsantrasyonuna bağlı olarak değiştiğini, farklı genotiplerden alınan meristemlerin 0.3 µM BA içeren ortamda sürgün oluşturduklarını saptamışlardır. Araştırıcılar, oluşan sürgünlerin belirli bir süre aktif karbon içeren MS ortamında kültür edildikten sonra, dip kısımları kök oluşumunu teşvik edici hormonlar ve fungisit içeren ticari bir bileşik olan Rootone ile muamele edildikten sonra toprağa aktarıldıklarında normal büyüme ve gelişme göstererek olgun bitkileri oluşturduklarını bildirmişlerdir.

Momtaz (1998), Mısır pamuk çeşitleri ile sürdürdüğü bir araştırmada; *in vitro* koşullarda elde edilen fidelerden izole edilen sürgün uçlarını 100 mg/l myo-inositol +1 mg/l thiamin-HCl + % 2 glukoz + B5 vitaminleri +100 mg/l sitrik asit +100 mg/l

askorbik asit +0.1 mg/l kinetin + farklı konsantrasyonlarda BA ve TDZ içeren % 0.2 fitogel ile katılaştırılmış MS ortamında kültüre almıştır. Araştırıcı, sürgün uçlarından sürgün oluşum etkinliğinin genotiplere bağlı olarak önemli farklılık gösterdiğini, sürgün oluşturan eksplant oranının genotiplere bağlı olarak % 40 - % 65 arasında değiştiğini, reaksiyon gösteren eksplant başına sügün sayısının 2 ile 15 arasında değiştiğini, oluşan sürgünlerin % 80'inin köklendiğini bildirmiştir.

McNaughton ve Rey (1998), yaygın olarak yetiştirilen Afrika pamuk çeşitleri için etkin bir rejenerasyon ve transformasyon sistemi geliştirmek amacıyla yürüttükleri bir çalışmada, başarılı olduğunu belirttikleri rejenerasyon protokolüne göre; MS vitaminleri+% 2 sukroz+ % 0.7 agar + 0.1 mg/l kinetin içeren MS ortamında kültüre alınan sürgün uçlarında 2 hafta sonra yeşil sürgün oluşumu görülmüş ve 2 ay sonra köklü bitkicikler elde edilmiştir.

Morre ve ark. (1998), pamuk bitkisinin emriyo ekseninden sürgün indüksiyonu ve bitki rejenerasyonu üzerinde yaptıkları çalışmada, eksplant olarak kullanılan embriyo eksenlerinin 3 mg/l BA içeren besi ortamında kültüre alındıklarında ortalama 3,4 sürgün elde edildiğini; bu konsantrasyonun altında ve üstünde BA içeren besi ortamlarında çok az sayıda sürgün oluştuğunu; ayrıca BA'nın çoklu sürgün oluşumu ve daha sonraki sürgün gelişimi açısından pamukta embriyogenik apikal meristem ekseninin yeniden programlamasından direkt olarak sorumlu olduğunu öne sürmüşlerdir.

Luo ve ark. (1999), pamukta patojenlere dayanıklılığı sağlamak amacıyla yürüttükleri çalışmada, çimlendirilmiş fidelerden izole edilen sürgünlere *Agrobacterium* yoluyla osmotin ve chitinase antifungal genlerini tansforme etmişler ve bitki rejenerasyonunu, inokule edilmiş sürgünlerden direkt olarak sağlamışlardır. Seleksiyon sonrası sürgünlerin kendiliğinden köklendikleri (% 25) ya da bir anaç fide üzerine aşılandıklarını, rejenere olan bitkilerin (R_0) çiçek açtıklarını ve transfer edilen genleri taşıyan dölleri (R_1) ürettiklerini bildirmişlerdir.

Luo ve Gould (1999), *in vitro* kültürde pamuk sürgünlerinden tam bitki oluşumunu artırmak için hızlı bir sürgün ucu aşılama tekniği geliştirmişlerdir. Araştırıcılar, pamukta *in vitro* kök oluşumunun genotipe bağımlı olduğunu ve köklenme sağlanamaması nedeniyle rejenerasyon potansiyelindeki kayıpların

genotiplere bağlı olarak % 30-80 arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Araştırmada, *in vitro* olarak elde edilen sürgünlerin anaç fidelere *in vitro* koşullarda aşılanması ile %90-100 oranında tam teşekküllü bitkicikler elde edilmiş ve metodun başarısının direkt olarak aşı materyalinin (0.8 – 1.0 cm) ve anaç fidenin yaşına (14-35 günlük) bağlı olduğu sonucuna varılmıştır. Aynı zamanda bu metodun genotipten bağımsız göründüğü, anaçlar ve aşı materyalleri arasındaki genotipik farklılıkların kültürde bitki oluşum oranını etkilemediği bildirilmiştir.

Zapata ve ark. (1999) tarafından Tamcot Sphinx, elit hat MAR-CUBQHRPIS ve Coker 312 pamuk çeşitlerinde yürütülen çalışmada, 3-4 günlük fidelerden izole edilen pamuk sürgün uçları 0, 0.1 ve 1 mg /l NAA ile BA kombinasyonlarını içeren tam veya 1/2 yoğunluktaki 18 farklı MS besi ortamında kültüre alınmıştır. Araştırcılar, pamuk tohumlarının dezenfeksiyonunun iç enfeksiyon nedeniyle zor olduğunu, çeşide ve farklı yıllardan elde edilen ürüne göre dezenfeksiyon etkinliğinin farklılık gösterdiğini, 45 dakika süre ile konsantre sülfirik asit ile muamele + sabunlu su ile çalkalama sonrası Tween 20 içeren %50'lik Clorox solusyonu ile muamele+ bidestile su ile en az 3 kez çalkalama yönteminin en iyi dezenfeksiyon yöntemi olarak saptandığını bildirmişlerdir. Araştırmada pamuk sürgün uçlarından sürgün rejenerasyonu için 6 haftaya gereksinim duyulmuş, rejenerasyon yüzdesi açısından çeşitler arasında önemli bir fark ortaya çıkmamıştır. Ayrıca 18 besi ortamı içinde en yüksek rejenerasyon yüzdesinin hormon içermeyen tam yoğunluklu MS tuzları ve vitaminlerden oluşan ortamda elde edildiği, söz konusu ortamda bitkilerin kültür başlangıcından 2-3 hafta sonra kök oluşturmaya başladıkları bildirilmiştir. Sürgün ucu çevresinde, çoğunlukla yumuşak yapılı ve kırmızımsı renkli kallus oluşumu ortaya çıkmıştır. Kallus üretiminin genel olarak fenolik bileşiklerin üretimi ile birlikte ortaya çıktığı ve besi ortamında BA konsantrasyonu arttıkça kallus oluşumunun fark edilebilir hale geldiğine dikkat çekilmiştir. Ortalama olarak pamuk sürgün uçlarının % 58'inin sürgün oluşturduğu ve vitamin içeren tam yoğunluktaki MS besi ortamında 6 hafta içinde köklendikleri, rejenere olan bitkilerin tamamının fenotipik olarak normal görünüşlü oldukları ve tohum oluşturdukları bildirilmiştir. Sürgün ucu ile rejenerasyonun, çeşitlere bağımlı olmaması, hızlı, basit olması ve bu

yöntemde doku kaynaklı genetik varyasyon riskinin düşük olması nedeniyle transformasyon çalışmalarında kullanılabilirliğine dikkat çekilmiştir.

Bajrovic ve ark. (2001), Nazilli M-503 ve Sel-5 pamuk klonları ile sürdürdükleri araştırmada; farklı eksplantları (yaprak, petiol, internod, nod, hipokotil ve sürgün ucu) farklı büyüme düzenleyicilerinin eklendiği MS besi ortamlarında kültüre almışlar ve en yüksek sürgün rejenerasyonunu 2 mg/l zeatin veya BAP ve 2 mg/l kinetin içeren MS ortamında kültüre alınan sürgün ucu ve nodlardan elde etmişlerdir. Araştırıcılar, kök oluşumunun 0.5 mg/l IBA eklenmiş MS besi ortamında sağlandığını bildirmişlerdir. Tarladan elde edilen pamuk tohumlarının bakteri ve fungus sporlarını tutan havlı yapıları nedeniyle yüksek düzeyde kirli olduklarını ve sterilizasyon öncesi % 96'lık H_2SO_4 uygulamasının hem delintasyon, hem de sterilizasyon için etkin olduğunu vurgulamışlardır. Aynı zamanda araştırıcılar sürgün rejenerasyonunun çoğunlukla BAP ve zeatin'in yüksek konsantrasyonlarında baskı altında kaldığını ve sürgün uçlarının çevresinde çoğunlukla yumuşak ve kırmızı renkli kallus oluşumu gözlendiğini bildirmişlerdir.

Satyavathi ve ark. (2002), üç Hindistan pamuk çeşidinde sürdürdükleri araştırmada; sürgün uçlarını farklı büyüme düzenleyicisi kombinasyonlarını içeren MS ortamlarında kültüre almışlar ve 0.1 mg/l BAP ve NAA içeren ortamda sürgün uçlarından organogenesis yoluyla etkin bir rejenerasyonun gerçekleştiğini saptamışlardır. Sürgün çoğalması ve uzaması GA3 eklenmiş besi ortamında 3-4 haftada başarılmıştır.

2.3. Somatik Embriyogenesis

Davidonis ve Hamilton (1983), Coker 310 pamuk çeşidinin kalluslarından bitki rejenerasyonu konulu çalışmalarında, eksplant olarak filtre kağıdı üzerinde çimlendirdikleri fidelerden elde ettikleri kotiledonları ve temel besi ortamı olarak ise LS (Linsmaier ve Skoog, 1965) + 8.5 g/l agar + 30 g/l glukoz kullanmışlardır. Araştırıcıların ilk kültür aşaması için 2 mg/ NAA + 1 mg/l kinetin içeren besi ortamında kültüre aldıkları kotiledonlardan 3 ay sonra yavaş büyüyen, kırılgan, gri renkli kallus oluşmuştur. Yavaş büyüyen kallus, 1 mg/l NAA + 0.5 mg/l kinetin

içeren besi ortamında 6-7 haftada bir alt kültüre alınmış ve (1) granüler açık bej renkli kallus, (2) hızlı büyüyen yeşil kallus, (3) gri kallus olmak üzere üç tip kallus elde edilmiş; tüm kalluslarda az miktarlarda proembriyoid oluşumu gözlenmiş ve (1) nolu kallusun kültürüne devam edilmiştir. 2 yıllık pamuk kallusları, büyüme düzenleyicisi içermeyen, 30 g glukoz ilave edilmiş LS besi ortamında 13 hafta büyütüldükten sonra, NAA ve kinetin içeren ve içermeyen modifiye LS besi ortamlarına aktarılmışlardır. Sonuç olarak çalışmada, proembriyoid oluşturan kallusların yüzdesinin, NAA ve Kin içermeyen besi ortamında % 30' a kadar arttığı saptanmıştır. Proembriyoidlerin gelişmesinin, NH_4NO_3 içermeyen ancak standart KNO_3 konsantrasyonunun iki katını ve gibberellic acid (GA) içeren besi ortamlarında kültürü ile arttığı ve kök oluşumu ve büyümesinin glukoz konsantrasyonu 5 g/l'ye azaltıldığında iyileştiği gözlenmiştir. Proembriyoidlerde başlangıçtaki yaprak benzeri yapıların gelişmesinden sonra daha normal yapraklar ortaya çıkmış, 4 adet normal görünümlü yaprak oluşumundan sonra bitkiler vermikulite içeren saksılara geçirilmiş ve haftada bir kez ¼ yoğunluktaki LS tuzlarıyla sulanmıştır. 4-6 hafta sonra toprağa aktarılan bitkilerin seraya geçirildikten sonra da normal görünümlü bitkiler olarak gelişimlerini sürdürdükleri belirtilmiştir.

Finer ve ark. (1983), pamukta somatik embriyogenesisin stimulasyonu üzerinde yaptıkları çalışmada, süspansiyon kültürleri için somatik embriyoid oluşturan kalluslar kullanıldığında ve 2,4-D konsantrasyonu 0.1 mg /l'den 1 mg/l'ye yükseltildiğinde embriyoid üretiminin arttığını belirtmişlerdir. Aynı zamanda bu modifikasyonların, 2 g kallustan elde edilen ortalama embriyoid sayısını (2.7 adet) 1000'den daha fazla sayıya kadar artırdığını bildirmişlerdir.

Shoemaker ve ark. (1986) tarafından yürütülen pamukta somatik embriyogenesisin karakterizasyonu ve bitki rejenerasyonu konulu çalışmada; eksplant olarak 17 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşidinin 10-14 günlük *in vitro* fidelerinden elde edilen hipokotil parçaları kullanılmıştır. Denemede 3 kallus indüksiyon ortamı [1) MS tuzları + 1.0 mg/l NAA + 1.0 mg/l kinetin + 10 mgl adenin + agar (%0.6), pH 5.8 ; 2) MS tuzları + 2 mg/l IAA + 1 mg/l kinetin + agar (%0.6), pH 5.8 ve 3) LS tuzları + 2 mg/l NAA + 1 mg/l kinetin + agar (%0.85), pH 5.7] ve 3 kallus alt kültür ortamı [1) MS tuzları + 1 mg/l NAA + 1mg/l 2iP ; 2) MS tuzları +

2 mg/l NAA + 0.5 mg/l kinetin + 10 µM glutamin; 3) LS tuzları (NH_4NO_3 çıkarılmış ve KNO_3 (3.8 g/l) içeren) + 1 mg/l NAA + 0.5 mg/l kinetin kullanılmıştır. Alt kültür ortamlarında 30 günlük kültürden sonra, kalluslar MS tuzları + 2 mg/l NAA + 1 mg/l kinetin + glukoz (%3) + gelrite (%3) içeren besi ortamına (pH 5.8) aktarılmışlardır. % 3 glukoz içeren besi ortamına bir dizi transferlerden sonra kalluslar, % 3 sukroz içeren besi ortamına aktarılmıştır. Embriyolar çimlenmeleri için, oksin içermeyen ve MS tuzları + 1 mg/l kinetin + sukroz (%1.5) içeren besi ortamına geçirilmiştir. Kök ve yaprak içeren bitkiler, önce sukroz (%1.5) içeren hormonsuz ½ yoğunluktaki MS besi ortamına aktarılmışlardır. 1-2 hafta sonra steril vermikulite geçirilmişler, yüksek nem koşullarında alıştırılmışlar ve sonra seraya aktarılmışlardır. Sonuç olarak, incelenen 17 genotipte kallus oluşum ve çoğalma tepkisi farklılık göstermiş ve Coker 201 ve Coker 315 genotipleri embriyogenik olarak tanımlanmıştır. Aynı zamanda embriyogenik kallusun oluşumu hiçbir spesifik indüksiyon/alt kültür ortamı ile ilişkilendirilememiş, alt kültüre almanın embriyogenik kallus oluşumu için gerekli olmadığı saptanmış ve embriyogenik kalluslar 2 mg/l NAA + 1 mg/l kinetin + glukoz (%3) içeren MS besi ortamında direkt olarak indükte olmuşlar, daha sonra glukoz yerine sukroz (%3) içeren besi ortamında alt kültüre alındıklarında, çoğalmaya devam etmişler ve somatik embriyolar üretmişlerdir. Histolojik çalışmalar, embriyoların yoğun sitoplazma içeren hücrelerden oluştuğunu göstermiştir. Olgunlaşma sırasında embriyoların düşük sukroz içeren oksinsiz besi ortamına aktarılmaları embriyo çimlenmesi ile sonuçlanmıştır. Rejenere olan bitkiler kallus oluşumundan itibaren 90 gün içinde seraya aktarılmışlardır.

Firoozabady ve ark. (1987), Coker 201 çeşidinde sürdürdükleri araştırmalarında; 12 günlük *in vitro* fidelerden alınan kotiledon parçaları, kanamycine dayanıklılığı kodlayan bir kimerik gen içeren avirulent Ti plasmidlerini taşıyan *Agrobacterium tumefaciens* hatları ile inokule edilmiş ve önce yalnız kanamycin içeren, 3 gün sonra ise carbenicilin ve kanamycin içeren G2 kallus indüksiyon ortamında (MS tuzları + myo-inositol (100mg) + thiamine HCl (0.4 mg/l) + 2iP (5 mg/l) + NAA (0.1 mg/l) + glukoz (30g)) kültüre alınmışlardır. Dokular 25°C de 16 s fotoperyot koşullarında (90 $\mu Em^{-2}s^{-1}$) inkübe edilmiştir. 3-4 hafta sonra yaralı

bölümlerde oluşan kanamisine dayanıklı transforme olmuş mikro kalluslar orjinal eksplanttan çıkarılıp, kanamycine içeren yeni besi ortamına aktarılmış ve düşük ışık intensitesinde (10 $\mu Em^{-2}s^{-1}$) inkübe edilmiştir. 2-3 hafta sonra kalluslar kanamycin seleksiyon koşulları altında (25 mg/l) embriyogenik besi ortamına (hormon içermeyen G2) aktarılmıştır. Bu besi ortamında kallusların % 80'inden fazlası somatik embriyo üreten embriyogenik, kırılgan, krem rengi granular yapılı kalluslar haline gelmiştir. Somatik embriyolar boyut ve morfolojik olarak dikkate değer şekilde farklılık göstermiş ve bazıları diğerlerine göre daha hızlı olgunlaşmışlardır. Kotiledon, hipokotil ve köke ait yapılar içeren 5-10 mm uzunluğundaki somatik embriyolar, gibberellic acid (0.1 mg/l) + NAA (0.01 mg/l) + glukoz (%0.5) eklenerek modifiye edilmiş düşük iyon yoğunluklu bir besi ortamı olan GRMgn ortamına (Stewart ve Hsu, 1977) aktarılmış ve 30°C'de 16 s fotoperyot koşullarında (90 $\mu Em^{-2}s^{-1}$) çimlenme ve bitki oluşturma için inkübe edilmişlerdir. Olgunlaşmış somatik embriyoların yaklaşık olarak %30'u GRMgn besi ortamında çimlenmişler ve bitki oluşturmuşlardır. 3-5 yapraklı bitkiler ticari bir torf / perlit karışımına aktarılmış, 25°C gece, 30°C gündüz sıcaklığında 16 saat fotoperyot koşullarındaki (150 $\mu Em^{-2}s^{-1}$) büyütme odasında yetiştirilmiş, gerektiğinde sulama ve gübreleme yapılmıştır. Alıştırılan bitkiler toprak içeren saksılara aktarılmış ve serada yetiştirilmiştir. Sonuç olarak, çalışmada *Agrobacterium* ile enfeksiyondan transgenik bitkilerin toprağa aktarılmasına kadar tüm sürecin Coker 201 için 6-8 aylık bir süre gerektirdiği, rejenere olan bitkilerin fertil oldukları ve tohum oluşturdukları belirtilmiştir. Ayrıca hipokotilin kullanıldığı denemelerde, eksplantların kanamisin içeren besi ortamı ile tam temasının yetersizliği nedeniyle transforme olmamış kallusların çoğalabilecekleri ve büyük oranda kimerik olabileceklerine dikkat çekilerek, sadece seçici besi ortamı ile temas halinde olan yaralı kenarlarda kallus oluşması nedeniyle çalışmada transformasyon ve seleksiyon için eksplant olarak kotiledon parçalarının tercih edildiği, aynı zamanda sukrozun fenoliklerin üretimini artırması ve gelişmeyi geciktirmesi nedeniyle, karbon kaynağı olarak glukozun kullanıldığı bildirilmiştir.

Trolinder ve 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 rejimlerine 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 dokuları 2 farklı büyüme düzenleyicisi rejiminin [1) 0.1 mg/l 2,4-D + 0.1 mg/l kinetin; 2) 0.1 mg/l 2,4 D + 0.5 mg/l kinetin)] uygulandığı, myo-inositol (100 mg/l), B5 vitaminleri , 30 g/l glukoz, gelrite (1.6 g/l) ve $MgCl_2$ (0.75 g/l) içeren MS besi ortamında kültüre alınmıştır. Kültürler 28°C'de, 16 saat fotoperyot ve 60-90 $\mu Em^{-2}s^{-1}$ ışık koşullarında inkübe edilmişlerdir. 0.5 mg/l Kin içeren besi ortamında yüksek embriyogenik kallus oluşumu sağlanmakla birlikte, dokular kısa sürede kahverengine dönüşmüş ve kallus kırılganlığı 0.1 mg/l kinetin kullanıldığında elde edilen kallustakinden daha az olmuştur. Bu nedenle daha sonra somatik embriyogenesisin indüksiyonu için bir standart olarak 0.1 mg/l 2,4-D + 0.1 mg/l kinetin büyüme düzenleyicisi rejimi kullanılmıştır. Elde edilen embriyogenik kalluslar (kırılgan, açık gri yeşil) 4 hafta sonra hücre süspansiyon ortamına (büyüme düzenleyicileri ve katılaştırıcı madde dışında ilk kültür ortamı ile aynı içerikteki) aktarılmış, çalkalayıcı (120 rpm) üzerinde daha önce tanımlanan kültür koşullarında inkübe edilmişlerdir. 1 aylık kallus, transfer edildiğinde nadiren embriyo içerirken, 6 haftalık kallus çok sayıda globular embriyo içermiştir. Ayrıca, embriyogenik kalluslar sıvı kültüre aktarılmadan önce ilk kallus indüksiyon ortamında 1 yıla kadar alt kültüre alınarak ve hücre süspansiyon kültürleri ise her 3-6 haftada bir yeni sıvı kültüre geçirilerek sürdürülmüştür. Sıvı kültürde üç -dört hafta sonra, globular ve kalp dönemindeki embriyoları toplamak amacıyla süspansiyon süzgeçten geçirilmiştir. Toplanan embriyolar, yarı sıvı besi ortamında kültüre alınarak gelişmeleri sağlanmış, daha sonra KNO_3 (1.9 g/l), eklenmiş katı besi ortamında olgunlaşmışlardır. Olgun embriyolar, petriye aktarıldıktan sonra 4-6 hafta içinde elde edilmiştir. İlk petriye aktarımda yaklaşık 80 mg süspansiyon aktarılmış olan her bir petriden 24 ± 2.31 embriyo (≥ 3 mm boyutlarında) elde edilmiştir. Daha sonra çimlenmeyi ve bitki gelişimini indükte etmek amacıyla olgun embriyolar, IAA (0.1 mg/l) içeren 10 – 12

ml Stewart and Hsu's (1977) besi ortamı ile doyurulmuş steril vermiculite üzerine aktarılmıştır. Köklerin ve iki gerçek yaprağın gelişiminden sonra bitkiler, ¼ yoğunluğunda Hoagland (1936) solusyonu ile sulanmış, 1/1 oranında torf ve kum karışımı içeren 15 cm'lik plastik saksılara aktarılmıştır. Üzerlerine cam beher kapatılan bitkiler dış koşullara alıştırıldıktan sonra seraya geçirilmişlerdir. Sonuç olarak, dikkatli bir seleksiyonla ve alt kültür süresine dikkat edilerek, bazı kültürler 2 yıl boyunca embriyogenik kalabilmişlerdir. 3 mm ve daha büyük embriyolar çimlenme için vermikülite konduğunda, % 10.6'sı 3 aylık bir süre içinde çimlenmiş, kök sistemi geliştirmiş ve 2 veya daha fazla gerçek yaprak üretmiştir. 5 mm ve daha büyük embriyolar vermikülite aktarıldıklarında bitkiye dönüşüm %30'a yükselmiş ve bir yıldan fazla sürede 139 bitki rejenere olmuştur. Rejenere olan bitkilerin %60-80'i başarılı şekilde dış koşullara alıştırılmış ve sera koşullarında yetiştirilen bitkiler çiçeklenmişler, ancak sadece % 15.4'ü tohum oluşturmuştur.

Umbeck ve ark. (1987), pamukta genetik transformasyon konulu araştırmalarında; Coker 310, 312, ve 5110 pamuk (*G. hirsutum* L.) çeşitlerinin 4-6 günlük *in vitro* fidelerinden aldıkları hipokotil parçalarını (0.5 cm) % 0.8 agar içeren destek besi ortamına yerleştirmişler ve *Agrobacterium* ile inokule etmişlerdir. İnokulasyondan 3 gün sonra kallus eksplantlarını, bakteriyel çoğalmayı kontrol etmek için cefotaxime, carbenicillin ve transforme olmuş hücrelerin seleksiyonu ve çoğaltılması için kanamisin antibiyotiklerini içeren kallus indüksiyon ortamına [MS tuzları + B5 vitaminleri + 0.1 mg/l 2.4 D + 0.1 mg/l kinetin + gelrite (1.6 g/l) + $MgCl_2$ (750 mg/l)] aktarmışlar ve 4-6 haftada bir alt kültüre almışlardır. Transforme olmuş embriyogenik hücre hatlarını seleksiyon besi ortamında sürdürmüşler ve daha sonra hormon içermeyen rejenerasyon ortamına (MS tuzları + B5 vitaminleri) aktarmışlardır. Somatik embriyoları ($\geq$ 4 mm) IAA (0.1 mg/l) + kinetin (0.1 mg/l) + GA3 (0.1 mg/l) içeren Stewart ve Hsu besi ortamı ile doyurulmuş vermikulit içeren tüplere geçirmişlerdir. İki üç yapraklı aşamada bitkileri saksılara aktarmışlar, dış koşullara alıştırmışlar ve 4-6 yapraklı olduklarında yeni saksılara geçirmişler ve serada yetiştirmişlerdir. Araştırıcılar, somatik embriyoların eş zamanlı gelişmediklerini belirtmiş, bazı embriyoidlerin diğerlerine göre daha hızlı olgunlaştıklarını, daha iyi kotiledonlar ve kök oluşumu gösterdiklerini, daha yavaş

olgunlaşan embriyoidlerin ise gelişmenin globular, kalp veya torpedo aşamalarının tipik özelliklerini sergilediklerini bildirmişlerdir.

Finer (1988), Coker 310 pamuk çeşidinin kotiledonlarından elde ettiği kallusları, picloram (0.5 mg/l) veya 2.4-D (0.1 mg/l) içeren sıvı besi ortamlarında kültüre almış ve daha sonra embriyogenik süspansiyonun çoğaltılması için 2.4-D (5.0 mg/) kullanmıştır. Araştırıcı embriyogenik doku oksinsiz ve 15 µM Glutamine içeren sıvı besi ortamına aktarıldığında embriyoların geliştiğini belirtmiştir. Aynı zamanda erken embriyo gelişiminin oldukça eş zamanlı olarak ortaya çıktığını ve çok sayıda somatik embriyo üretildiğine dikkat çekmiştir. Sonuç olarak rejenere olan bitkilerin fertil olduklarını ve tohumla elde edilenlere göre daha küçük görünümlü olduklarını bildirmiştir.

Trolinder ve Goodin (1988a), pamukta eksplant kaynağı ve büyüme düzenleyicilerinin somatik embriyogenesis üzerindeki etkilerini inceledikleri çalışmalarında; Coker 312 pamuk çeşidinin olgunlaşmış [serada yetiştirilmiş bitkilerden ilk çiçeklenmeden önce alınan sap (4 mm uzunluğuna veya 2 mm dilimler halinde enine) ve yaprak (4 mm diskler) parçaları] ve olgunlaşmamış [3 günlük *in vitro* fidelerden alınan hipokotil (4 mm) parçaları ve olgun tohumlardan çıkarılan kotiledonsuz embriyolar] dokularından somatik embriyogenesisin indüksiyonu için optimal besi ortamlarını araştırmışlardır. Besi ortamı olarak; myo-inositol (100 mg/l), B5 vitaminleri (Gambourg, 1968), 30 g glukoz eklenmiş ve gelrite (1.6 g/l)+ $MgCl_2$ (0.75 g/l) ile katılaştırılmış olan MS besi ortamı kullanılmış, büyüme düzenleyicileri 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 incelenmiştir. Kültürler 28 °C'de, 16 saat fotoperyot ve 60 $\mu Em^{-2}s^{-1}$ ışık koşullarında inkübe edilmişlerdir. Çalışmada; üç günlük *in vitro* fidelerin hipokotillerinden elde edilen olgunlaşmamış eksplantlar 2,4-D (0.1 mg/l) + kinetin (0.5 mg/l) içeren besi ortamında kültüre alındıklarında, eksplantların % 100'ünde somatik embriyoların oluşabildiği; olgun dokuların olgunlaşmamış dokulara göre daha zayıf reaksiyon gösterdiği; aynı besi ortamına yaprak dokusu için 1.0 mg/l NAA + 0.5 mg/l 2iP, sap dokusu için ise 2.0 mg/l NAA + 0.1 mg/l kinetin eklendiğinde somatik embriyolar elde edildiği saptanmıştır.

Trolinder ve Goodin (1988b), Coker 312 pamuk çeşidinin üç günlük fidelerinin hipokotil parçalarını 2,4-D (0.1 mg/l) + kinetn (0.1 mg/l) eklenmiş , myo-inositol (100 mg/l), B5 vitaminleri, 30 g/l glukoz, gelrite (1.6 g/l) ve $MgCl_2$ (0.75 g/l) içeren MS besi ortamında kültüre almışlardır. Kültürler, 6 haftada bir alt kültüre alınmıştır. Elde edilen embriyogenik kalluslar sıvı besi ortamında kültüre alınmış; elde edilen globular embriyolar toplanıp yıkanarak, temel besi ortamında yeniden süspanse edilmiş, içerikleri farklı yarı katı besi ortamları üzerinde tekrar kültüre alınarak, yüksek inorganik tuz (MS), düşük tuz (2/3 MS), ek KNO_3, NAA, GA3 ve kinetinin somatik embriyo olgunlaşması üzerindeki etkileri incelenmiştir. Araştırıcılar, en iyi (uzun dönemli) embriyo çoğalması ve olgunlaşmasının 1.9 g/l KNO_3 içeren MS besi ortamında sağlandığını saptamışlardır. 3-10 mm boyutlarındaki embriyoları 0.1 mg/l IAA eklenmiş Stewart ve Hsu (1977) besi ortamı ile doyurulmuş steril vermiculite üzerine yerleştirdiklerinde, % 10.6 bitki oluşumu, 5 mm ve daha büyük embriyoları aynı koşullara kültüre aldıklarında % 30 bitki oluşumu gözlemişler, daha küçük embriyolar için ise 0.1 mg/l GA3 eklenmiş yeni besi ortamının eklenmesi gerektiğini belirtmişler; ayrıca köklenmiş bitkilerin uygun koşullarda dış ortama adaptasyonu sağlandığında, rejenerantların % 80'inin başarılı şekilde geliştiklerini bildirmişlerdir.

Zimmerman ve Robacker (1988), pamuk hipokotilleri ile sürdürdükleri araştırmada; gelrite ile katılaştırılmış besi ortamlarında, agar ile katılaştırılmışlara göre önemli düzeyde daha fazla kallus oluşumu gözlediklerini, incelenen farklı genotiplerde kallus oluşumu ve çoğalması açısından en iyi besi ortamının MS tuzları, LS organik maddeleri, 2,4-D (0.1 mg/l) ve BA (0.1 mg/l) içeren ve gelrite (2 g/l) ile katılaştırılmış besi ortamı olduğunu bildirmektedirler.

Li ve ark. (1989), 15 adet *G. hirsutum* çeşidinin hipokotil ve kotiledonlarını farklı büyüme düzenleyicilerinin eklendiği MS besi ortamlarında kültüre almışlardır. Araştırıcılar, kallusların 6-10 günde oluştuğunu, morfolojik özelliklerinin çeşitlere ve besi ortamlarında kullanılan büyüme düzenleyicilerine bağlı olduğunu belirtmişlerdir. Beyaz, yeşil ve beyaz yoğun kalluslardan embriyo elde edilemezken, 50-60 gün kültürde kalan gri veya yeşilimsi gri kırılgan kalluslardan embriyoların oluştuğunu saptamışlardır. En fazla sayıda embriyo oluşumunun kinetin (1.0 mg/l)

içeren besi ortamında gözlendiğini ve embriyoidlerin katı besi ortamında alt kültüre alındıklarında 7-10 günde çimlendiklerini bildirmişlerdir.

Trolinder ve Xhixian (1989), Coker 312 çeşidi için geliştirilmiş bir model protokolü kullanarak, 38 pamuk genotipini somatik embriyogenesis tepkisi yönünden incelemişlerdir ve pamuğun *in vitro* rejenerasyonunda genetik komponentlerin kültür komponentlerinden daha fazla öneme sahip olduğunu saptamışlardır.

Gawel ve Robacker (1990), pamukta petiol kallus kültürlerinde somatik embriyogenesisin genetik kontrolüne yönelik yürüttükleri araştırmada, 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 besi ortamında kültüre alarak embriyogenesis için değerlendirmişler ve 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. MS tuz ve vitaminleri, NAA (4 mg/l), kinetin (1 mg/l), glukoz (30 g/l), myo-inositol (100 mg/l), gelrite (2.0 g/l) ve $MgCl_2$ (0.75 g/l) içeren besi ortamında embriyogenesis için test etmişlerdir. Araştırıcılar, bu çalışmadan elde ettikleri verilere göre, pamukta somatik embriyogenesisin kalıtsal bir özellik gibi davrandığını ve multigenik bir özellik olduğu izlenimi verdiğini bildirmişlerdir.

Carvalho ve ark. (1992), CNPA Precoce-2 ve Coker 312 pamuk çeşitlerinin farklı besi ortamlarında somatik embriyogenesis açısından değerlendirilmesi amacıyla yürüttükleri araştırmada; her iki çeşitte de 2,4-D (0,1 mg/l) ve 2iP (0,5 mg/l) içeren MS besi ortamında kültüre alınan hipokotil parçalarından kallus oluştuğunu bildirmektedirler. Oluşan kalluslar 4 hafta sonra aynı kompozisyonda ancak sukroz yerine glukoz içeren besi ortamına ve diğer bir 4 hafta sonra ise içerikleri farklı besi ortamlarına aktarılmışlardır. Araştırıcılar, her iki çeşitin de kalluslarının glutamin içeren veya içermeyen MB5 besi ortamına aktarıldıklarında embriyogenik kalluslar ürettiklerini, diğer besi ortamlarında hiçbir somatik embriyoid oluşumu gözlenmediğini bildirmektedirler.

Wu ve ark. (1992), 152 uygulama ve genotip kombinasyonunda yer alan, farklı konsantrasyonlarda büyüme düzenleyicisinin eklendiği 11 besi ortamı ve 48 pamuk

genotipini doku kültürü özellikleri yönünden incelemişlerdir. Kallusların morfolojik özelliklerinin genotiplere göre farklılık gösterdiğini belirtmişlerdir. Araştırıcılar, aynı besi ortamında kültürel yeteneğin 23 genotipte iyi, 17 genotipte oldukça iyi ve 8 genotipte ise zayıf olduğunu saptamışlardır. Aynı zamanda hipokotillerden kallus indüksiyonu için optimum büyüme düzenleyicisi konsantrasyonunun Kin (0.1 – 0.5 mg/l), IAA (0.1 – 0.5 mg/l), 2.4-D (0.05 – 0.1 mg/l) ve NAA (0– 0.05 mg/l) olduğunu belirtirken, 6 genotipin kalluslarından bitki elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Firoozabady ve DeBoer (1993), Farklı pamuk genotiplerinde somatik embriyogenesis yoluyla bitki rejenerasyonu elde etmek amacıyla yürüttükleri çalışmada; eksplant kaynağı olarak *in vitro* fideler kullanmışlardır. Bu amaçla olgun ve olgunlaşmamış (tozlanmadan 40-60 gün sonra hasat edilen kozalardan alınan) tohumlar çimlendirilerek 7-10 günlük fidelerden, kotiledon parçaları (0.6 cm^2 yüzey alanına sahip) ve hipokotil parçaları (5-8 mm uzunluğunda); 21 günlük fidelerden ise, yaprak parçaları (0.6 cm^2 yüzey alanına sahip) MS tuzları + myo-inositol (100mg/l) + thiamine HCl (0.4 mg/l) + NAA (0.1 mg/l) + 2iP (5 mg/l) + glukoz (30g/l) içeren ortamda kültüre alınmıştır. Bu ortamda oluşan kalluslar genotiplere göre değişmek üzere 2-3 hafta veya 7-9 hafta sonra embriyogenik kallus indüksiyonu için NAA (5.0 mg/l) + 2iP (1.0 mg/l)] ve G3 [NAA (5.0 mg/l) + 2iP (0.1 mg/l) içeren ortama aktarılmışlardır. Bu besi ortamında 4-8 hafta sonra embriyogenik kallus oluşmuş ve olgun somatik embriyo oluşturmak amacıyla bu kallus 30 gr/l sukroz içeren MS veya 0.1 mg/l NAA+1 mg/l zeatin+ 15 gr/l sukroz içeren MS ortamına aktarılmışlardır. Somatik embriyolar, hormonlar ve şeker kaynağı açısından modifiye edilmiş Stewart ve Hsu (1977) ortamı olan GRMgn [NAA (0.01 mg/l) + GA3 (0.1 mg/l)] besi ortamında bitkiye dönüşmüşlerdir. 1-2 hafta sonra bitkiler daha fazla gelişmeleri için, ½ MS veya GRMgn besi ortamı içeren magenta kutularına aktarılmıştır. 5-10 yapraklı bitkiler toprağa aktarılmış ve yüksek nispi nem koşullarında iklimatize edilmiş, daha sonra normal sera koşullarına aktarılmıştır. Sonuç olarak, MS tuzları + myo-inositol (100mg/l) + thiamine HCl (0.4 mg/l) + NAA (0.1 mg/l) + 2iP (5 mg/l) + glukoz (30g/l) içeren/l besi ortamında çeşitlerin çoğunda maksimum miktarda kallus oluşumu sağlanmış, embriyogenik kallus indüksiyon ortamlarında ise incelenen bazı çeşitlerde büyük miktarlarda

embriyogenik kallus (orta – kırılgan, krem rengi, granular yapılı) elde edilmiştir.Bu kalluslar, globular ve kalp şeklinde proembriyoid yapılar içermiştir. Eksplant kaynağı olarak çimlendirilmiş olgunlaşmamış tohumun kullanılması tüm çeşitlerde embriyogenik kallus oluşumu ile sonuçlanmıştır.

Guo ve Yuan (1994), *in vitro* kültüre aldıkları 7 adet *G. hirsutum* çeşidinin kalluslarından, Coker 201, 312, Lumian 1024, Henan 79 ve Jihe 3016 çeşitlerinde bir alt kültürden sonra embriyogenik kallus elde etmişlerdir. Bazı embriyoların olgunlaşma besi ortamına aktarıldıktan 20 gün sonra çimlendiklerini ve çimlenmenin 50 - 55. günde en yüksek düzeye ulaştığını, bununla birlikte bazı embriyoların 70 güne kadar çimlenemediklerini belirtmişlerdir. SH besi ortamında 2 aylık kültürden sonra çimlenen embriyoların 5-10 yaprak oluşturduklarını bildirmişlerdir. Sonuç olarak araştırıcılar, IAA ve kinetin eklenmesiyle bitki sayısının azaldığına, ancak aktif karbonun eklenmesiyle arttığına dikkat çekmişlerdir. Aynı zamanda bitki rejenerasyonunun çeşitlere göre değiştiğini belirtmişler, bitkileri sıvı kültürde yetiştirmenin kök gelişimini iyileştirdiğini ve tarlaya aktarılan bitkilerin yaşama şansını % 100'e çıkardığını bildirmişlerdir.

Kalamani (1994), MDU 9 pamuk çeşidinin hipokotil eksplantlarını kinetin (1 mg/l) + IAA (1.5 mg/l) içeren besi ortamında kültüre almış ve kallusların 20 gün içinde oluştuğunu belirtmiştir. BA (2mg/l) içeren besi ortamında kültüre alındığında kalluslardan çoğalan sürgünler oluştuğunu bildirmiştir. Kök oluşumu ve gelişmenin sukroz konsantrasyonu düşürülerek ve NAA (3 mg/l) eklenerek iyileştirildiğini bildirmiştir.

Senechal ve ark. (1994), Upland pamuklarında somatik embriyogenesisin kalıtımını inceledikleri araştırmalarında; pamukta embriyogenik potansiyel için ıslahın mümkün olduğunu ve bunun donor ebeveyn olarak Coker 312 ile tekrarlanan geri melezleme, kendileme ve seleksiyon siklusu ile başarılabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca, geri melezlemeler sonucunda düşük frekanslı embriyogenik bitki elde edilmesi nedeniyle, böyle bir seleksiyon programının geri melez generasyonlarında geniş populasyonlar gerektireceğini vurgulamışlardır.

Wang ve ark. (1994), üç *Gossypium hirsutum* L. çeşidinin (Lu Mian 6, Lu Mian 1024 ve Ji Mian 14) hipokotillerinden embriyogenik kallus elde etmişlerdir. 2

yıl boyunca alt kültüre alınan kallusun açık yeşil ve gri renkli gevşek ve kırılgan olandan, gri veya yeşil renkli küme şeklinde nodüller oluşturmuş kompakt olana kadar değiştiğini belirtmişlerdir.

Rajasegar ve ark. (1996), pamukta (*Gossypium hirsutum* L.) farklı büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarını içeren MS besi ortamlarında kültüre alınan farklı eksplantlarda kallus indüksiyonu, somatik embriyoid oluşumu ve bitki rejenerasyonunu incelemişlerdir. Araştırıcılar, farklı eksplantlar arasında NAA (2.0 mg/l) ve 2iP (3.0 mg/l) içeren besi ortamında kültüre alınan yapraklardan maksimum kallus indüksiyonu elde etmişler ve bu kallusların 10 µM glutamine ile 2iP ve ABA (2.0 mg/l) içeren MS besi ortamında embriyoidler oluşturduklarını ve oluşan embriyoidlerin düşük frekansta da olsa bitkiye dönüştüklerini bildirmişlerdir.

Gonzales-Benito ve ark. (1997a), Precoce 2 pamuk çeşidini, embriyogenik çeşit Coker 312 ile kıyaslayarak somatik embriyogenesis yönünden incelemişlerdir. Araştırıcılar, kallus indüksiyonu ve çoğaltılması için üç farklı metodu ve hormonsuz indüksiyon ortamında glutaminin etkisini araştırmışlardır. Coker 312'nin tüm protokollerde ve embriyo indüksiyon ortamlarında pozitif tepkiler verdiğini, ancak Precoce 2 kalluslarının sadece metotların ikisinde kültüre alındığında embriyogenik hale geldiklerini ve kallusların ise embriyogenesisi indükte etmek için glutaminin kullanıldığı metotlardan birinde elde edildiğini bildirmişlerdir.

Gonzales-Benito ve ark. (1997b), CNPA Precoce 2 pamuk çeşidinin kotiledon ve hipokotil eksplantlarını 2.4-D ve 2iP'nin 5'er konsantrasyonlarını tek tek veya kombinasyon halinde içeren MS besi ortamlarında kültüre almışlardır. Elde ettikleri kallusun tipine göre, daha sonraki kallus gelişimi için 4 büyüme düzenleyicisi kombinasyonunu seçmişlerdir. 2iP (2.45µM) içeren besi ortamında kültüre aldıkları kallusları, önce 2iP (0.45µM) ve daha sonra 2.4-D (22.5µM) içeren besi ortamlarına aktarmışlardır. Hormonsuz ve glutamin (2 g/l) içeren MS besi ortamında farklı boyut ve şekillerde somatik embriyoların oluştuğunu gözlemişler ve bu embriyoidlerden bitkilerin oluştuğunu bildirmişlerdir.

Brar ve ark. (1998), farklı pamuk türlerinin (*Gossypium arboreum* L., *G. herbaceum* L., *G. hirsutum* L., *G. thurberi* L. ve *G. anomalum* L.) olgunlaşmamış embriyoları, hipokotilleri, kotiledonları, kökleri ve genç yapraklarından kallus elde etmişlerdir. Kallus oluşumu, çoğaltılması ve sürdürülmesi için en iyi besi ortamının; diploid türler için 2,4-D (0.1 mg/l) + kinetin (0.1 mg/l) içeren MS ve *G. hirsutum* için, NAA (5.0 mg/l)+ kinetin (0.1 mg/l) içeren MS besi ortamı olduğunu saptamışlardır. Ayrıca, kallus oluşumu için en uygun eksplantın olgunlaşmamış embriyolar ve hipokotil parçaları olduğunu bildirmektedirler. Araştırıcılar, 28°C sıcaklık ve 16 saat fotoperyotun kallus indüksiyonu, çoğalması ve sürdürülmesi için optimum koşullar olduğunu ortaya koymuşlardır.

Zhang ve ark. (1998b), pamukta sentetik tohum üretimi üzerinde yaptıkları çalışmada; inceledikleri pamuk somatik embriyolarında globular, kalp ve torpido ve kotiledon aşamalarını gözlemişler ve sadece geç torpido ve kotiledon dönemindeki somatik embriyoların bitkiye dönüştüğünü saptamışlardır. Ayrıca, sentetik tohum üretimi için; normal olgun kotiledon embriyolarının ve kapsül yapma maddesi olarak % 2'lik Na-alginate'in kullanılması gerektiğini, bu şekilde hazırlanan sentetik pamuk tohumlarının çimlenme kapasitesinin steril koşullarda % 40'a ulaştığını bildirmişlerdir.

Kumar ve ark. (1998), Coker 310 çeşidinde sürdükleri araştırmalarında; somatik embriyogenesis ile yüksek frekanslı rejenerasyon için seleksiyon yapmışlar ve seleksiyonun üçüncü generasyonunda yüksek frekansta somatik embriyogenesis yolu ile rejenere olan bir saf hat selekte ederek, bu hatta Coker 310 FR adını vermişlerdir. Coker 310 FR hattı, Hindistan'da yetiştiriciliği yapılan ve *in vitro* rejenerasyon yeteneği zayıf olduğu bilinen 'MCU 5', 'MCU 7', 'Khandwa 2', 'Bikaneri Nemra', 'F 846' pamuk çeşitleri ile melezlenmiştir. F_1'lerin rejenerasyon potansiyelleri araştırılmış ve *G. barbadense* L. x *G. hirsutum* L.Coker FR melezi dışındaki F_1'lerin tamamının somatik embriyogenesis yoluyla rejenere olabildikleri görülmüştür.

Vlachostergios ve ark. (1998), 6 adet *G. hirsutum* L. (Stoneville 506, Coker 315, Acala SJ_2, Korina, Uzbekistan 2, C- 6524) ve 1 adet *G. barbadense* L. (Menufi)

pamuk çeşidinin olgunlaşmamış zigotik embriyolarının *in vitro* kültürdeki tepkilerini inceledikleri çalışmada; eksplant olarak tarlada ve serada yetiştirilmiş bitkilerden erken dönemde hasat edilen kozalardan izole edilen embriyoları kullanmışlardır. Gelişmekte olan kozalar tarlada yetiştirilen bitkilerden tozlanmadan 10, 12 ve 14 gün ve serada yetiştirilen bitkilerden ise tozlanmadan 12, 14 ve 16 gün sonra hasat edilmişler, % 50'lik ethanol (3 dak.), % 30'luk sodyum hipoklorit (15 dak.) ve steril destile su ile yıkanarak sterilize edilmişlerdir. İzole edilmiş olan olgunlaşmamış zigotik embriyolar, 2,4 D (1 mg/l) ve kinetin (0.5 mg/l) eklenmiş SH (Stewart ve Hsu, 1977) ve BT (Beasley ve Ting, 1973) besi ortamlarında kültüre alınmıştır. Tüm kültürler, 60-70 gün boyunca 28 °C 'de, karanlık koşullarda inkübe edilmiştir. Embriyogenik kallus kapasitesini araştırmak için, indüksiyon periyodunun sonunda, oluşan kalluslar sıvı ve yarı-sıvı MS + B5 vit. besi ortamlarında, 28 °C 'de 16 saat fotoperyod ve 70-90 $molm^2sec^{-1}$ ışık koşullarında kültüre alınmışlardır. Gelişen embriyoidler önce M1 (MS makro elementleri ve Fe + 1.9 g/l KNO_3) besi ortamına geçirilmiş, daha sonra bunlar tepkilerine göre, üç farklı besi ortamına aktarılmışlardır. Sonuç olarak, Genotip x Besi ortamı x Yaş interaksiyonunun önemli olduğu belirtilmiştir. Embriyo gelişim dönemi, embriyo uzunluğu ve kallus oluşumu arasında pozitif bir korelasyon olduğu gözlenmiştir. Seradan tozlanmadan 14 gün sonra hasat edilen 0.8 – 1.5 mm uzunluğundaki embriyolar ve tarladan tozlanmadan 16 gün sonra hasat edilen 1.2 – 2.2 mm uzunluğundaki embriyolar en yüksek kallus oluşumunu sergilemişlerdir. Kallus indüksiyon ortamlarında (SH ve BT) kültüre alınmış olan embriyoların kotiledon ve hipokotillerindeki epidermal hücrelerde globular ve kalp şeklinde embriyoidler gözlenmiş ve daha sonra modifiye edilmiş MS besi ortamına aktarılan bu embriyoidlerin, kök ve yaprak oluşturdukları ancak , kesinlikle düzenli bitkiler haline dönüşmediklerini saptanmıştır.

Holmuratov ve ark. (2000), AN-Bayaut-2 ve C-4880 çeşitleri ile sürdürdükleri araştırmada; 7 günlük steril bitkiciklerden elde edilen sürgün uçları, hipokotil parçaları ve 20-25 günlük kozalardan çıkarılan embriyoları farklı kombinasyonlarda 2,4-D (0.1 mg/l), 2,4-DP (0.1 mg/l), NAA (2.0 mg/l), IAA (1.0 mg/l), kinetin (0.1 mg/l), BAP (0.1 mg/l) ve adenine (10 mg/l) içeren , MS tuzları, B5 vitaminleri ve 30 g/l glukoz içeren ve agar-agar (% 0.7) ile katılaştırılmış besi

ortamlarında kültüre almışlardır. Araştırıcılar, 2,4-D'nin tüm eksplantlarda kallus dokusunun çoğalmasını teşvik ettiğini, ancak sadece olgunlaşmamış embriyolardan elde edilen kalluslar 2,4-D ve BAP içeren ortamda alt kültüre alındıklarında somatik embriyogenesis gözlendiğini bildirmektedirler.

Zhang ve ark. (2000), pamukta somatik embriyogenesis yoluyla bitki rejenerasyonu konulu çalışmalarında; Coker 201 ve CRI 12 pamuk çeşitlerinin *in vitro* koşullarda çimlendirdikleri tohumlarından elde ettikleri 7 günlük fidelerden izole ettikleri hipokotil parçaları ve kotiledon parçalarını 0.1 mg/l zeatin+0.1 mg/l IAA içeren MS ortamında kültüre almışlardır. İki ay içersinde eksplantlardan embriyogenik kallus oluşmuş ve oluşan bu kallus 35 gün ara ile kallus indüksiyon ortamında alt kültüre alınmıştır. Alt kültür ortamında embriyoidler oluşmuş ve bu embriyoidler 20 gün sonra çimlenmiştir. Ancak, oluşan fideler; anormal büyüme noktası, anormal yaprak oluşumu gibi 10 değişik anormallik göstermiştir. Söz konusu anormal fidelerden izole edilen yaprak ve sap parçaları farklı büyüme düzenleyicisi kombinasyonları içeren MS ortamlarında kültüre alınmıştır. 0.1 mg/l zeatin+2 g/l aktif karbon içeren ortamda; yaprak parçası eksplantı başına 28, sap parçası eksplantı başına ise 28.1 olgun somatik embriyo elde edilmiştir. Oluşan somatik embriyolar 0.1 mg/l zeatin içeren MS ortamında kültüre alındığında, çimlenerek normal bitkileri oluşturmuşlardır. Bitkiler toprağa aktarıldıklarında, düzenli şekilde büyümüşler ve normal görünümlü bitkiler haline gelmişlerdir.

Sakhanokho ve ark. (2001), *G. hirsutum* L. çeşidi Deltapine 90 ve *G. barbadense* L. hattı GB-35B126 (P1-528306) ile sürdürdükleri araştırmada; 4-10 günlük fidelerden alınan hipokotil ve kotiledon eksplantlarını Kin (1.0 mg/l) + NAA (2 mg/l) içeren MS ortamında kültüre almışlardır. Eksplantlarda oluşan kalluslardan; küçük hücreli, yoğun sitoplazmalı, hızlı çoğalan ve gevşek yapılı proembriyogenik kalluslar seçilmiş ve bu kalluslar kinetin (0.1 mg/l) + NAA (0.5 mg/l) içeren MS ortamına aktarılmıştır. Bu ortamda embriyogenik (kırılgan, granular ve sarımsı yeşil) kalluslar periyodik olarak seçilmiş ve aynı ortamda kültüre devam edilmiştir. Seçilen kalluslar (1-3 g /100 ml), daha sonra amonyum nitrat içermeyen, buna karşılık iki katı potasyum nitrat içeren sıvı MS ortamı ilave edilmiş 250 ml'lik erlenlere aktarılmıştır. Bu erlenler, 130 rpm'lik shaker üzerinde 16 saat fotoperyot 28

°C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra kültürler, farklı konsantrasyonlarda kinetin ve NAA veya 2,4-D içeren katı MS ortamına aktarılmıştır. Çimlenen somatik embriyolar, hormon içermeyen MS besi ortamına alınmış ve bitkicikler seraya aktarılmadan önce dış ortama alıştırılmıştır. Araştırıcılar, hipokotillerin kotiledonlardan daha fazla kallus ürettiklerini, potansiyel embriyogenik kallusun tanınması ve seleksiyonunun pamuk rejenerasyonunda kritik bir aşama olduğunu, hem hipokotil hem de kotiledonlardan oluşan kallusun çoğunlukla küçük bir kısmının embriyogenik potansiyel gösterdiğini ve embriyogenik olanı embriyogenik olmayandan ayırt edebilmekteki başarısızlığın potansiyel embriyogenik kallusun embriyogenik olmayana dönüşmesiyle sonuçlanabileceğini belirtmişlerdir. 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 sayısını da artırdığını saptamışlardır. Çalışmada değişik tiplerde anormal embriyolar ve bitkiler (kök veya kotiledon taşımayan, sadece kök üretip kotiledon oluşturmayan) gözlenmiş, ancak bu tip embriyolardan sağlıklı bitki üretilememiştir. Anormal embriyo ve bitki oluşumunun *G. barbadense* L. hattında (%5 civarında) *G. hirsutum* L. çeşidindekine (% 1'den az) oranla daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Hem bir gram embriyogenik kallus başına embriyo sayısı ve hem de bir gram embriyogenik kallus başına rejenere olan bitki sayısı açısından genotipler arasında önemli düzeyde farklılık bulunmuştur. Besi 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 yansıması nedeniyle ortaya çıkabileceği belirtilmiştir. Çalışmada Deltapine 90'dan elde edilen ortalama embriyo sayısının (914 embriyo/g kallus) daha önce yapılan çalışmalarda Coker 312 için belirtilmiş olandan (780 embriyo/g kallus) daha yüksek olduğu bildirilmiştir.

Sunilkumar ve Rathore (2001), pamukta transformasyonu ve rejenerasyonu etkileyen faktörleri inceledikleri çalışmada, eksplant olarak Coker 312 çeşidinin 10-12 günlük *in vitro* fidelerinden alınan hipokotil parçaları (5-6 mm) ve kotiledon disklerini (7 mm çapında) kullanmışlardır. Eksplantları, MS tuzları + myo-inositol

(100 mg/l) + thiamine HCl (0.4 mg/l) + 2iP(5 mg/l) + NAA (0.1 mg/l) + glukoz (% 3) + $MgCl_2.6H_2O$ (1 g/l) + acetosyringone (100 µM) + Phytagel (% 0.2) içeren ortam üzerine yerleştirilen filtre kağıdı üzerinde kültüre almışlar ve eksplantların kesik kısımlarına *Agrobacterium* süspansiyonu uygulamışlardır. Daha sonra eksplantları yukarıdaki ortam ile aynı ancak acetosyringonun çıkarılıp, kanamycin (50 mg/l) ve carbenicilin (400 mg/l) antibiyotiklerinin eklendiği besi ortamına aktarmışlardır. Kültürler 28 °C'de, 16 saat fotoperyot ve 70 $\mu mm^{-2}s^{-1}$ ışık koşullarında 20-25 gün inkübe edilmiştir. Kesilen kenarlarda gelişen transforme olmuş kallus, MS tuzları + myo-inositol (100 mg/l) + thiamine HCl (0.4 mg/l) + 2iP (0.1 mg/l) + NAA (5 mg/l) + glukoz (% 3) + $MgCl_2.6H_2O$ (1 g/l) + kanamycin (50 mg/l) + carbenicylin (400 mg/l) + phytagel (% 0.2) içeren besi ortamına aktarılmıştır. Üç alt kültür sonra, kalluslar, MS tuzları + myo-inositol (100 mg/l) + B5 organik maddeleri + ek KNO_3 (1.9 g/l) + glukoz (% 3)+ $MgCl_2.6H_2O$ (1 g/l) + kanamycin (25 mg/l) + carbenicilin (200 mg/l) + Phytagel (% 0.2) içeren ortama aktarılmış ve somatik embriyolar oluşana kadar ayda bir kez alt kültüre alınmıştır. Somatik embriyolar çimlenmeleri için 1/2MS tuzları + myo-inositol (100 mg/l) + thiamine HCl (0.4 mg/l) + glukoz (% 0.5) + phytagel (% 0.2) içeren besi ortamı üzerine yerleştirilen filtre kağıdı üzerinde kültüre alınmıştır. Çimlenmeden sonra köklü bitkiler cam kavanozlardaki 1/2MS tuzları + thiamine HCl (0.14 mg/l) + pyridoxine (0.1 mg/l) + nicotinic acid (0.1 mg/l) + glukoz (% 0.5) + phytagel (% 0.08) + difco bacto agar (% 0.4) içeren besi ortamına aktarılmışlardır. İyi bir kök sistemi oluşturan 5-7 cm uzunluğundaki bitkiler, toprağa aktarılmış dış koşullara alıştırılmışlar ve sera koşullarında olgunlaşana kadar yetiştirilmişlerdir. Araştırıcılar, kallus boyutunun yaşama şansı üzerinde güçlü bir etkisinin bulunduğunu, aktarılma aşamasındaki küçük boyutlu kallusların yaşam şansının düşük olduğunu belirtmişlerdir. Aynı zamanda, kallusların embriyogenesis ortamına aktarılmadan önce, yüksek sitokinin ve düşük oksin içeren besi ortamında iki haftalık süreyle kültüre alınmasının kallus yaşama şansını önemli düzeyde artırdığını, ancak bu uygulamanın embriyogenesisi geciktirdiğini bildirmişlerdir.

Zhang ve ark. (2001), elit Çin pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşidi Simian-3'ün farklı eksplantları (hipokotil, kotiledon, kök) ile sürdürdükleri araştırmada, MS

tuzları+B5 vitaminleri+Zeatin içeren ortamda söz konusu eksplantlardan kallus elde etmişlerdir. Araştıcılar, hipokotillerden kallus elde edilmesinin kotiledon ve köklere göre daha kolay olduğunu, kallus indüksiyonu ve çoğaltılmasında ortamdaki zeatin konsantrasyonunun çok etkili olduğunu, kallus indüksiyonu için optimum zeatin konsantrasyonunun 3-5 mg/l olduğunu saptamışlardır. Kültür başlangıcından 70 gün sonra oluşan kallusta; embriyogenik (hızlı gelişen, açık sarı ve gevşek yapılı – dağınık ve farklı gelişme aşamalarında somatik embriyolar oluşturabilen) ve embriyogenik olmayan (yavaş gelişen, kompakt, açık kahverengi veya açık ya da koyu yeşil renkli, bazıları ileri kültür aşamasında kahverengine dönüşüp ölebilen) olmak üzere iki kallus tipi ayırt edilmiştir. En yüksek embriyogenik kallus frekansı hipokotil eksplantlarından elde edilmiştir. Embriyogenik kallusun 20 günlük alt kültürden sonra farklı aşamalarda somatik embriyolar halinde gelişme gösterdiği, somatik embriyo üretimi açısından en fazla tepki veren eksplantın kök eksplantı olduğu ve bunu hipokotilin izlediği bildirilmiştir. Ayrıca, zeatinin düşük konsantrasyonunun embriyogenik kallus oluşumu için avantajlı olduğu, 2,4-D'nin embriyogenik kallus çoğalmasını artırdığı, ancak somatik embriyoların farklılaşmaları ve çimlenmeleri üzerinde negatif bir etkiye sahip olduğu, aktif karbon veya uygun bir zeatin + IAA kombinasyonunun somatik embriyoların oluşumu, olgunlaşması ve çimlenmesini artırabildiğine dikkat çekilmiştir. Araştırıcılar, geliştirdikleri protokol ile 3-4 ayda hipokotil, kotiledon ve kök eksplantlarından somatik embriyogenesis yoluyla bitki rejenere olabildiğini bildirmişlerdir.

Efe (2002), 1999-2001 yılları arasında sürdürdüğü araştırmada; iki değişik pamuk türünün (*Gossypium hirsutum* L. ve *G. barbadense* L.) 3, 9, 15 ve 21 günlük tohum taslaklarını 100 mg/l myoinositol, 30 g/l glikoz, 9 g/l agar, 100-120 ml/l hindistan cevizi sütü, 0.5 mg/l GA_3, 1 g/l kazein hidrolizat ve 1 g/l malt ekstraktı ve 16 farklı büyüme düzenleyicisi kombinasyonu içeren MS ortamlarında kültüre almıştır. Araştırıcı, 1999 yılında elde edilen kallusların tümünün esmerleştiğini, 2000 yılında ortamlara 3g/l aktif karbon kömürü ilavesi ile *G. hirsutum* L.türünde % 13.2, *G. barbadense* L. türünde ise % 4.4 kallus oluştuğu, 2001 yılında ise *G. hirsutum* L. türünde % 85.2, *G. barbadense* L.türünde % 44.1 oranında kallus oluştuğunu bildirmektedir. 2000 yılında, *G. hirsutum* L. türünde 0.5Kin+0.5IAA ve 0.5 Kin

+1.5 IAA kombinasyonlarının hem 3 hem de 9 günlük tohum taslaklarında kallus oluşumunu teşvik ettiği, *G. barbadense* L. türünde ise 0.5 mg/l kinetin +0.5 mg/l IAA kombinasyonunun 9 günlük, 0.5 mg/l kinetin +1.5 mg/l IAA kombinasyonunun ise 3 günlük tohum taslaklarında kallus oluşumunu teşvik ettiği belirlenmiştir. 2001 yılında ise, hemen hemen tüm hormon kombinasyonlarında kallus oluştuğu ve *G. hirsutum* L. türünde hem 3, hem de 9 günlük tohum taslaklarında, *G. barbadense* L. türünde ise sadece 3 günlük tohum taslaklarında kallus oluşumunun görüldüğü bildirilmektedir. 2000 ve 2001 yıllarında, elde edilen kalluslar dengeli kök ve sürgün gelişimini sağlayabilmek amacıyla 0.1 mg/l NAA + 3 mg/l 2iP ilave edilmiş MS ortamında kültüre alınmış, ancak kök veya sürgün oluşumu gözlenmemiştir.

Kumria ve ark. (2003), Coker 310 çeşidi ile sürdürdükleri araştırmada; 2,4-D (0.1 mg/l) + kinetin (0.5 mg/l) + 3% maltoz içeren MS besi ortamında kültüre aldıkları hipokotil ve kotiledon yaprak parçalarından embriyogenik kallus elde etmişlerdir. Bu kallus, yüksek konsantrasyonlu nitrat ile zenginleştirilmiş, hormon içermeyen MS besi ortamına aktarıldığında globular dönemde somatik embriyolar oluşmuştur. Globular embriyoların hormonsuz MS besi ortamında alt kültüre alınması ile düşük frekanslı (2-4 adet/petri) torpido ve kotiledon safhasındaki embriyolar oluşmuş ve embriyoların çoğunda gelişmede ve farklılaşma dönemine geçişte yetersizlik gözlenmiştir. Kalluslar 1/5 MS ortamında kültüre alındığında, embriyogenesiste belirgin iyileşme (2-3 kat) olmuştur. Oluşan globular embriyolar MS besi ortamı üzerine yerleştirilmiş filtre kağıtları üzerinde kültüre alındıklarında, bunların normal bitkiye dönüşmelerinde önemli ölçüde artış olmuştur. Bu koşullarda, globular embriyoların % 33'ü sadece kotiledon dönemine kadar gelişme göstermekle kalmamış, aynı zamanda ayrı bir köklenme aşaması uygulanmaksızın kendiliğinden köklenmiştir. Kotiledon dönemindeki embriyoların % 70'inden fazlası 0.05 mg/l gibberellic acid içeren MS besi ortamında kültüre alındıklarında normal bitkiler oluşturmuşlardır.

Mishra ve ark.(2003), Coker 312, Maxxa ve Riata fidelerinin hipokotil eksplantları MS tuzları + myo-inositol (100 mg/l)+ B5 vitaminleri + NAA (10.7 μ M) + 2,4-D (0.2 μ M) + $MgCl_2$ (0.75 g/ l) + glucose (30 g/ l) + Phytagel(2.5 g /l) içeren ortamda kültüre alındığında, başarılı şekilde rengi, yapısı boyutu ve

organizasyonu açısından yüksek kaliteli embriyogenik kallus (sarımsı yeşil – krem rengi , yapı olarak granüler, sıvı besi ortamında kolayca dağılabilecek özelliklerde kırılgan) oluştuğunu saptamışlardır. Seçilen embriyogenik kallusları MS tuzları+100 mg/l myo-inositol+B5 vitaminleri+0.75 gr/l $MgCl_2$+ 30 g/l glukoz +1.9 gr/l KNO_3 içeren sıvı ortama (MSK ortamı) aktarmışlar ve 4–6 hafta sonra süspansiyon kültürlerinde sitoplazmik olarak yoğun embriyogenik hücreleri mikroskop altında tanımlamışlardır. Araştırıcılar, kaliteli embriyogenik süspansiyon kültürlerinin, kirli, grimsi yeşil renkli ve mikroskop altında incelendiğinde farklı gelişme aşamalarında somatik embriyolar içermesi ile karakterize olduğuna dikkat çekmişlerdir. Süzerek tekrar süspanse ettikleri materyali 40 mg yaş ağırlık / ml olacak şekilde pipetle yarı katı MSK besi ortamı (MSK + 2.5 g/ l phytagel) içeren petri kutularına (2 ml/petri) aktarmışlar ve 4–6 hafta sonra kalp şeklindeki somatik embriyoları (5 mm ve daha küçük) Stewart Dehidrasyon besi ortamında (SGM +10 g/l bacto-agar) 10–15 gün boyunca parafilmsiz petri kutularında karanlıkta 28 °C de dehidrate etmişler, daha ileri devredeki embriyolar için dehidratasyon ortamı kullanmamışlardır. Olgun embriyoları daha sonra köklemeyi artırmak için SGA (SGM + 5.7 m M IAA) besi ortamına aktararak 28 °C indirekt ışık koşullarında inkübe etmişlerdir. Çimlenen embriyoları 6-8 haftada bir kez SGA besi ortamına aktarmışlar ve en az iki gerçek yaprak geliştiğinde, bitkiler SGA besi ortamı içeren (45 ml) kavanozlara, daha sonra da 4–6 hafta içinde 4-6 yaprak ve yeterli kök sistemi geliştiğinde topraklı saksılara aktarılmıştır. Polietilen torbalarla kapatılan bitkileri dış koşullara alıştıktan sonra tohum oluşturmaları için serada yetiştirilmişlerdir. Araştırıcılar, kallusta ve embriyogenik kültürlerdeki az miktardaki antocyanin (kırmızı pigmentasyon) birikiminin 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 olduğu belirtmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOD

1999-2003 yılları arasında yürütülen bu araştırma; pamuk anterlerinden haploid bitki rejenerasyonu, farklı pamuk eksplantlarından organogenesis yoluyla bitki rejenerasyonu ve farklı pamuk eksplantlarından somatik embriyogenesis yoluyla bitki rejenerasyonu olmak üzere üç farklı bölüm halinde sürdürülmüştür. Denemelerde kullanılmak üzere tarla koşullarından elde edilen materyal Çukurova Tarımsal Araştırma Enstitüsü deneme alanında yetiştirilmiş olup, laboratuar çalışmaları ise Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Bitki Doku Kültürü Laboratuarında sürdürülmüştür.

3.1. Materyal

3.1.1. Anter Kültürü Çalışmalarında Materyal

Anter kültürü araştırmalarında, Çukurova-1518, Coker 312, Nazilli 84, Erşan 92, Maraş 92, Adana 98 ve Sayar 314 pamuk çeşitleri, bitkisel materyal olarak kullanılmıştır. Söz konusu çeşitlerin tohumları, Nazilli Pamuk Araştırma Enstitüsü ve Çukurova Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Araştırmada kullanılan çeşitlerin bazı bitkisel ve tarımsal özellikleri Çizelge 3.1'de verilmiştir.

3.1.2. Organogenesis Çalışmalarında Materyal

Pamukta sürgün uçları ve kotiledon nodlarından organogesis yoluyla rejenerasyon araştırmalarında, Çukurova 1518, Coker 312 ve Erşan 92 pamuk çeşitleri, bitkisel materyal olarak kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Denemede Kullanılan Pamuk Çeşitlerinin Özellikleri

Özellik	Adana 98	Coker312	Çuk. 1518	Erşan 92	Maraş 92	Naz. 84	Sayar 314
Orijin	Avustralya	ABD	Adana	K.Maraş	K.Maraş	Nazilli	K.Maraş
Bitki Formu	Konik	Konik	Konik	Konik	Konik	Konik	Konik
Koza Dizilişi	Yarı Kloster	Yarı Kloster	Yarı Kloster	Yarı Kloster	Yarı Kloster	Yarı Kloster	Yarı Kloster
Yaprak Şekli	Okra	Palmiye	Palmiye	Palmiye	Palmiye	Palmiye	Palmiye
Bitki Boyu	80	105	105	130	152	110	111
Odun Dalı	3-5	2-3	3-4	3-4	4-5	4-5	3-4
Meyve Dalı Sayısı	14-16	11-13	16-18	17-20	14-16	14-16	13-15
Koza Açma Gün Sayısı	126	120	125	117	129	119	118
Tek Koza Ağ (g)	5.4	5.4	6.1	6.3	6.6	6.2	6.4
100 Tohum Ag. (g)	9.9	11.0	9.9	10.8	12.7	11.2	12.8
Çırçır Rand. %	43.0	41.8	41.0	39.4	39.2	45.0	39.3
Lif Uzun. (mm)	30.8	32	29.3	28.8	30.1	30.3	30.6
Lif İnceliği (mic.)	3.8	4.5	4.1	3.9	4.6	4.8	5.0
Lif Muka (Pressley)	81.3	89.2	85.9	85.7	87.8	82.1	78.4

Kaynak: Çağırgan ve Barut (2000)

3.1.3. Somatik Embriyogenesis Çalışmalarında Materyal

Hipokotil ve olgunlaşmamış embriyolardan somatik embriyogenesis yoluyla bitki rejenerasyonu gerçekleştirmek amacıyla yürütülen çalışmalarda, Çukurova 1518, Coker 312 ve Erşan 92 pamuk çeşitleri, materyal olarak kullanılmıştır. Somatik embriyogenesis çalışmalarında hipokotil eksplantlarının kültüre alınması amacıyla laboratuvarda *in vitro* fide (donor bitki olarak kullanılmak üzere) elde etmek için çimlendirilen tohumlar ve olgunlaşmamış embriyoların kültüre alınması için aynı sezonda Çukurova Tarımsal Araştırma Enstitüsü deneme alanında yetiştirilmiş olan pamuk çeşitlerinin tohumları, Nazilli Pamuk Araştırma Enstitüsü'nden sağlanmıştır.

3.2. Metod

3.2.1. Besi Ortamlarının Hazırlanması

Araştırmada temel besi ortamı olarak, MS (Murashige ve Skoog, 1962) besi ortamı kullanılmıştır. Bu besi ortamının içeriği, Çizelge 3.2'de gösterilmiştir. Aynı zamanda çalışmada eksplanta ve kültür aşamasına göre değişmek üzere bazı uygulamalarda MS yerine B5 (Gamborg ve ark., 1968) vitaminleri kullanılmış olup, içerik farklılıkları Çizelge 3.3'te verilmiştir.

3.2.1.1. Makro ve Mikro Elementlerin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

Çizelge 3.2'de içeriği verilen MS makro ve mikro elementlerinden $MgSO_4.7H_2O$, KH_2PO_4, KNO_3, NH_4NO_3, $CaCl_2.2H_2O$, H_3BO_3, $MnSO_4.H_2O$ ve $ZnSO_4.7H_2O$ standart besi ortamında bulunması gereken miktarlarının on katı (X10 konsantrasyonunda) olacak şekilde hassas terazide tartılmış ve bidestile su içeren erlenmayere sırasıyla eklenip magnetik karıştırıcıda çözünmeleri sağlanmıştır. Söz konusu elementler tamamen çözündükten sonra karışımın hacmi 1000 ml'ye tamamlanmış ve 10X100 ml'ye bölünerek 10 ayrı polietilen stok kabına konularak

Çizelge 3.2. Araştırmada Kullanılan MS (Murashige ve Skoog, 1962) Besi Ortamının Bileşimi

No	Kimyasallar	Konsantrasyon (mg/l)
	Makro Elementler	
1	$MgSO_4.7H_2O$	370.0
2	KH_2PO_4	170.0
3	KNO_3	1900.0
4	NH_4NO_3	1650.0
5	$CaCl_2.2H_2O$	440.0
	Mikro Elementler	
6	H_3BO_3	6.2
7	$MnSO_4.H_2O$	15.6
8	$ZnSO_4.7H_2O$	8.6
9	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
10	$CuSO_4.5H_2O$	0.025
11	$CoCl_2.6H_2O$	0.025
12	KI	0.83
13	$FeSO_4.7H_2O$	27.8
14	Na_2EDTA	37.3
	Organik Bileşikler	
15	Thiamin. HCl	0.1
16	Pyridoxin. HCL	0.5
17	Nikotinik Asit	0.5
18	Myo- İnositol	100.0
19	Glycine	2.0
	Şeker Kaynağı	
20	Sakkaroz (g/l)	30.0
	Katılaştırıcı Madde	
21	Agar (g/l)	8.0
	pH : 5.8	

Çizelge 3.3. MS ve B5 (Gamborg ve ark., 1968) Vitaminleri

No	Vitamin	MS (mg/l)	B5 (mg/l)
1	Thiamin. HCl	0.1	10.0
2	Pyridoxin. HCL	0.5	1.0
3	Nikotinik Asit	0.5	1.0

derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Hazırlanacak her bir litre besi ortamı için, X10 konsantrasyonundaki bu stok çözeltinin 100 ml'si kullanılmıştır.

Besi ortamında daha düşük konsantrasyonlarda bulunan mikroelementlerin ($Na_2MoO_4.2H_2O$, $CuSO_4.5H_2O$, $CoCl_2.6H_2O$ ve KI) ise ayrı ayrı stok çözeltileri hazırlanmıştır. Söz konusu mikroelementlerin herbirisi standart besi ortamında bulunması gereken miktarının 100 katı olacak şekilde hassas terazide tartılmış ve bidestile su içeren erlenmayere ilave edilerek, magnetik karıştırıcıda çözünmesi sağlanmıştır. Söz konusu element tamamen çözündükten sonra karışımın hacmi 100 ml'ye tamamlanmış ve cam şişeye konularak buzdolabında muhafaza edilmiştir. Hazırlanacak her bir litre besi ortamı için bu stok çözeltilerinin 1'er ml'si kullanılmıştır.

3.2.1.2. Demir Jelat ($FeSO_4.7H_2O$ ve Na_2EDTA) Stok Çözeltisinin Hazırlanması

Demir Jelat stok çözeltisinin hazırlanmasında, 1.8625 g Na_2EDTA bidestile su (200 ml) içeren erlenmayere (250 ml'lik) eklenip magnetik karıştırıcıda çözünmesi sağlanmış ve 90 °C'ye kadar ısıtılmıştır. Daha sonra, 1.3925 g $FeSO_4.7H_2O$ eklenip karıştırılmış ve soğutulduktan sonra karışım hacmi 250 ml'ye tamamlanmıştır. Bu çözelti ışık görmeyecek şekilde koyu renkli veya alüminyum kağıtla sarılmış pyrex şişe içinde oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Hazırlanacak her bir litre besi ortamı için bu stok çözeltinin 5 ml'si kullanılmıştır.

3.2.1.3. Vitamin Stok Çözeltisinin Hazırlanması

Besi ortamlarında kullanılan vitaminlerin her birinin 100 mg / 100 ml stok çözeltileri hazırlanmıştır. Bu amaçla 100 mg vitamin hassas terazide tartılarak 50 ml bidestile su içeren erlenmayere eklenip magnetik karıştırıcıda çözünmesi sağlanmış ve son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır. Vitamin çözeltileri cam şişelere konularak buzdolabında muhafaza edilmiştir. 100 mg / 100 ml lik bu çözeltiler besi ortamlarında, standart besi ortamının içeriği ve hazırlanan besi ortamı hacmi dikkate alınarak belirlenen miktarlarda kullanılmıştır.

3.2.1.4. Büyüme Düzenleyicilerinin Stok Çözeltisinin Hazırlanması

Besi ortamlarında kullanılan büyüme düzenleyicilerinin her birinin 100 mg/100 ml konsantrasyonlu çözeltileri hazırlanmıştır. Bu amaçla, 100 mg büyüme düzenleyicisi hassas terazide tartılarak birkaç damla 1N KOH içinde çözüldükten sonra, bidestile su eklenerek magnetik karıştırıcı üzerinde hafif ısıtılarak (50 °C) karıştırılmıştır. Büyüme düzenleyicisinin çözülmesi tamamlandıktan sonra, karışım sıcaklığı oda sıcaklığına getirilerek, son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır. Büyüme düzenleyicilerinin stok çözeltileri cam şişelere konularak buzdolabında muhafaza edilmiştir. 100 mg/100 ml' lik bu çözeltiler besi ortamlarında, standart besi ortamının içeriği ve hazırlanan besi ortamı hacmi dikkate alınarak belirlenen miktarlarda kullanılmıştır.

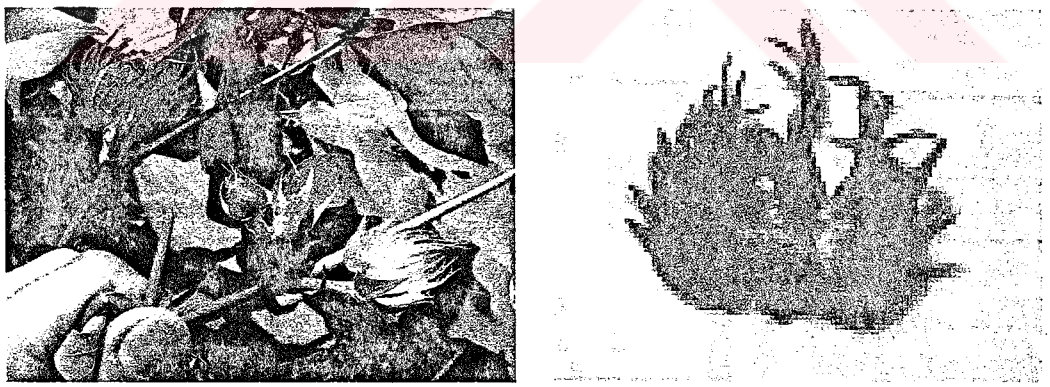
3.2.1.5. Stok Çözeltiler Kullanılarak Besi Ortamının Hazırlanması

Besi ortamlarının hazırlanmasında, inorganik kimyasalları içeren stok çözeltiler, şeker ve agar Karışım I olarak hazırlanmış, otoklavda sterilize edilmiştir. Organik kimyasallar, vitaminler, büyüme düzenleyicileri ise Karışım 2 olarak hazırlanmış, 0.2 μm poroziteli steril filtre ile sterilize edilmiştir. Daha sonra her iki karışım birleştirilerek steril kabinde kültür kaplarına dağıtılmıştır.

3.2.2. Eksplantların Hazırlanması ve Kültür Aşamaları

3.2.2.1. Anter Kültüründe Eksplantların Hazırlanması ve Kültür Aşamaları

Eksplantların Hazırlanması: Çukurova Tarımsal Araştırma Enstitüsü deneme alanında yetiştirilmiş olan bitkilerden çiçeklenme sezonu boyunca uygun büyüklükteki taraklar (5-8 mm tarak) (Şekil 3.1) toplanmış ve buzluk içinde muhafaza edilerek, laboratuvar çalışmalarının yürütüldüğü Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Bitki Doku Kültürü Laboratuvarına götürülmüştür. Anterler kültüre alınmadan önce taraklar buzdolabında +4 °C'de 3 gün süreyle bekletilmiştir. Mikrosporların tek çekirdekli oldukları dönemi belirlemek üzere bir ön çalışma yapılmıştır. Bu amaçla anterler asetokarmin 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 kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Pamukta Anter Kültürü. Anterleri kültüre alınacak olan 3-5 mm çiçek sürgünü taşıyan 5-8 mm taraklar

Yüzey Sterilizasyon : Tarladan toplanmış ve üç gün buzdolabında bekletilmiş olan 3-5 mm çiçek sürgünü taşıyan 5-8 mm tarakların brakte yaprakları uzaklaştırılmış ve steril kabinde sterilize edilmiştir. Bu amaçla çiçek sürgünleri önce

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 yıkanmıştır.

İlk Kültür Aşaması : Anter kültürü araştırmasında, içerikleri Çizelge 3.4'te verilen 9 farklı büyüme düzenleyici kombinasyonunu içeren 5.5 gr agar ile katılaştırılmış MS besi ortamları incelenmiştir. Yüzey sterilizasyon uygulaması sonrasında binoküler altında çıkarılan anterler, 7 ml besi ortamı içeren 60 x 15 mm boyutlarındaki petrilerde kültüre alınmıştır. Her bir petriye 20 adet anter yerleştirilmiştir. Araştırmada, içerisinde 20 anter kültüre alınan petri kutusu bir deneme ünitesi olarak dikkate alınmış ve her genotip-besi ortamı kombinasyonu için üç tekrarlama (üç petri kutusu) yapılmıştır. Kültüre alınan anterler, 27 °C ve % 70 nem koşullarını sağlayan inkübasyon dolaplarında, karanlık koşullarda inkübe edilmişlerdir.

Çizelge 3.4. Anter Kültüründe Kallus İndüksiyon ve Kallus Çoğaltma İçin Kullanılan MS Ortamlarının Büyüme Düzenleyicisi İçerikleri

Ortam No	Büyüme Düzenleyicisi	
	Kinetin (mg/l)	2.4 D (mg/l)
1	0.1	0.1
2	0.1	0.5
3	0.1	1.0
4	0.5	0.1
5	0.5	0.5
6	0.5	1.0
7	1.0	0.1
8	1.0	0.5
9	1.0	1.0

Kallus Çoğaltma (Alt Kültür) Aşaması : Kültüre alınmış olan anterler haftada bir kez binoküler altında incelenmiştir. Kallus oluşumları genel olarak anterlerde ilk kültür tarihinden yaklaşık 12 hafta sonra gözlenmiş ve 16. haftada kalluslar kallus çoğaltma ortamlarına aktarılmıştır. Çoğaltma ortamı olarak, kallus oluşumundan sonra embriyogenik kallus oluşumu ve gelişiminin izlendiği 2, 3 ve 8 nolu ortamlar kullanılmıştır (Çizelge 3.4).

Rejenerasyon Aşaması : Alt kültürde çoğalan kallus, Çizelge 3.5'te gösterilen farklı büyüme düzenleyicisi kombinasyonlarını içeren 5 farklı MS ortamında kültüre alınmış ve 27°C'de 2000 lükss ışık koşullarında inkübe edilmişlerdir.

Çizelge 3.5. Anter Kültüründe Bitki Rejenerasyonu İçin Kullanılan Farklı MS Ortamlarının Büyüme Düzenleyicisi ve Şeker İçerikleri

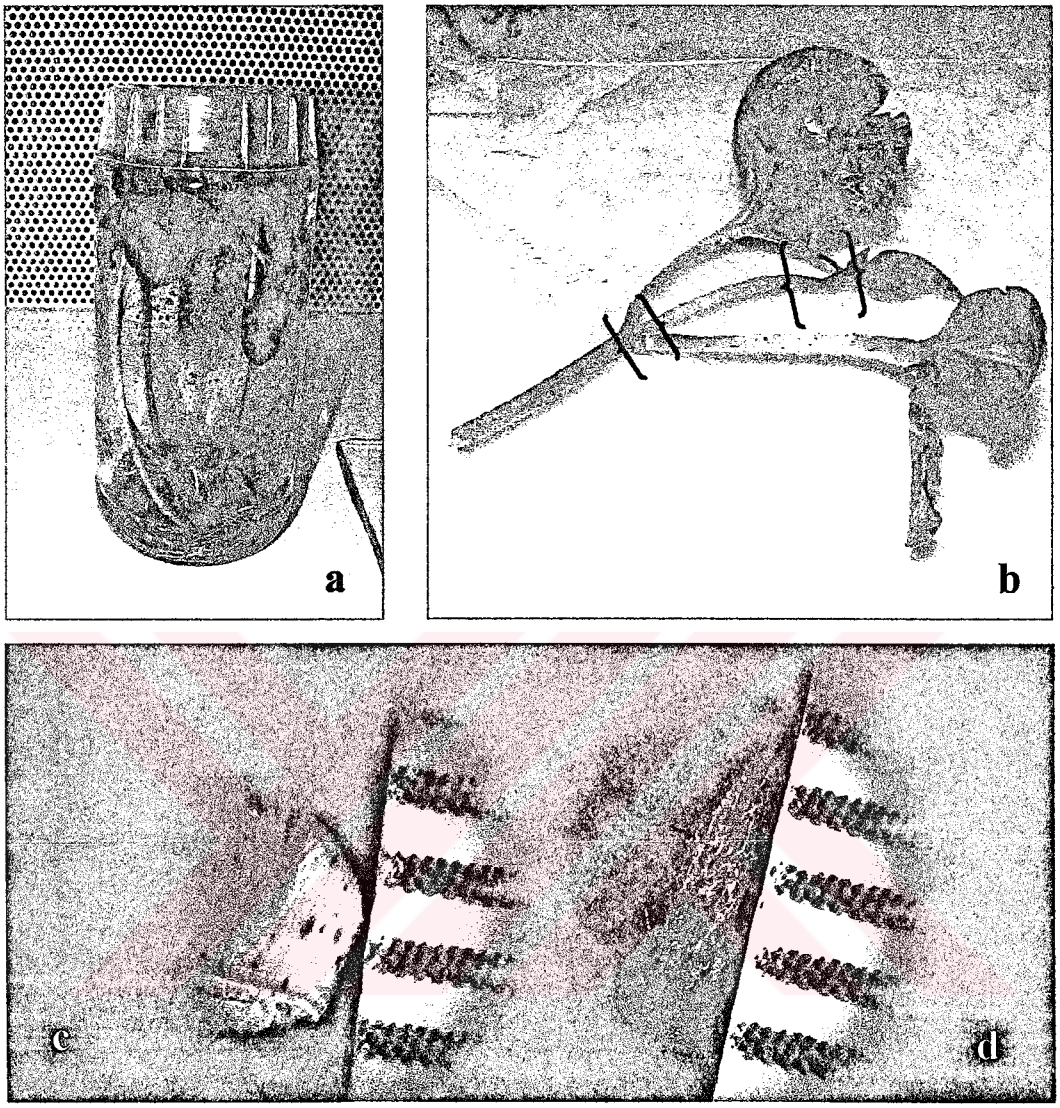
Ortam No	Büyüme Düzenleyicisi ve Şeker Kaynağı			
	Zeatin (mg/l)	PBA (mg/l)	IAA (mg/l)	Sukroz (g/l)
1	0.1	---	0.1	30
2	0.25	---	0.1	30
3	0.5	---	0.1	30
4	---	0.1	0.1	30
5	0.1	---	0.1	----

3.2.3.2. Organogenesis Çalışmalarında Eksplantların Hazırlanması ve Kültür Aşamaları

Eksplantların Hazırlanması : Organogenesis çalışmalarında eksplant olarak laboratuvarda steril koşullarda elde edilmiş 2 ve 5 haftalık *in vitro* fidelerden alınan sürgün uçları (3-8 mm) ve kotiledon nodları (3-5 mm) kullanılmıştır (Şekil 3.2). Bu amaçla delintasyon ve yüzey sterilizasyon işlemi uygulanmış tohumlar, kabukları çıkarılarak çimlendirilmiştir.

Delintasyon: Havlı tohumların üzerine saf H_2SO_4 (30g havlı tohum/25ml H_2SO_4) eklenip 2-3 dakika karıştırılarak havlar uzaklaştırılmış ve 5 dakika boyunca musluk suyunda yıkanmıştır. Daha sonra nötralizasyon amacıyla $CaCO_3$ (30g /30g havlı tohum) eklenip karıştırılan tohumlar yine musluk suyunda yıkanmıştır.

Yüzey Sterilizasyon: Delinte edilen tohumlara steril kabinde yüzey sterilizasyon uygulanmıştır. Bu amaçla önce 1.5 dakika süresince %70'lik alkol uygulanan tohumlar, ikinci aşamada 15 dakika %25'lik hipo + Tween 80 ile



Şekil 3.2. Organogenesis Çalışmalarında Sürgün Ucu ve Kotiledon Nodlarının Kültürü. a. *İn vitro* Fide (5 haftalık), b. Kullanılan eksplantlar, c ve d . Kotiledon Nodu ve Sürgün Ucu Boyutları

çalkalanmış ve 5-6 kez steril saf su ile yıkanmıştır. Yüzey sterilizasyon uygulamasından sonra tohumlar steril saf su içinde ve karanlıkta 1 gece bekletilmişlerdir. Yukarıda verilen yüzey sterilizasyon yöntemine ek olarak, aşırı kirli materyalle (özellikle pembe kurt *Pechtinophora gossypiella* Saund. zararı nedeniyle kirli tohumla) çalışıldığında kontaminasyonu önlemek amacıyla tohumlara iki aşamalı yüzey sterilizasyon uygulaması yapılmıştır. Bu amaçla önce 1,5 dakika süresince %70'lik alkol uygulanan tohumlar, daha sonra 20 dakika %40'lık hipo+Tween 80 ile çalkalanmış ve 5-6 kez steril saf su ile yıkanmıştır. İlk

yüzey sterilizasyon uygulamasından sonra, tohumlar steril saf su içinde ve karanlıkta 1 gece bekletilmişlerdir. Ertesi gün kirli materyalle çalışılmışsa sterilizasyon yapılan kabın tabanında genellikle bakteri oluşumu gözlenmiş ve ikinci bir yüzey sterilizasyonu yapılmıştır. Bunun için ise, önce 1,5 dakika süresince %70'lik alkol uygulanan tohumlar, daha sonra 10 dakika % 25'lik hipo+Tween 80 ile çalkalanmış ve 5-6 kez steril saf su ile yıkanmıştır.

Çimlendirme: Eş zamanlı çimlenebilmelerini sağlamak amacıyla kabukları çıkarılan tohumlar MS besi ortamı içeren kavanozlarda kültüre alınmış ve 2 veya 5 hafta süreyle 28 °C'de ışıklı koşullarda inkübe edilmiştir.

Kültür Aşaması: Organogenesis yolu ile bitki rejenerasyonu araştırmasında, içerikleri Çizelge 3.6'da verilen 7 farklı büyüme düzenleyici kombinasyonunu içeren ve biri büyüme düzenleyici içermeyen 8 farklı MSB ortamı (MS tuzları ve organikleri+ B5 vitaminleri) incelenmiştir.

Çizelge 3.6. Organogenesis Çalışmalarında Kullanılan MSB Besi Ortamlarının Büyüme Düzenleyicisi İçerikleri

Ortam No	Büyüme Düzenleyicileri (mg/l)
1	BAP (2.0) + kinetin (2.0)
2	BAP (2.0) + zeatin (2.0)
3	Kin (2.0) + zeatin (2.0)
4	PBA (2.0)
5	PBA (4.0)
6	Kin (2.0) + IAA (0.5)
7	Kin (0.5) + IAA (0.5) + GA3 (0.1)
8	----------

İki ve 5 haftalık *in vitro* fidelerin kotiledon yaprakları uzaklaştırılarak, 3-8 mm uzunluğundaki sürgün uçları ve sürgün ucu kesilerek iki kotiledon yaprak koltuğunu içeren kotiledon nodu (3-5 mm), 30 ml besi ortamı içeren polipropilen kapaklı cam kavanozlarda kültüre alınmışlardır. Her cam kavanozda iki eksplant kültüre alınmıştır. İki eksplant içeren kavanoz bir deneme ünitesi olarak dikkate alınmış ve her bir genotip-ekpslant-ortam kombinasyonu için 3 tekrarlama (üç kavanoz)

yapılmıştır. Eksplantları içeren kavanozlar, 28°C sıcaklık, 16 saat fotoperyot ve 2000 lüks ışık koşullarının sağlandığı büyütme odasında inkübe edilmiştir.

İlk iki haftalık kültür süresinin sonunda eksplantların solmuş ve kuru yaprakları uzaklaştırılıp, taban kısımlarında oluşan fenolik bileşiklerin etkilerini önlemek amacıyla, aynı kültür kabında yerleri değiştirilmiştir. Kültür başlangıcından 4 hafta sonra ise sürgünler uzamaları ve köklenmeleri amacıyla büyüme düzenleyicisi içermeyen MSB besi ortamına aktarılmış ve köklenen sürgünler saksılara aktarılırken, köklenmeyenlerin aynı besi ortamında alt kültürlerine (kökleme durumuna göre en az bir kez ve en fazla üç kez olmak üzere) devam edilmiştir.

Dış Ortama Adaptasyon Aşaması: Köklenen sürgünler, steril torf içeren saksılara aktarılmış ve saksların üzeri polipropilen torbalarla kapatıldıktan sonra, 28°C sıcaklık, 16 saat fotoperyot ve 10.000 lüks ışık koşullarının sağlandığı büyütme odasına yerleştirilmişlerdir.

İki hafta sonra, saksıların üzerindeki torbalara kesilerek delikler açılmış, üçüncü haftada delikler genişletilmiş ve dördüncü haftada torbalar çıkarılarak bitkilerin dış koşullara alışması sağlanmıştır. 2.5 ay sonra köklenmiş bitkiler daha büyük saksılara aktarılmış, gelişmeleri sağlanmıştır. İlk yıl yürütülen ön çalışma sırasında organogenesis yoluyla elde edilen köklü bitkilerin bir kısmı ÇUTAEM deneme alanına aktarılmıştır.

3.2.3.3. Somatik Embriyogenesis Çalışmalarında Eksplantların Hazırlanması ve Kültür Aşamaları

Somatik embriyogenesis çalışmalarında hipokotiller ve olgunlaşmamış embriyolar olmak üzere iki tip eksplant kullanılmıştır. Söz konusu eksplantlar için uygun besi ortamını belirlemek amacıyla Çukurova 1518 çeşidi ile bir ön çalışma yapılmıştır. Bu ön çalışmada, Çukurova 1518 çeşidinin hipokotilleri, Çizelge 3.7'de verilen 24 farklı MSB besi ortamında kültüre alınmıştır. Olgunlaşmamış embriyolar ise, Çizelge 3.8'de verilen 9 farklı MSB besi ortamında kültüre alınmıştır. Yapılan

Çizelge 3.7. Hipokotil Eksplantlarının Kullanıldığı Çukurova 1518 Pamuk Çeşidi İle Yürütülen Besi Ortamı Belirleme Çalışmasında Kullanılan Besi Ortamları (*)

Besi Ort. No	Büyüme Düzenleyicileri (mg/l)	Besi Ort. No	Büyüme Düzenleyicileri (mg/l)
1	Kinetin (0.1) + NAA (0.1)	13	Kinetin (1.0) + NAA (1.0)
2	Kinetin (0.1) + NAA (0.5)	14	Kinetin (1.0) + NAA (1.5)
3	Kinetin (0.1) + NAA (1.0)	15	Kinetin (1.0) + NAA (2.0)
4	Kinetin (0.1) + NAA (1.5)	16	PBA (0.1) + 2.4 D (0.1)
5	**Kinetin (0.1) + NAA (2.0)**	17	**PBA (0.1) + 2.4 D (0.5)**
6	Kinetin (0.5) + NAA (0.1)	18	**PBA (0.1) + 2.4 D (1.0)**
7	Kinetin (0.5) + NAA (0.5)	19	PBA (0.5) + 2.4 D (0.1)
8	Kinetin (0.5) + NAA (1.0)	20	PBA (0.5) + 2.4 D (0.5)
9	Kinetin (0.5) + NAA (1.5)	21	**PBA (0.5) + 2.4 D (1.0)**
10	Kinetin (0.5) + NAA (2.0)	22	PBA (1.0) + 2.4 D (0.1)
11	Kinetin (1.0) + NAA (0.1)	23	PBA (1.0) + 2.4 D (0.5)
12	Kinetin (1.0) + NAA (0.5)	24	PBA (1.0) + 2.4 D (1.0)

*) Ortamlara 30 gr/l sakaroz+ 5.5 g/l agar ilave edilmiş ve pH 5.8 olarak ayarlanmıştır.

Çizelge 3.8. Olgunlaşmamış Embriyo Eksplantlarının Kullanıldığı Çukurova 1518 Pamuk Çeşidi İle Yürütülen Besi Ortamı Belirleme Çalışmasında Kullanılan Besi Ortamları (*)

Besi Ort. No	Büyüme Düzenleyicileri (mg/l)
1	PBA (0.1) + 2.4 D (0.1)
2	**PBA (0.1) + 2.4 D (0.5)**
3	**PBA (0.1) + 2.4 D (1.0)**
4	PBA (0.5) + 2.4 D (0.1)
5	PBA (0.5) + 2.4 D (0.5)
6	**PBA (0.5) + 2.4 D (1.0)**
7	PBA (1.0) + 2.4 D (0.1)
8	PBA (1.0) + 2.4 D (0.5)
9	PBA (1.0) + 2.4 D (1.0)

*) Ortamlara 30 gr/l sakaroz+ 5.5 g/l agar ilave edilmiş ve pH 5.8 olarak ayarlanmıştır.

bu ön çalışma sonucunda, Çukurova 1518, Coker 312 ve Erşan 92 olmak üzere üç pamuk çeşidinin hipokotil ve olgunlaşmamış embriyoları, ön çalışmada kallus indüksiyonu ve embriyogenik kallus oluşumu açısından her iki eksplantta da tepki verdiği gözlenen 4 besi ortamının büyüme düzenleyicisi kombinasyonları ve en çok tepki veren ortamın büyüme düzenleyicisi kombinasyonu yerine farklı bir büyüme düzenleyicisi kombinasyonu ile kombine edilen 5 farklı MSB ortamında (Çizelge 3.9) kültüre alınmışlardır. Hazırlık ve kültür aşamalarındaki farklılıklar dikkate alınarak eksplantlara yapılan uygulamalar farklı bölümler halinde verilmiştir.

Çizelge 3.9. Hipokotil ve Olgunlaşmamış Embriyo Eksplantlarının Kullanıldığı Çukurova 1518, Coker 312 ve Erşan 92 Pamuk Çeşitleri İle Yürütülen Çalışmada Kullanılan Besi Ortamları (*)

Besi Ort. No	Büyüme Düzenleyicileri (mg/l)	Hipokotil Deneme1 BesiOrt No	Embriyo Deneme1 BesiOrt No
1	PBA (0.1) + 2.4 D (0.5)	17	2
2	PBA (0.1) + 2.4 D (1.0)	18	3
3	PBA (0.5) + 2.4 D (1.0)	21	6
4 (mod5)	PBA(0.1) + NAA (2.0)	-	-
5	Kinetin (0.1) + NAA (2.0)	5	-

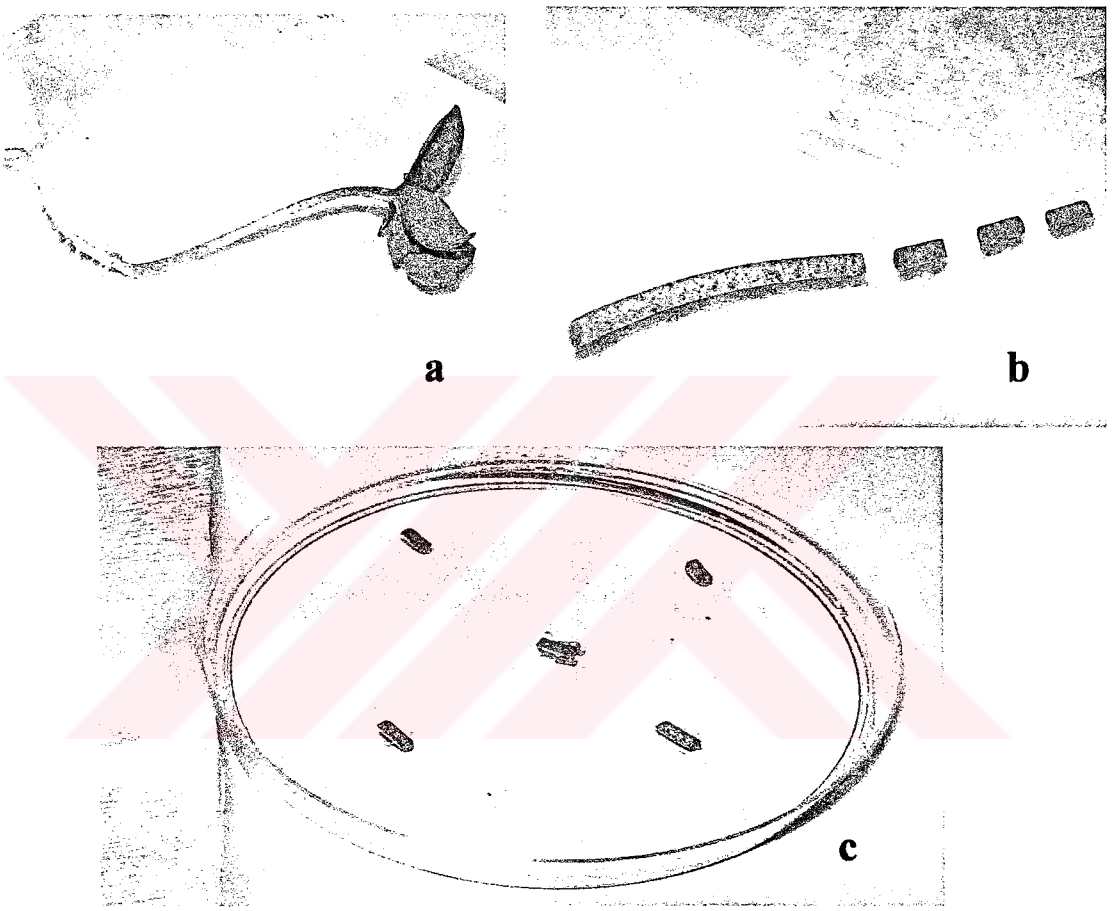
*) Ortamlara 30 gr/l sakaroz+ 5.5 g/l agar ilave edilmiş ve pH 5.8 olarak ayarlanmıştır.

3.2.3.3.(1). Hipokotil Eksplantlarının Hazırlanması ve Kültürü

Eksplantların Hazırlanması : Somatik embriyogenesis çalışmalarının bu bölümünde eksplant olarak laboratuvarda steril koşullarda elde edilmiş 1 haftalık *in vitro* fidelerden alınan hipokotil parçaları (4-5 mm) kullanılmıştır. Bu amaçla delintasyon ve yüzey sterilizasyon işlemi uygulanmış tohumlar, kabukları çıkarılarak çimlendirilmiştir.

Delintasyon, Yüzey Sterilizasyonu ve Çimlendirme: Organogenesis çalışmalarında kullanılan yöntem uyarınca yapılmıştır.

Kültür Aşaması: 1 haftalık *in vitro* fidelerin kök, sürgün uçları, kotiledon yaprakları uzaklaştırılarak hipokotil bölümü 4-5 mm uzunluğunda parçalar halinde kesilerek, 15 ml besi ortamı içeren 90 X 15 mm boyutlarındaki steril disposable petri kutularında kültüre alınmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Hipokotillerin Kültüre Alınması. a. 7 Günlük *İn Vitro* Fide, b. Hipokotil Eksplantları, c. Hipokotillerin Kültüre Alınması

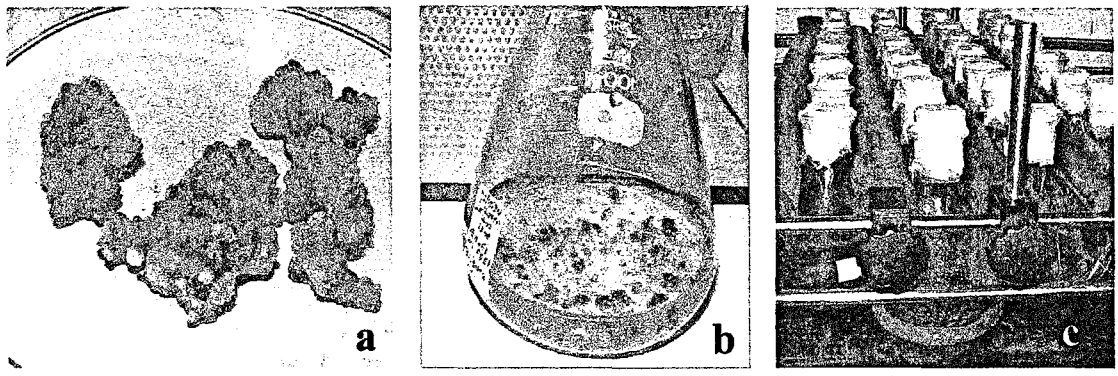
Denemede, içersinde beş hipokotil parçası kültüre alınmış bir petri kutusu deneme ünitesi olarak dikkate alınmış ve her genotip-besi ortamı kombinasyonu üç kez tekrarlanmıştır. Kültürler, 27°C sıcaklık, 16 saat fotoperyot ve 2000 lüks ışık koşullarının sağlandığı inkübasyon dolaplarında inkübe edilmiştir.

İlk 4-6 haftalık kültür süresinin sonunda, kallus indüksiyon ve embriyogenik kallus oranları belirlenmiş ve materyal aynı besi ortamlarında alt kültüre alınmıştır. Çoğaltılan kalluslar, steril koşullarda tartımları yapıldıktan sonra, kesilip çok küçük

parçalara ayrılarak, NH_4NO_3 içermeyen, KNO_3 konsantrasyonu ikiye katlanmış MSB sıvı besi ortamına (Davidonis ve Hamilton, 1983; Sakhanokho ve ark.,1998; Sakhanokho ve ark., 2001) (Çizelge 10) aktarılmışlar, çalkalayıcı üzerinde (120 rpm) indirekt ışık koşullarında kültüre alınmışlardır (Şekil 3.4).

Çizelge 3.10. Somatik Embriyogenesis Çalışmalarında Kullanılan Sıvı Kültür, Embriyo Olgunlaştırma ve Embriyo Çimlenmesi İçin Kullanılan Besi Ortamları

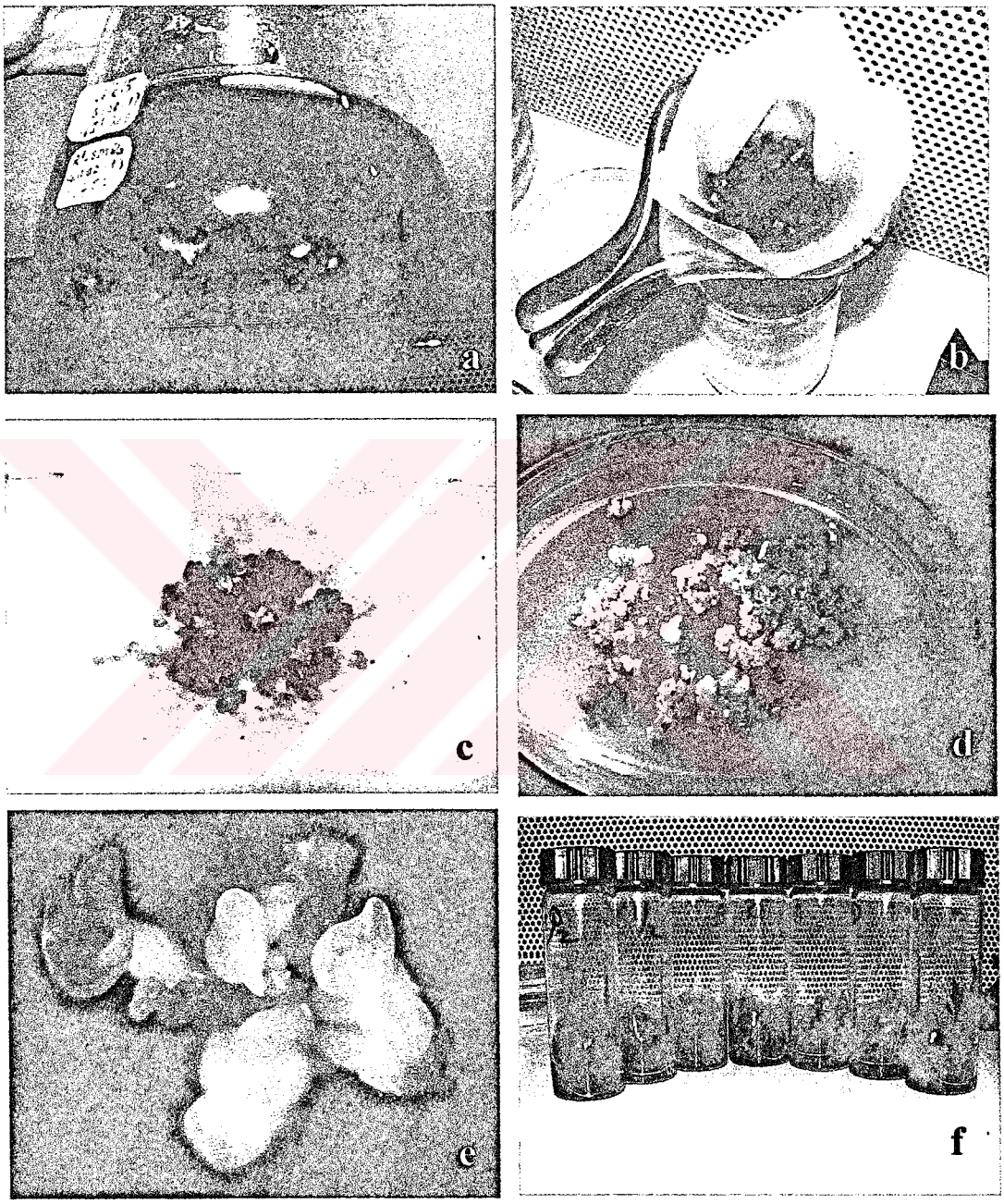
Sıvı Kültür	**Embriyo Geliştirme Ve Olgunlaştırma**	**Embriyo Çimlenmesi ve Köklenmesi**
MS tuzları - NH_4NO_3 + KNO_3 (1.9g/l)	MS tuzları - NH_4NO_3 + KNO_3 (1.9g/l)	MS tuzları
MS organikleri (Glycine + Myo inositol)	MS organikleri (Glycine + Myo inositol)	MS organikleri (Glycine + Myo inositol)
B5 Vitaminleri	B5 Vitaminleri	B5 Vitaminleri
Glukoz (30 g/l)	Glukoz (30 g/l)	Glukoz (30 g/l)
---	---	Glutamine (1 g/l)
---	---	Aktif Karbon (2 g/l)
---	Agar (6 g/l)	Agar (6 g/l)
pH 5.8	pH 5.8	pH 5.8



Şekil 3.4. Somatik Embriyogenesis Çalışmalarında Sıvı Kültür. a.Embriyogenik Kallus, b. Embriyogenik Kallusun Sıvı Kültüre Aktarılması, c. Shaker Üzerinde Sıvı Kültür .

Sıvı besi ortamında genotiplere bağlı olarak 4-8 haftalık kültür süresinin sonunda, embriyoidler içeren materyal steril koşullarda süzülmüştür. Bu amaçla kullanılan steril süzgeç, üzerine delikler açılarak hazırlanmış steril filtre kağıdı konularak kullanılmıştır. Sıvı kültür içindeki materyalle birlikte boşaltılmış, üzerine yeni besi ortamı dökülerek yıkanmış ve süzüldükten sonra filtre kağıdı ile birlikte alınıp bir kaç kat filtre kağıdı üzerine konulup bekletilerek kuruması beklenmiştir (Şekil 3.5). Aynı zamanda süzülen materyalin aktarılacağı embriyo gelişme ortamı içeren petri kutularında besi ortamı üzerine steril filtre kağıdı konulup bekletilerek ortamın fazla nemi alınmıştır. Embriyoidler içeren kalluslar, gelişme ortamı içeren petri kutularına geçirilmiş, besi ortamı üzerine bistüri ile yayılarak yerleştirilmiştir. Petri kutuları parafilmle bantlanmıştır. 4-6 haftalık kültür süresinin sonunda mikroskop altında globular ve ileri dönem embriyo sayımları yapılmıştır. Bu amaçla yaklaşık 1 cm^2'lik karelere ayrılmış petri kutusu kapağı, sayım yapılacak petri üzerine yerleştirilmiş, sayım yapılan kareler işaretlenmiştir. Sayımlar, globular ve ileri dönem embriyoları belirlemek üzere aynı anda, iki farklı numaratör kullanılarak yapılmıştır. Gelişme ortamında torpido ve kotiledon aşamasına gelen embriyolar köklenmeleri için çimlendirme ve köklenme ortamı içeren tüplere aktarılmışlardır. Yapılan ilk gözlemler sonucunda somatik embriyoların tüplere aktarıldıktan sonra tüp içindeki yoğun nem nedeniyle vitrifiye oldukları, gelişemedikleri izlenmiştir. Daha sonraki çalışmalarda somatik embriyoların vitrifiye olmalarını önlemek amacıyla, tüplerde eğik besi ortamı hazırlanmış, yoğunlaşan sıvının eğik yüzeye yerleştirilen somatik embriyo ile teması önlenmiştir. Aynı zamanda tüp tabanına ve eğik ortamın karşısındaki tüp yüzeyine yaslanacak şekilde rulo haline getirilmiş steril kağıt havlu parçaları yerleştirilmiştir. Tabanda biriken sıvıyı çeken kağıt havlu parçaları kültür sırasında 7-10 günde bir kez değiştirilmiştir. Kültüre alınmadan itibaren kallus oluşumu, kallusların çoğaltılması ve somatik embriyoların gelişmesi aşamaları 28°C sıcaklık ve 16 saat fotoperyot ve 2000 lüks ışık koşullarının sağlandığı büyütme dolabında, somatik embriyoların köklenme aşaması ise 28°C sıcaklık, ve 16 saat fotoperyot ve 2000 lüks direkt ışık koşullarının sağlandığı büyütme odasında sürdürülmüştür. Sıvı kültürler, Ç.Ü. Zir. Fak. Bahçe Bitkileri

Bölümü, Biyoteknoloji Laboratuvarında 28°C'de, 16 saat fotoperyot ve indirekt ışık koşullarında inkübe edilmiştir.



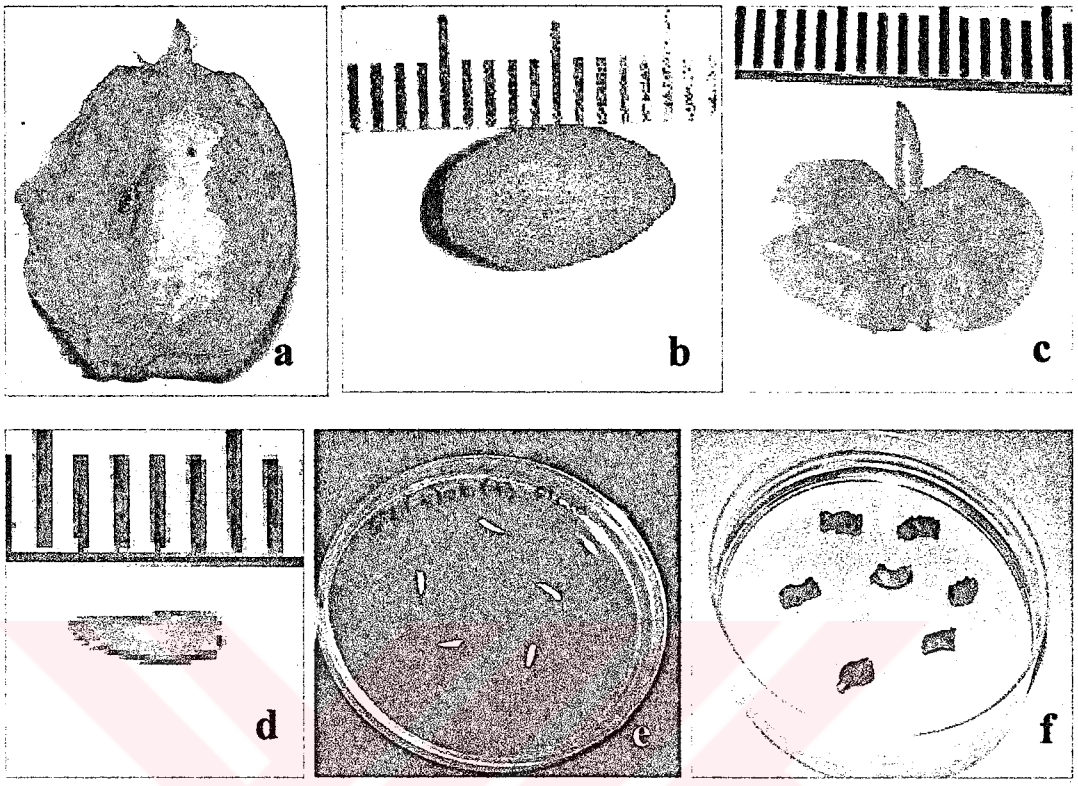
Şekil 3.5. Somatik Embriyogenesis Çalışmalarında Sıvı Kültür Sonrası Uygulamalar. a. Sıvı Kültür, b. Embriyogenik Materyalin Süzülüp Yıkanması, c. Filtre Kağıdı Üzerinde Kurutma, d. Farklı Aşamalarda Embriyo ve Pro-embriyogenik Yapılar İçeren Embriyogenik Mateyalin Gelişme Ortamına Aktarılması, e. İleri Dönem Embriyolar (Torpido ve Kotiledon), f. İleri Dönem Embriyoların Köklendirme Ortamına Aktarılması.

3.2.3.3.(2). Olgunlaşmamış Embriyo Eksplantlarının Hazırlanması ve Kültürü

Eksplantların Hazırlanması : Somatik embriyogenesis çalışmalarının bu bölümünde, Çukurova 1518 çeşidi ile sürdürülen ortam belirleme çalışmasında eksplant olarak tozlanmadan, 14, 21 ve 28 gün sonra hasat edilen kozalardan çıkarılan olgunlaşmamış zigotik embriyolar kullanılmıştır. Üç çeşit ile sürdürülen denemede ise, ortam belirleme denemesinin sonuçları dikkate alınarak 28 günlük embriyolar eksplant olarak kullanılmıştır. Bu amaçla; bitkisel materyal olarak kullanılan Çukurova 1518, Coker 312 ve Erşan 92 pamuk çeşitleri, ÇUTAEM deneme alanında yetiştirilmiştir. Çiçeklenme dönemi boyunca beyaz çiçekler, açma tarihleri belirtilerek etiketlenmiş ve aynı zamanda yabancı döllenmeyi önlemek amacıyla taç yapraklar birleştirilerek bağlanmıştır. Beyaz çiçek açma tarihinden bir gün sonraki tarih tozlanma tarihi olarak kabul edilmiştir. Etiketlerdeki tarihler dikkate alınarak tozlanmadan 14, 21 ve 28 gün sonra kozalar hasat edilmiştir. Kozalar genellikle hasat edildikleri gün buzdolabında bekletilmiş ve ertesi gün embriyolar çıkarılarak kültüre alınmıştır. Yüzey Sterilizasyon uygulanan kozalardan steril koşullarda çıkarılan olgunlaşmamış tohumların tohum kabukları uzaklaştırılmış ve embriyolar çıkarılmıştır. Kotiledon yaprakları kesilerek uzaklaştırılan embriyolar kültüre alınmıştır.

Yüzey Sterilizasyon: Tarladan hasat edilmiş ve bir gece buzdolabında bekletilmiş olan kozaların kabukları hem kabinde çalışmayı kolaylaştırmak, hem de pembekurt zararı olan kozaları elemine etmek amacıyla uzunlamasına şeritler halinde soyulmuş, zarar görmüş çenetler uzaklaştırılmıştır. Geniş kavanozlara konulan kozalara yüzey sterilizasyon uygulanmıştır. Bu amaçla kozalar, önce 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 yıkanmıştır.

Kültür Aşaması: Yüzey Sterilizasyon sonrası olgunlaşmamış tohumlardan tohum kabukları kesilerek embriyolar çıkarılmış, kotiledon yaprakları kesilerek uzaklaştırılmış ve embriyolar, 15 ml besi ortamı içeren 90 X 15 mm boyutlarındaki steril disposable petri kutularında kültüre alınmıştır (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Olgunlaşmamış Embriyoların (28 günlük) Kültüre Alınması. a. Tozlanmadan 28 Gün Sonra Hasat Edilen Kozalar, b. Olgunlaşmamış Tohum, c. Embriyo, d. Kotiledonları Kesilmiş Embriyo, e. Embriyoların Kültüre Alınması, f. Çimlenen Embriyoların Kesilerek Alt Kültüre Alınması

Denemede, içerisinde beş embriyo kültüre alınmış bir petri kutusu deneme ünitesi olarak dikkate alınmış ve her genotip-besi ortamı kombinasyonu üç kez tekrarlanmıştır. Kültürler, 27°C sıcaklık, 16 saat fotoperyot ve 2000 lüks ışık koşullarının sağlandığı inkübasyon dolaplarında inkübe edilmiştir.

İlk 3 haftalık kültür süresinin sonunda kallus indüksiyon oranları belirlenmiştir. Bu aşamada kallus oluşumu başlangıçları dikkate alınmış, ancak bazı ortamlarda ve özellikle sırasıyla 28, ve 21 günlük embriyolar çimlenme eğilimi göstermişlerdir. Bu nedenle çimlenen eksplantlar alt kültüre kesilerek aktarılmış ve alt kültür sırasında kallus indüksiyon ve embriyogenik kallus oranları belirlenmiştir. Bu amaçla kesilerek yeni ortama aktarılan eksplantlarda kallus oluşumu parça sayısı dikkate alınarak belirlenmiş ve her bir petri için % kallus oluşumu olarak uyarlanmıştır. İlk alt kültür aşamasından sonra embriyolar aynı besi ortamlarında alt kültüre alınarak

çoğaltılmıştır (4-6 hafta). Embriyoların kültüre alındıkları erken dönemlerinde sıvı kültür yapma olanağımızın bulunmaması nedeniyle kallusların bir kısmı somatik embriyogenesis için hormonsuz MS besi ortamı içeren petri kutularına aktarılmış, geri kalanında ise alt kültür sürdürülmüştür. Sıvı kültür yapılacağı dönemde, yaklaşık 7 aylık süre boyunca alt kültürde sürdürülmekte olan embriyo kökenli kalluslar, hipokotillere uygulanan şekilde sıvı kültüre aktarılmıştır.

3.2.3. İncelenen Özellikler

3.2.3.1. Anter Kültüründe İncelenen Özellikler

3.2.3.1.(1). Reaksiyon Gösteren Anter Oranı

27°C'de ve karanlık koşullarda büyütme dolabında inkübe edilen anterler bir haftalık periyodlarla binoküler altında incelenmiş, her bir petri için kallus oluşturan anterlerin sayısı belirlenmiştir. Bu sayımlardan yararlanılarak petri kutusu başına reaksiyon gösteren (kallus oluşturan) anterlerin oranı yüzde olarak saptanmıştır.

3.2.3.1.(2). Kallus Büyüklüğü

Denemede kallus büyüklüğü, tepki veren anterlerde oluşan kallus alt kültüre geçirilmeden önce saptanmıştır. Binoküler altında kallusun yayılma alanındaki en geniş iki boyut cetvelle mm cinsinden ölçülerek, besi ortamı üzerinde kapladıkları alan yaklaşık olarak belirlenmiştir. Tepki veren tüm kalluslarda ölçüm yapılmış, elde edilen kallus alanları eksplant sayısına bölünerek genotiplere ve besi ortamlarına göre ortalama kallus alanı mm^2 olarak saptanmıştır.

3.2.3.2. Organogenesiste İncelenen Özellikler

3.2.3.2.(1). Eksplant Reaksiyon Oranı

Kültüre alınan eksplantlarda sürgün oluşumu, eksplant tepkisi olarak kabul edilmiştir. Sürgün oluşturan eksplantların sayımı yapılmış ve bu değerlerden yararlanılarak, eksplant reaksiyon oranları yüzde olarak hesaplanmıştır.

3.2.3.2.(2). Sürgün Rejenerasyon Oranı

Tepki veren eksplantlarda oluşan sürgün sayıları saptanarak, eksplant başına oluşan sürgün sayısı belirlenmiştir.

3.2.3.2.(3). Köklenme Oranı

Rejenerasyon ortamlarında oluşan sürgünlerin uzamaları ve köklenmeleri amacıyla aktarıldıkları büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besi ortamında kök oluşumu gözlenen sürgünlerin sayısı belirlenmiş ve bu sayımlardan yararlanılarak köklenme oranları hesaplanmıştır.

3.2.3.2.(4). Yaşama Oranı

İn vitro koşullarda köklenmiş bitkiler saksılara aktarılmış ve 2-3 ay sonra sera koşullarındaki yaşama oranları belirlenmiştir.

3.2.3.3. Somatik Embriyogenesiste İncelenen Özellikler

3.2.3.3.(1). Kallus İndüksiyon Oranı

Hipokotil eksplantlarında başlangıç kültür süresinin sonunda (4-6 hafta), eksplantlar alt kültüre aktarılırken kallus oluşturan eksplantların sayısı belirlenmiş ve petri kutusu başına kallus oluşturma oranları yüzde olarak saptanmıştır.

Olgunlaşmamış embriyo eksplantlarında ise, bazı besi ortamlarında çimlenme eğilimi gösteren eksplantlar alt kültüre aktarılırken kesilerek aktarılmış ve kültürlerin tamamında alt kültür sırasındaki kallus oluşumları dikkate alınmıştır.

3.2.3.3.(2). Embriyogenik Kallus Oluşturma Oranı

Hipokotil eksplantlarında başlangıç kültür süresinin sonunda (4-6 hafta), eksplantlar alt kültüre aktarılırken embriyogenik [sarımsı yeşil, sarımsı krem, granüler ve kırılgan (+ +)], ve orta derecede embriyogenik özellikte kallus [sarımsı yeşil, orta derecede kırılgan (+)] oluşturan eksplantların sayısı belirlenmiş ve petri kutusu başına ekplantların embriyogenik kallus oluşturma oranları yüzde olarak saptanmıştır. Olgunlaşmamış embriyo eksplantlarında ise bazı besi ortamlarında çimlenme eğilimi gösteren eksplantlar alt kültüre aktarılırken kesilerek aktarılmış ve kültürlerin tamamında alt kültür sırasındaki kallus oluşumları dikkate alınmıştır.

3.2.3.3.(3). Somatik Embriyo Sayısı

Sıvı kültüre aktarılırken miktarları (g) belirlenen kalluslar, sıvı kültür sonrasında gelişme ortamına aktarılmıştır. Gelişme ortamı sonunda embriyoidler içeren embriyogenik kalluslar üzerinde oluşan globular ve ileri dönem embriyo sayıları belirlenmiş, sıvı kültüre aktarılan kallus miktarı (g) dikkate alınarak somatik embriyo / gram kallus olarak değerlendirilmiştir.

3.2.4. Araştırmada Elde Edilen Verilerin Değerlendirilmesi

Anter kültürü ile ilgili denemelerden elde edilen verilere tesadüf bloklarında Bölünmüş Parseller Deneme Deseni'ne (Steel ve Torrie, 1960) ve organogenesis denemesinden elde edilen verilere ise tesadüf bloklarında Bölünen-Bölünen Bölünmüş Parseller Deneme Deseni'ne (Steel ve Torrie, 1960); somatik embriyogenesis yoluyla bitki rejenerasyonu çalışmalarında, ön çalışma olarak tek

çeşitle sürdürülen denemelerde; hipokotillerin eksplant olarak kullanıldığı denemeden elde edilen verilere Bir Faktörlü Tesadüf Blokları Deneme Desenine (Steel ve Torrie, 1960); olgunlaşmamış embriyoların eksplant olarak kullanıldığı denemeden elde edilen verilere ise Bölünmüş Parseller Deneme Deseni'ne uygun olarak MSTATC istatistik programından yararlanılarak varyans analizi uygulanmıştır. Üç çeşit ile sürdürülen somatik embriyogenesis yoluyla bitki rejenerasyonu çalışmalarında sürdürülen denemelerden elde edilen verilere ise Bölünmüş Parseller Deneme Deseni'ne uygun olarak MSTATC istatistik programından yararlanılarak varyans analizi uygulanmıştır. Varyans analizi uygulanmadan önce, reaksiyon gösteren anter oranı, kallus indüksiyon oranı, embriyogenik kallus oranı, sürgün oluşturan eksplant oranı ve köklenme oranı gibi yüzde olarak ifade edilen değerlere $\text{Arcsin}\sqrt{x+0.001}$ transformasyon uygulanmıştır. Kallus ağırlığı başına somatik embriyo sayısı değerlerine ise, $\sqrt{x+0.5}$ transformasyonu uygulanmıştır. Varyans analizinde önemli olduğu saptanan faktör ortalamalarının karşılaştırılmasında; dörde kadar olan ortalamalar için LSD testi, dörtten fazla olan ortalamalar için ise Duncan testi kullanılmıştır.

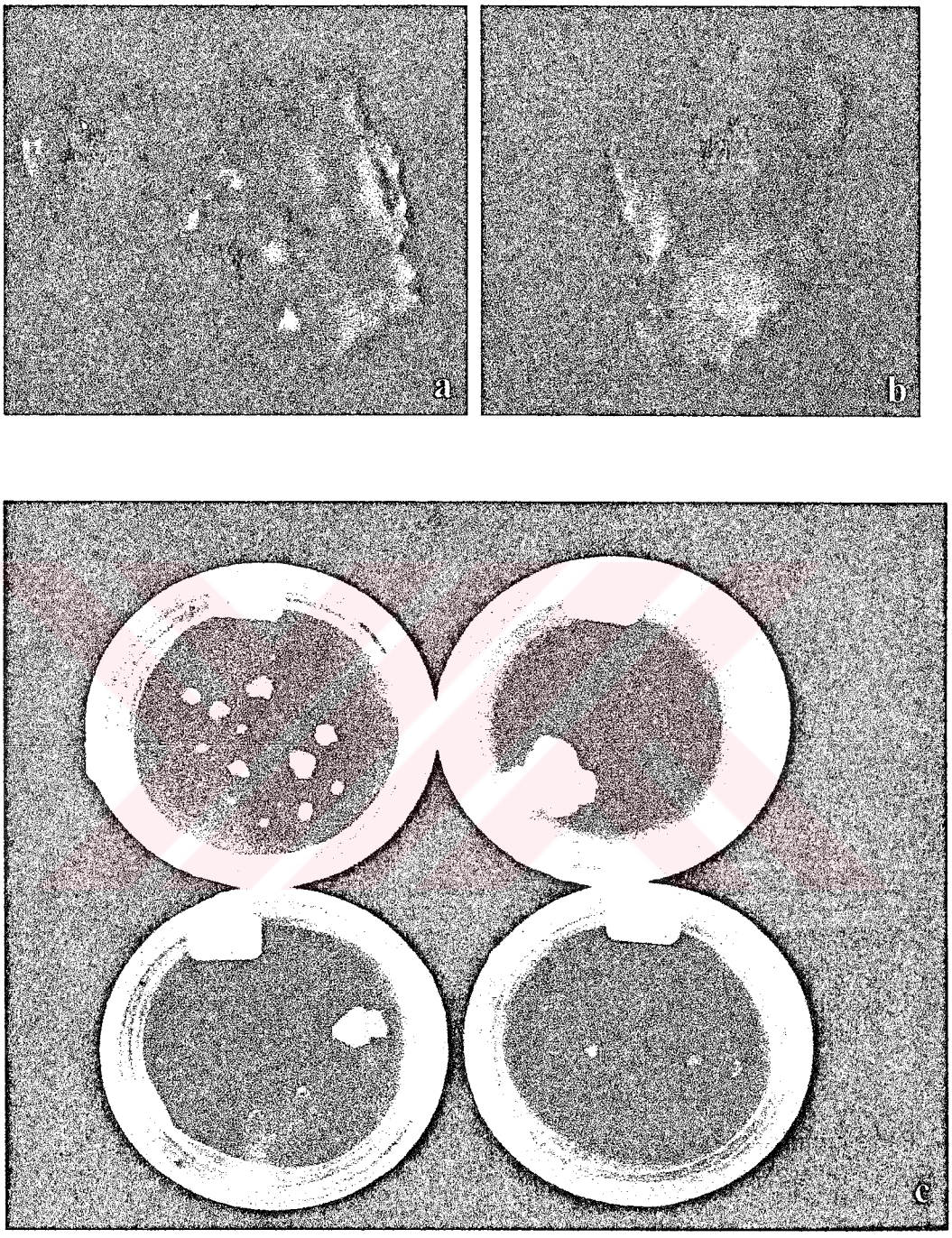
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Anter Kültürü İle İlgili Bulgular ve Tartışma

4.1.1. Kallus İndüksiyonu

Kültüre alınan anterler haftada bir kez binoküler altında incelenmiş ve kültür süresince oluşan değişimler gözlenmiştir. Binoküler altında gözlemler sırasında, anterlerin başlangıçta saydam ve açık krem renkli oldukları gözlenmiştir. Kültür süresi ilerledikçe rengin sırasıyla sarımsı krem, açık ve koyu kahverengine doğru değiştiği, ayrıca saydamlığın azaldığı izlenmiştir. Anterlerden kallus oluşumu anterlerin şişkinleşmesiyle başlamış, daha sonra anterlerin dışına doğru çıkan kallus oluşumu gözlenmiştir . Genel olarak oluşan kallusların krem ve açık sarı renkli, kısmen gevşek yapılı oldukları izlenmiştir (Şekil 4.1). Bu gözlemler, Baluch (1979)'un gözlemleri ile uyum içersindedir.

İncelenen çeşitlerin tamamında tepki oldukça geç başlamış; ilk tepkiler yaklaşık 2.5 ay sonra Erşan 92 çeşidinin, 1, 2 ve 8 nolu besi ortamlarında kültüre alınmış olan anterlerinde şişkinleşme olarak kendisini göstermiştir. Bu çeşidi, Sayar 314 ve Maraş 92 izlemiş; 4. ayda, Adana 98, Nazilli 84 ve Çukurova 1518 çeşitlerinde de şişkinleşme ve kallus başlangıçları gözlenmiştir. Coker 312 çeşidinde ise tüm kültür süresi boyunca 2 nolu besi ortamındaki 2 anterde şişkinleşme dışında hiçbir tepki izlenmemiştir. 5. ayda diğer çeşitlerin kallus indüksiyon oranlarında önemli bir farklılık ortaya çıkmazken, Adana 98 çeşidinin daha önce tepki vermemiş olan anterlerinin büyük bir kısmında özellikle 1, 2, ve 3 nolu ortamlarda yeni tepkiler ve kallus oluşumları izlenmiştir. Kültürde uzun süre kalmış olmalarına rağmen tepki vermemiş olmaları ve söz konusu değişimleri geçirmeleri nedeniyle canlılıklarını yitirdikleri düşünülen bu anterlerden koyu kahverengine dönüşenler dışındekilerden, özellikle Adana 98 çeşidinden büyük oranda tepki alınmıştır. Kültür süresinin uzamasının kallus indüksiyon oranını artırması yönündeki gözlemimiz Zhang ve ark. (1996)'nın bulgularını destekler niteliktedir.



Şekil 4.1. Pamuk Anterlerinden Kallus Oluşumu. a-b Pamuk Anter Kültüründe Kallus İndüksiyonunun Başlangıcı, c. Farklı Besi Ortamlarında Kallus İndüksiyonu.

4.1.1.1 Reaksiyon Gösteren Anter Oranı (%)

Yedi farklı pamuk genotipi anterlerinin dokuz farklı besi ortamında gösterdiği reaksiyon oranlarına uygulanan varyans analiz sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Farklı Pamuk Genotiplerinin Farklı Besi Ortamlarındaki Anter Reaksiyon Oranları ile İlgili Varyans Analiz Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F Değeri
Tekerrür	2	279.760	3.8233
Genotip	6	557.571	7.6200**
Hata 1	12	73.172	
Besi Ortamı	8	480.270	8.8087**
GenotipxB. Ortamı	48	108.055	1.9819**
Hata2	112	0.007	
Genel	188		

** : P≤0.01 hata sınırlar içinde istatistiksel olarak önemli.

Çizelgeden izlendiği gibi, genotipler ve besi ortamları anter reaksiyon oranını istatistiksel olarak önemli derecede etkilemiştir. Ayrıca, genotip x besi ortamı interaksiyonunun istatistiksel olarak önemli olduğu ortaya çıkmıştır.

İncelenen pamuk genotiplerinin dokuz farklı besi ortamındaki anter reaksiyon oranı ortalamaları, Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Anter reaksiyon oranı ortalaması, genotiplere bağlı olarak % 0 ile % 11.1 arasında değişmiştir (Çizelge 4.2). İncelenen genotipler içersinde en yüksek anter reaksiyon oranı ortalaması, % 11.1 ile Adana 98 çeşidinde saptanmıştır. Bu çeşidi % 9.1 ile Erşan 92 çeşidi izlemiştir. Söz konusu iki çeşidin anterleri, incelenen diğer çeşitlerin antrelerine göre istatistiksel olarak önemli derecede daha yüksek reaksiyon oranı ortalaması göstermiştir. Adana 98 ve Erşan 92 çeşidi dışındaki çeşitler, %0 ile % 2.6 arasında değişen ve birbirlerinden istatistiksel olarak farklı olmayan anter reaksiyon oranı ortalamaları göstermişlerdir. Anter reaksiyon oranının genotiplere bağlı olarak farklılık göstermesi ile ilgili bu bulgular, Turaev ve Shamina (1985), Mavromatis ve ark. (1998) ve Zhang ve ark. (1998a)'nın bulgularını destekler niteliktedir.

Çizelge 4.2. Farklı Pamuk Genotiplerinin Farklı Besi Ortamlarındaki Anter Reaksiyon Oranı Ortalamaları (%)

Genotip	Besi Ortamı									Ortalama*
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Çuk.1518	1.7 ef+	3.3 ef	6.7 def	0.0 f	0.0 f	0.0 f	0.0 f	0. 0 f	0.0 f	1.3 B*
Cok. 312	0.0 f	0.0 f	0.0 f	0.0 f	0.0 f	0.0 f	0.0 f	0.0 f	0.0 f	0.0 B
Naz. 84	0.0 f	3.3 ef	5.0 def	1.7 ef	3.3 ef	0.0 f	0.0 f	3.3 ef	1.7 ef	2.0 B
Erş.92	25.0 ab	25.0 ab	10.0 bcdef	3.3 ef	0.0 f	5.0 def	0.0 f	11.7 bcdef	1.7 ef	9.1 A
Adana 98	31.7 a	36.7 a	18.3 abcd	6.7 def	0.0 f	6.7 def	0.0 f	0.0 f	0.0 f	11.1 A
Maraş 92	8.3 cdef	1.7 ef	8.3 cdef	0.0 f	0.0 f	0.0 f	0.0 f	0.0 f	0.0 f	2.0 B
Say. 314	3.3 ef	8.3 cdef	0.0 f	3.3 ef	8.3 cdef	0.0 f	0.0 f	0.0 f	0.0 f	2.6 B
Ortalama.	10.0 A**	11.2 A	6.9 B	2.1 B	1.7 B	1.7 B	0.0 B	2.1 B	0.5 B	4.01

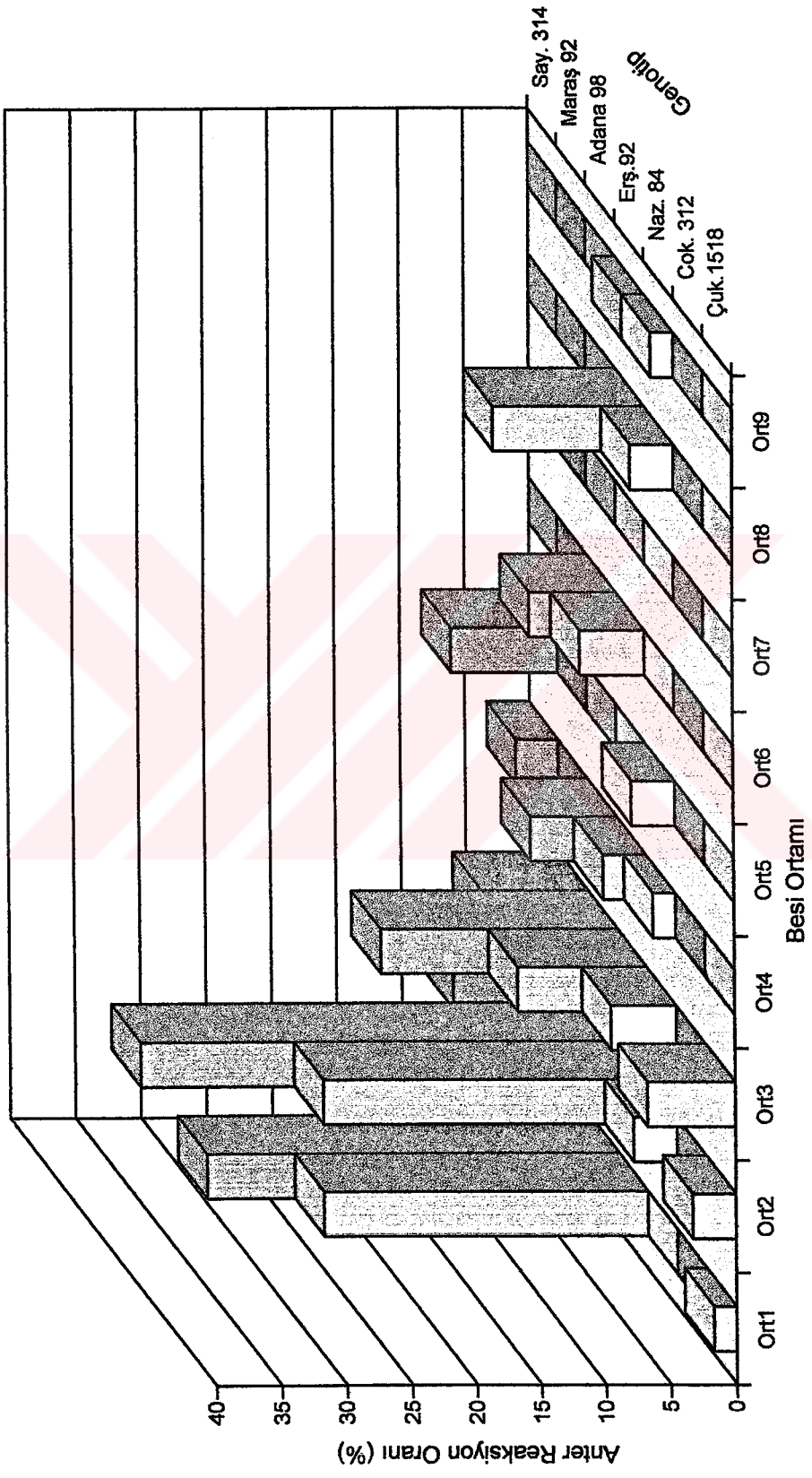
* : Aynı sütun içinde benzer harf ile gösterilen ortalamalar Duncan testine göre P≤0.05 hata sınırları içerisinde istatistiksel olarak farklı değildir.

** : Aynı satır içinde benzer harf ile gösterilen ortalamalar Duncan testine göre P≤0.05 hata sınırları içerisinde istatistiksel olarak farklı değildir.

+ : Benzer harf ile gösterilen Genotip-Besi Ortamı kombinasyonu ortalamaları Duncan testine göre P≤0.05 hat a sınırları içerisinde istatistiksel olarak farklı değildir.

İncelenen besi ortamlarına bağlı olarak, anter reaksiyon oranı ortalaması % 0 ile % 11.2 arasında değişmiştir (Çizelge 4.2). En yüksek anter reaksiyon oranı ortalaması, % 11.2 ile 2 nolu ortamda (0.1 mg/l kinetin+0.5 mg/l 2,4-D içeren MS ortamı) kültüre alınan anterlerde saptanmıştır. Bir nolu ortam (0.1 mg/l kinetin+0.1 mg/l 2,4-D içeren MS ortamı), %10 anter reaksiyon oranı ortalaması ile 2 nolu ortamda elde edilen anter reaksiyon oranı ortalamasından istatistiksel olarak farklı olmayan anter reaksiyon oranı göstermiştir. 3, 4, 5, 6, 7, 8 ve 9 nolu besi ortamlarında elde edilen anter reaksiyon oranı ortalamaları ise birbirlerinden farksız, ancak 1 ve 2 nolu ortamlarda elde edilen değerlerden istatistiksel olarak önemli derecede daha düşük olmuştur. Bu bulgular, MS ortamına ilave edilen 0.1 mg/l'nin üzerindeki kinetin konsantrasyonunun, anter reaksiyon oranını olumsuz yönde etkilediğini, 0.1 mg/l kinetin ile kombine edilen 0.1 mg/l 2,4-D konsantrasyonu 0.5 mg/l'ye çıkartıldığında anter reakisyon oranında önemli bir artış ortaya çıkmadığını göstermektedir. Bu durumda, anter reaksiyon oranı açısından en uygun kinetin-2,4-D kombinasyonunun; 0.1 mg/l kinetin + 0.1 mg/l 2,4-D olduğu söylenebilir. Bu sonuç, *Gossypium klotzschianum* Anderss anter kültüründe en iyi büyüme düzenleyicisini kombinasyonunun 0.1 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l kinetin olduğunu bildiren Zhang ve ark. (1996)'nın bulguları ile kısmen uyum içersindedir.

Araştırmada genotip X besi ortamı interaksiyonunun istatistiksel olarak önemli çıkması, besi ortamlarının anter reaksiyon oranı üzerindeki etkisinin genotiplere bağlı olarak önemli derecede farklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır. Nitekim, Adana 98 ve Erşan 92 çeşitleri dışındaki genotiplerde besi ortamları anter reaksiyon oranında istatistiksel olarak önemli bir farklılık yaratmamıştır (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2). Adana 98 çeşidinde; 1 (0.1 mg/l kinetin + 0.1 mg/l 2,4-D içeren MS ortamı) ve 2 (0.1 mg/l kinetin+ 0.5 mg/l 2,4-D içeren MS ortamı) nolu besi ortamları, 3 nolu ortam (0.1 mg/l kinetin+1 mg/l 2,4-D içeren MS ortamı) dışındaki tüm ortamlardakine göre istatistiksel olarak önemli derecede daha yüksek anter reaksiyon oranı sağlamışlardır. 3 nolu ortam, 1 ve 2 nolu ortamlar yanında, 4 ve 6 nolu ortamlardan (0.5 mg/l kinetin+ 0.1 mg/l 2,4-D içeren MS ortamı ve 0.5 mg/l kinetin+ 1 mg/l 2,4-D içeren MS ortamı) da istatistiksel olarak farklı olmayan anter reaksiyon oranı sağlamıştır. Erşan 92 çeşidinde ise, 1 ve 2 nolu ortamlar, 3 ve 8 nolu (1 mg / l



Şekil 4.2. Farklı Pamuk Genotiplerinde Farklı Besi Ortamlarının Anter Reaksiyon Oranına Etkisi

kinetin+ 0.5 mg/l 2,4-D içeren MS ortamı) ortamlar dışındaki tüm ortamlardakine göre istatistiksel olarak önemli derecede daha yüksek anter reaksiyon oranı sağlamışlardır. 3 ve 8 nolu ortamlarda sağlanan anter reaksiyon oranı ortalamaları, 1 ve 2 nolu ortamlar yanında diğer ortamlarda sağlanan anter reaksiyon oranı ortalamalarından da istatistiksel olarak önemli farklılık göstermemiştir. Farklı kinetin+2,4-D kombinasyonlarını içeren besi ortamlarının farklı genotiplerde anter reaksiyon oranını farklı şekilde etkilemesinin, farklı genotiplerden alınan anterlerin iç hormon içeriklerinin farklı olmasından ileri geldiği söylenebilir (Hatipoğlu, 2002).

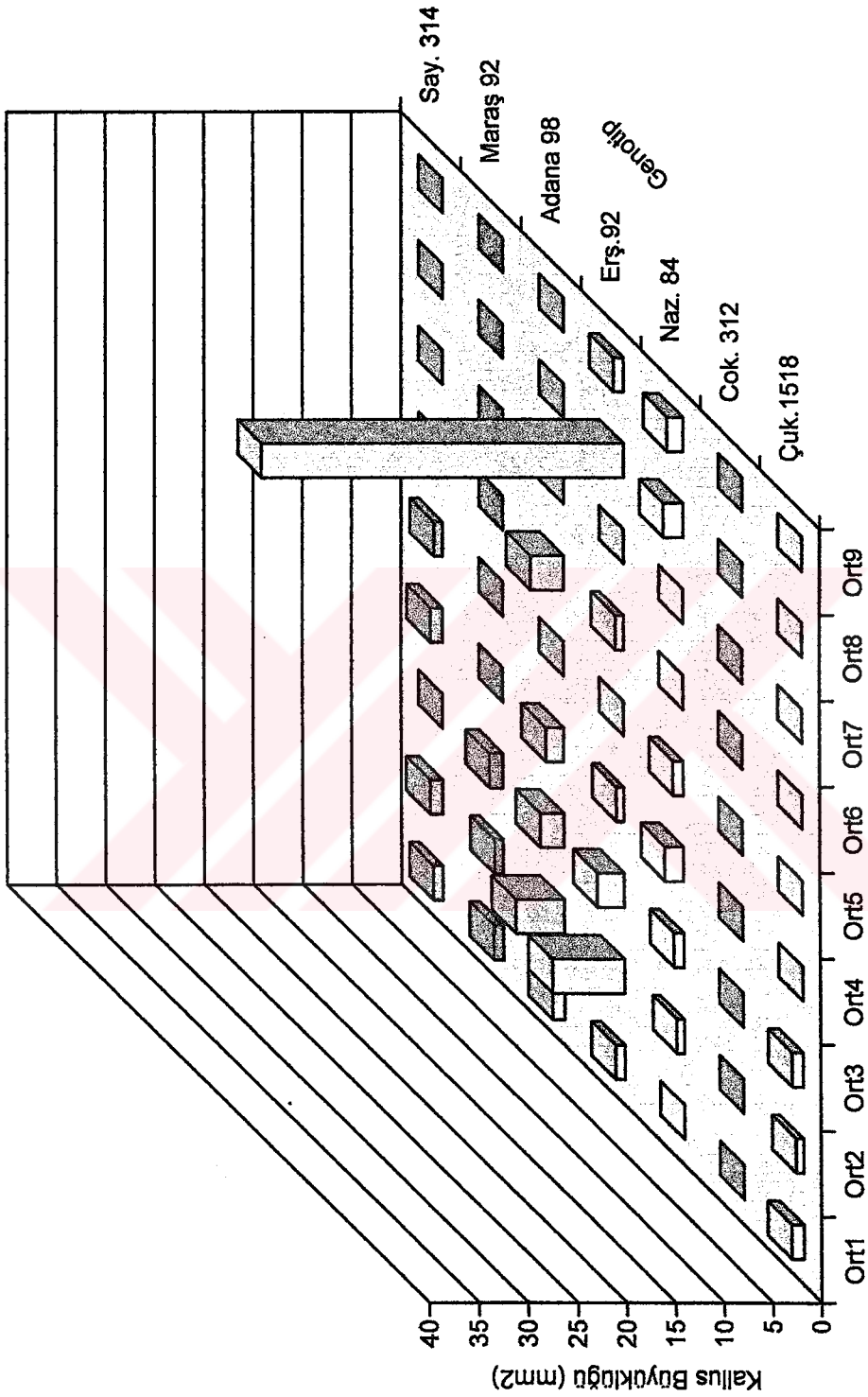
4.1.1.2. Kallus Büyüklüğü

Farklı pamuk genotiplerinin anterlerinden farklı besi ortamlarında oluşan kallus büyüklükleri, Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelgeden izlendiği gibi, incelenen çeşitler arasında en yüksek anter reaksiyon oranı gösteren çeşitlerden birisi olan Adana 98 çeşidinin anterleri en büyük kallusları 2 nolu ortamda (0.1 mg/l kinetin + 0.5 mg/l 2,4-D içeren MS ortamı) göstermiştir. Bir diğer yüksek anter reaksiyon oranına sahip çeşit olan Erşan 92 çeşidinin anterleri ise en büyük kallusları 8 nolu ortamda (1 mg/l kinetin+0.5 mg/l 2,4-D içeren MS ortamı) oluşturmuşlardır (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.3). Genel olarak anterlerden elde edilen kallus miktarlarının azlığı dikkate alınarak rejenerasyon ortamına aktarmadan önce kallus çoğaltma için kullanılacak besi ortamları belirlenmiştir. Bu amaçla, 1, 2 ve 8 nolu besi ortamları ve Adana 98 ve Erşan 92 çeşitlerinin kallusları kullanılarak yapılan bir ön çalışma sonucunda 2 ve 8 nolu ortamların kallus çoğaltma ortamı olarak kullanılması kararlaştırılmıştır. Ön çalışma sonucunda bu ortama aktarılan diğer çeşitlerin ve özellikle Adana 98 çeşidinin kalluslarının, 8 nolu besi ortamında kolaylıkla çoğalabildikleri izlenmiştir. Erşan 92 çeşidi dışında, genel olarak çok düşük indüksiyon tepkisinin elde edildiği bu ortam varolan kallusun çoğalmasında oldukça etkili olmuştur.

Çizelge 4.3. Farklı Pamuk Genotiplerinin Anterlerinden Farklı Besi Ortamlarında Oluşan Kallusların Büyüklükleri (mm^2)

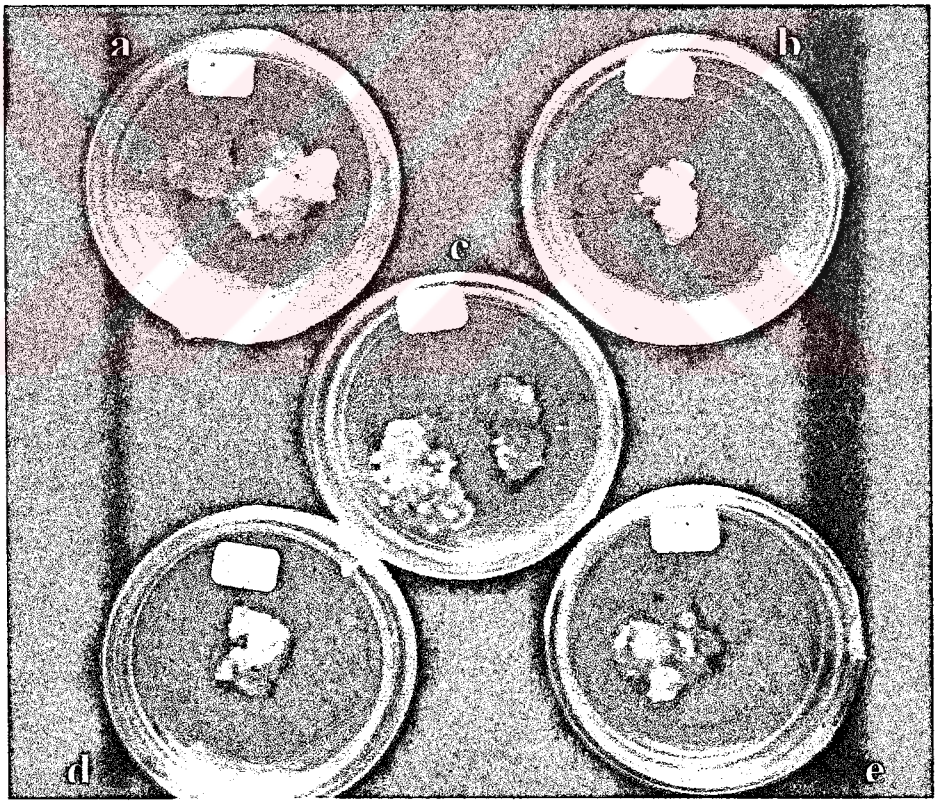
Genotip	Ortalama Kallus Büyüklüğü (mm^2)								
	Besi Ortamı No								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Çuk.1518	1.25	0.75	1.13	---	---	---	---	---	---
Cok. 312	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Naz. 84	---	0.75	1.0	1.88	1.03	---	---	2.0	1.62
Erş.92	0.95	7.3	2.72	0.75	---	0.83	---	36.7	1.0
Adana 98	1.21	4.87	2.38	1.79	---	3.33	---	---	---
Maraş 92	1.01	0.89	1.36	---	---	---	---	---	---
Say. 314	1.0	1.29	---	1.25	0.89	---	---	---	---



Şekil 4.3. Farklı Besi Ortamlarının Farklı Pamuk Genotiplerinin Anterlerinden Oluşan Kallusun Büyüklüğüne Etkisi

4.1.2. Bitki Rejenerasyonu

2 ve 8 nolu indüksiyon ortamlarında 4'er haftalık sürelerle 1, 2 veya 3 kez çoğaltılan kallluslar, rejenerasyon ortamlarına aktarılmıştır. Çoğaltma ortamında bir kez çoğaltıldıktan sonra rejenerasyon ortamına aktarılan kallusların, özellikle 1 nolu rejenerasyon ortamı (0.1 mg/l zeatin+ 0.1 mg/l IAA içeren MS ortamı) ve 4 nolu rejenerasyon ortamında (0.1 mg/l PBA + 0.1 mg/l IAA içeren MS ortamı) açık sarı kısmen kırılgan ve az miktarda granüler bölgeler içeren embriyogenik kallusa benzer yapıya dönüştüğü izlenmiş, ancak rejenerasyon ortamında iki alt kültür daha yapılmasına rağmen embriyoid veya embriyo benzeri herhangi bir yapı gözlenmemiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Anter Kültüründe Farklı Çoğaltma Ortamlarında Elde Edilen Kallusların Farklı Rejenerasyon Ortamlarındaki Tepkileri. a ve e. 2 Nolu Besi Ortamında Çoğaltılmış Olan Kallusların R1 Besi Ortamındaki Kallus Gelişimi, b. 8 Nolu Besi Ortamında Çoğaltılmış Olan Kallusların R4 besi Ortamındaki Kallus Gelişimi, c ve d 8 nolu besi ortamında çoğaltılmış Olan Kallusların R1 besi ortamındaki Kallus Gelişimleri.

Ayrıca, denemenin son döneminde çoğaltma ortamında üç kez çoğaltılmış kalluslar, 5 nolu ortama (0.1 mg/l zeatin + 0.1 mg/l IAA içeren, ancak şeker içermeyen MS ortamı) aktarılmış, ancak bu ortamda da herhangi bir embriyo oluşumu veya bitki rejenerasyonu gerçekleşmemiştir. Kalluslar bu ortamda daha kompaktlaşmışlar, bir kısmı çok açık yeşil renkli yapı oluşturmuşlardır. Sonuç olarak, özellikle üç kez çoğaltma ortamında kültür edilen kallusların kültürde uzun süre kalmaları sonucunda embriyogenik kapasitenin düştüğü gözlenmiştir. Pamuk anterlerinden oluşan kallustan bitki rejenerasyonunun gerçekleşmemesi ile ilgili bulgularımız, daha önce pamuk anter kültürü konusunda çalışan bir çok araştırıcının (Turaev ve Shamina, 1985; Mavromatis ve ark., 1998; Zhang ve ark., 1998a) bulgularını desteklemektedir.

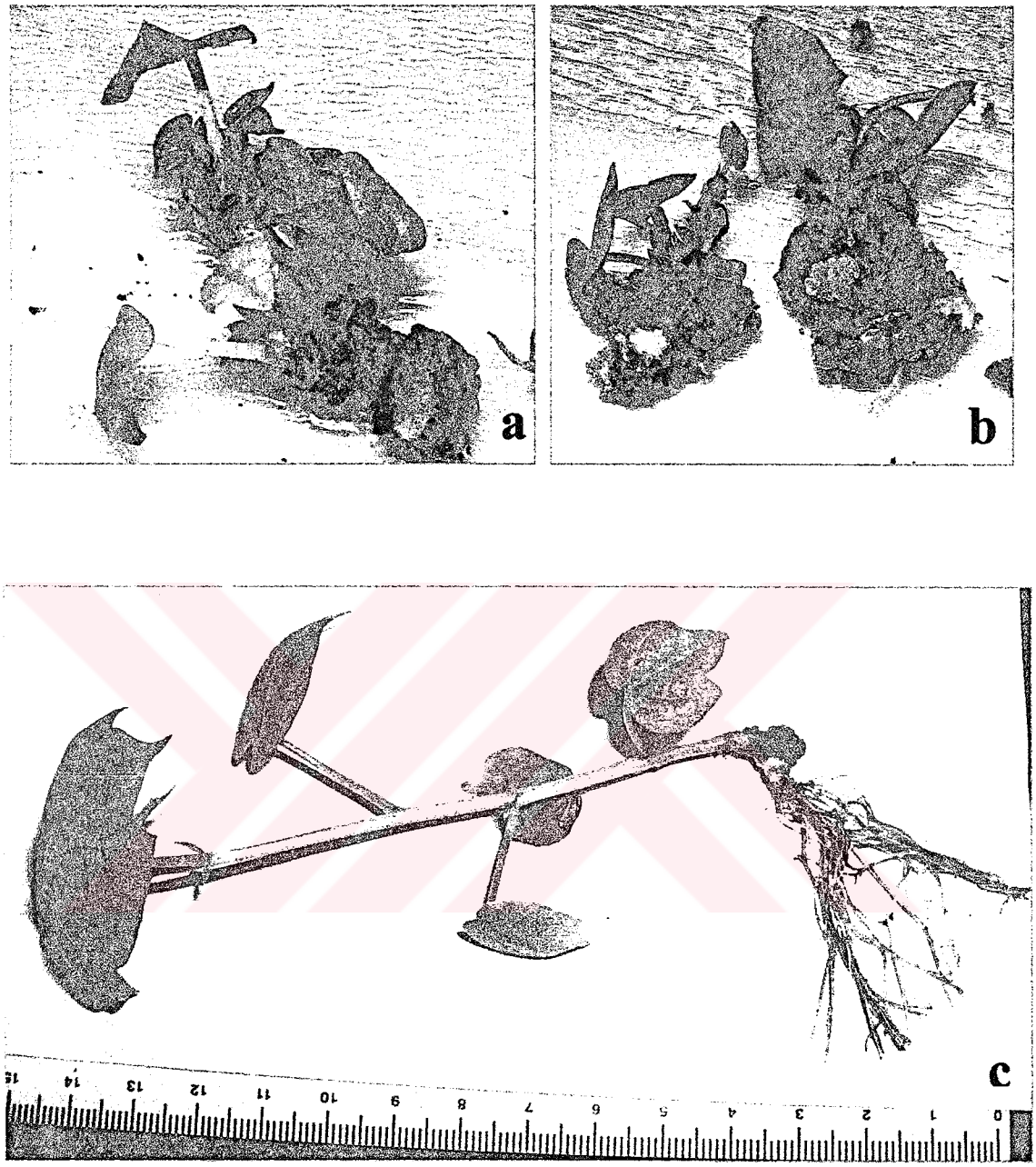
4.2. Organogenesis Araştırması İle İlgili Bulgular ve Tartışma

4.2.1 Sürgün Rejenerasyonu

Organogenesis çalışmaları sırasında eksplant kaynağı olarak kullanılan *in vitro* fidelerin elde edilmesi için Nazilli Pamuk Araştırma Enstitüsü'nden sağlanan tohumlar Materyal ve Metod bölümünde verilen yöntem uyarınca sterilize edilerek çimlendirilmiştir. Ancak, çalışmanın ikinci aşamasında Nazilli Pamuk Araştırma Enstitüsü yerine Çukurova Tarımsal Araştırma Enstitüsü deneme alanından elde edilen Coker 312 tohumları kulanılmıştır. Bu tohumların çimlendirilmeleri sırasında uygulanan rutin yüzey sterilizasyon yöntemi yetersiz kalmış (yetişme sezonunda yoğun olan pembe kurt *Pechtinophora gossypiella* Saund. zararı nedeniyle), tohumların % 80 oranında kontamine oldukları gözlenmiştir. Aynı kirli tohumlar kullanılarak bir dizi yüzey sterilizasyon denemesi yapılmış ve aşırı kirli materyalle çalışılması durumunda kontaminasyonu önlemek amacıyla Materyal ve Metod bölümünde verilen iki aşamalı yüzey sterilizasyon yönteminin uygulanması kararlaştırılmıştır. Farklı kaynaklardan elde edilen tohumlardan kontaminasyon yönünden farklı sonuçlar alınması ile ilgili gözlemlerimiz, çimlendirme sırasında kontamine olmayan fidelerin oranının tohum örneğine ve genotiplere göre farklılık

gösterdiğini ve ilk kültür aşamasında kaybedilen dokuların çoğunluğunun tohumdan kaynaklanan kontaminasyona bağlı olabileceğini bildiren Gould ve ark. (1991)'nın gözlemleri ve pamuk tohumlarının dezenfeksiyonunun iç enfeksiyon nedeniyle zor olduğunu, çeşide ve ürünün elde edildiği yıla göre dezenfeksiyon etkinliğinin farklılık gösterdiğini belirten Zapata ve ark. (1999)'nın gözlemlerini desteklemektedir.

Kültür başlangıcından itibaren yapılan periyodik gözlemlerde sürgün uçları ve kotiledon nodlarında oluşan farklılaşmalar saptanmıştır. İlk hafta içinde besi ortamlarına ve eksplantlara göre değişmekle birlikte ilk sürgün oluşumlarının başladığı saptanmış ve ilk sürgünler 8 nolu besi ortamında (büyüme düzenleyicisi içermeyen MSB besi ortamı) kültüre alınmış olan sürgün uçlarında gözlenmiştir. Kültürdeki ilk iki hafta içinde eksplant tabanlarında yoğun fenolik bileşik oluşumları, büyüme düzenleyicisi içeren ortamların hepsinde saptanırken, 8 nolu besi ortamında (büyüme düzenleyicisi içermeyen MSB ortamı) görülmemiştir. Aynı zamanda oluşan sürgünlerin ilk yapraklarının önce renklerinin sarardığı, daha sonra kahverengileşerek bir kısmının döküldükleri gözlenmiştir. Bu durumun büyütme odasında ışıklı saatlerde sıcaklığın artışından kaynaklanabileceği düşünülmüş, ancak söz konusu sorunun 8 nolu besi ortamında (büyüme düzenleyicisi içermeyen MSB ortamı) çok az miktarda veya hiç gözlenmemiş olması, bizi konunun yine büyüme düzenleyiciler açısından incelenmesi gerekliliğine yönlendirmiştir. Kültürün ilerleyen dönemlerinde büyüme düzenleyicisi içeren besi ortamlarında eksplant tipine ve büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyonlarına bağlı olarak hemen hepsinde sürgün çevresinde kallus oluşumu (çoğunlukla kırmızımsı renkli ve yumuşak yapılı) gözlenmiştir (Şekil 4.5). Büyüme düzenleyicisi içermeyen 8 nolu MSB besi ortamında hem kallus oluşumunun, hem de fenolik bileşiklerin görülmemesi, rejenerasyonu engelleyen ve yavaşlatan olumsuz gelişmelerin büyüme düzenleyicilerinden kaynaklandığı izlenimini vermiştir. Kültürde fenolik bileşiklerin zararının önlenmesi amacıyla besi ortamlarına PVP eklenmesi, kültüre alınan materyale antioksidant solusyonu uygulanması ve eksplantların besi ortamı üzerinde yerlerinin değiştirilmesini içeren bir dizi ön çalışma yapılmıştır. Bu amaçla besi ortamlarına 1 g/l PVP eklenmiş; antioksidant uygulaması için eksplantlar, filtre



Şekil 4. 5. Organogenesis Çalışmalarında Sürgün Oluşumu, a. 1 Nolu Besi Ortamında Çoğalan Sürgün, b. Hormonlu Besi Ortamlarında Tabanda Kallus Oluşumu, c. Hormonsuz MSB Besi Ortamında Köklenen Sürgün

sterilizasyonu uygulanmış antioksidant karışımı [L-Ascorbic acid (0.1 g/l) + Citric Acid (0.15 g/l)] içinde 10 dakika bekletilerek kültüre alınmışlar veya tabanında fenolik bileşik oluşan sürgünler 2 haftada bir kez yine aynı besi ortamının temiz bir bölgesine aktarılmışlardır. Birlikte ve ayrı ayrı değerlendirilen söz konusu ön çalışmaların sonucunda eksplantların iki haftada bir kez besi ortamındaki yerlerinin değiştirilmesinin en etkin ve kolay yöntem olduğu belirlenmiş ve büyüme düzenleyicisi içeren besi ortamlarında uygulanmıştır. Fenolik bileşik oluşumunun gözlenmediği 8 nolu besi ortamında ise buna ihtiyaç duyulmamıştır. Ayrıca, 8 nolu besi ortamında sürgünlerin sağlıklı şekilde geliştikleri, kültür sırasında (bazen ilk kültür aşamasında çoğunlukla ilk alt kültürde) kendiliğinden kök oluşturdukları gözlenmiştir (Şekil 4.5).

Sürgün ucu ve kotiledon nodlarından sürgün oluşumu sırasındaki yukarıda belirtilen gözlemler, Bajaj ve Gill (1986), Gould ve ark. (1991), Zapata ve ark. (1999) ve Bajrovic ve ark. (2001)'nın gözlemleri ile uyum içerisindedir.

4.2.1.1. Eksplant Reaksiyon Oranı (%)

Çukurova 1518, Coker 312 ve Erşan 92 pamuk çeşitlerinin 2 ve 5 haftalık *in vitro* fidelerinden elde edilen sürgün ucu ve kotiledon nodu eksplantlarının 8 farklı besi ortamında sürgün oluşturma oranı (eksplant reaksiyon oranı) değerlerine uygulanan varyans analizi sonuçları, Çizelge 4.4.'te verilmiştir.

Çizelge'den izlendiği gibi besi ortamları eksplant reaksiyon oranını istatistiksel olarak önemli derecede etkilemiş, denemede incelenen diğer faktörlerin eksplant reaksiyon oranı üzerindeki etkileri ise istatistiksel olarak önemli çıkmamıştır.

Reaksiyon gösteren eksplant oranı, besi ortamlarına bağlı olarak % 66.7 ile % 94.4 arasında değişmiştir (Çizelge 4.5). En yüksek reaksiyon gösteren eksplant oranı ortalaması, % 94.4 ile 8 nolu ortamda (Büyüme düzenleyicisi içermeyen MSB ortamı) elde edilmiştir. 1 (2 mg/l BAP+2 mg/l kinetin içeren MSB ortamı), 2 (2 mg/l BAP + 2 mg/l zeatin içeren MSB ortamı), 3 (2 mg/l kinetin + 2 mg/l zeatin içeren

Çizelge 4.4. Farklı Pamuk Genotiplerinin Farklı Yaştaki *İn Vitro* Fidelerinden Elde Edilen Farklı Eksplantların Farklı Besi Ortamlarındaki Eksplant Reaksiyon Oranlarına (%) İlişkin Varyans Analiz Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F Değeri
Tekerrür	2	82.581	0.3145
Genotip	2	584.364	2.2252
Hata 1	4	262.614	
Eksplant Yaşı	1	64.720	0.1299
Genotip x Eks Yaşı	2	82.581	0.1658
Hata 2	6	498.223	
Eksplant	1	854.454	1.7912
Genotip x Eksplant	2	446.746	0.9365
Eks Yaşı x Eksplant	1	1192.155	2.4992
Genotip x Eks Yaşı x Eksplant	2	111.164	0.2330
Besi Ortamı	7	2460.672	5.1584**
Genotip x Besi Ortamı	14	349.355	0.7324
Eks Yaşı x Besi Ortamı	7	381.092	0.7989
Genotip x Eks Yaşı xBesi Ortamı	14	212.036	0.4445
Eksplant x Besi Ortamı	7	401.361	0.8414
Genotip x Eksplant x Besi Ortamı	14	333.927	0.7000
Eks Yaşı x Eksplant x Besi Ortamı	7	446.879	0.9368
Genotip x Eks Yaşı x Eksplant x Besi Ortamı	14	144.436	0.3028
Hata 3	180	477.024	
Genel	287		

**:P≤0.01 hata sınırlar içinde istatistiksel olarak önemli.

MSB ortamı), 4 (2 mg/l PBA içeren MSB ortamı) ve 5 nolu ortam (4 mg/l PBA içeren MSB ortamı) 8 nolu ortamdan istatistiksel olarak farklı olmayan eksplant reaksiyon oranı ortalaması göstermişlerdir. 6 (2 mg/l kinetin+0.5 mg/l IAA içeren MSB ortamı) ve 7 nolu ortam (0.5 mg/l kinetin+0.5 mg/l IAA+ 0.1 mg/l GA3 içeren MSB ortamı) ise birbirlerinden istatistiksel olarak farklı olmayan, ancak diğer ortamlara göre istatistiksel olarak önemli derecede daha düşük eksplant reaksiyon oranı göstermişlerdir.

Araştırmada, 8 nolu ortamda en yüksek eksplant reaksiyon oranı elde edilmesi ile ilgili bulgu, aynı ortamda genotipe bağımlı olmaksızın en yüksek eksplant

Çizelge. 4.5. Farklı Pamuk Genotiplerinin 2 ve 5 Haftalık Fidelerinden Alınan Sürgün Ucu ve Kotiledon Nodu Eksplantlarının Farklı Besi Ortamlarında Eksplant Reaksiyon Oranı (%) Ortalamaları

Genotip	Eksplant Yaşı	Eksplant	Besi Ortamı No								Ort
			Ort1	Ort2	Ort3	Ort4	Ort5	Ort6	Ort7	Ort8	
Çukurova 1518	2 Hafta	S.Ucu	83.3	83.3	83.3	83.3	83.3	83.3	83.3	100.0	85.4
		K.Nodu	83.3	83.3	83.3	83.3	66.7	50.0	83.3	100.0	79.2
	5 Hafta	S.Ucu	100.0	83.3	83.3	100.0	100.0	66.7	100.0	100.0	91.7
		K.Nodu	83.3	100.0	83.3	66.7	100.0	50.0	66.7	83.3	79.2
Coker 312	2 Hafta	S.Ucu	83.3	83.3	83.3	83.3	83.3	66.7	50.0	100.0	79.2
		K.Nodu	83.3	83.3	83.3	83.3	83.3	83.3	66.7	83.3	81.3
	5 Hafta	S.Ucu	66.7	66.7	100.0	100.0	100.0	50.0	66.7	100.0	81.3
		K.Nodu	66.7	83.3	83.3	83.3	83.3	66.7	66.7	83.3	77.1
Erşan 92	2 Hafta	S.Ucu	83.3	83.3	83.3	83.3	83.3	83.3	50.0	100.0	81.3
		K.Nodu	100.0	100.0	83.3	100.0	83.3	66.7	66.7	100.0	87.5
	5 Hafta	S.Ucu	100.0	83.3	83.3	83.3	83.3	83.3	100.0	100.0	89.6
		K.Nodu	100.0	100.0	100.0	83.3	83.3	50.0	50.0	83.3	81.3
Ortalama			86.1 a+	86.1 a	86.1 a	86.1 a	86.1 a	66.7 b	70.8 b	94.4 a	

+) Aynı satır içerisinde benzer harf ile gösterilen ortalamalar Duncan testine göre P≤0.05 hata sınırları içerisinde birbirinden farksızdır.

reaksiyon oranını elde eden Wu ve She (1990)'nın bulgularını desteklemektedir. Ayrıca, Zapata ve ark. (1999)'nın bulguları da bu bulgumuz ile uyum içersindedir. Diğer taraftan, Bajaj ve Gill (1986)'ın bizim araştırmamızda da incelenen 6 nolu ortamda elde ettiği eksplant reaksiyon oranı değerleri (41.6-72.7), bu araştırmada elde edilen eksplant reaksiyon oranı değeri (% 66.7) ile uyumluluk göstermektedir. Yine, Bajrovic ve ark. (2001)'nın 2 mg/l kinetin+ 2mg/l zeatin veya 2 mg/l BAP+ 2mg/l zeatin içeren MS ortamında en yüksek eksplant reaksiyon oranı elde etmeleri ile ilgili bulguları da bulgularımızla uyum içersindedir.

Araştırma bulguları, eksplant reaksiyon oranının genotip, eksplant yaşı ve eksplant tipine bağlı olarak % 77.1 ile % 91.7 arasında değiştiğini göstermiştir (Çizelge 4.5). Ancak, bu değişimin istatistiksel açıdan önemli olmadığı ortaya çıkmıştır. Bu bulgular, eksplant reaksiyon oranının genotiplere bağlı olarak değiştiğini belirten Wu ve She (1990), Gupta ve ark. (1997) ve Momtaz (1998)'ın bulguları ile eksplant reaksiyon oranının genotip ve eksplant yaşına bağlı olarak değiştiğini bildiren Mandeswar (1995)'in bulguları ile çelişmektedir. Bu çelişkiye, neden olarak araştırmalarda kullanılan genotipler ve eksplantların alındığı fidelerin yetişme koşulları ile ilgili olarak eksplantların kültüre alındıkları sıradaki fizyolojik durumlarının farklılığı gösterilebilir.

4.2.1.2. Sürgün Rejenerasyon Oranı (Sürgün Sayısı/Eksplant)

Çukurova-1518, Coker 312 ve Erşan 92 pamuk çeşitlerinin 2 ve 5 haftalık *in vitro* fidelerinden elde edilen sürgün ucu ve kotiledon nodu eksplantlarının, kültüre alındıkları 8 farklı besi ortamında saptanan sürgün rejenerasyon oranlarına (sürgün sayısı/eksplant) ilişkin varyans analiz sonuçları, Çizelge 4.6.'da verilmiştir.

Çizelgeden izlendiği gibi, genotip, eksplant yaşı, eksplant tipi ve besi ortamı, sürgün rejenerasyon oranını istatistiksel olarak önemli derecede etkilemiştir. Ayrıca, genotip X besi ortamı interaksiyonu ve eksplant X besi ortamı interaksiyonlarının istatistiksel olarak önemli olduğu ortaya çıkmıştır.

Sürgün rejenerasyon oranı, genotiplere bağlı olarak, 1.28 sürgün/eksplant ile 1.70 sürgün/eksplant arasında değişmiştir (Çizelge 4.7). İncelenen genotipler arasında en yüksek sürgün rejenerasyon oranı ortalamasını 1.70 sürgün/eksplant ile

Çizelge 4.6. Farklı Pamuk Genotiplerinin Farklı Yaştaki *İn Vitro* Fidelerinden Elde Edilen Farklı Eksplantların Farklı Besi Ortamlarındaki Sürgün Rejenerasyon Oranlarına (Sürgün Sayısı/Eksplant) İlişkin Varyans Analiz Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F Değeri
Tekerrür	2	0.558	2.8079
Genotip	2	5.428	27.3057**
Hata 1	4	0.199	
Eksplant Yaşı	1	2.531	12.9600*
Genotip x Eks Yaşı	2	0.148	0.7600
Hata 2	6	0.195	
Eksplant Tipi	1	3.781	11.2345**
Genotip x Eksplant	2	0.471	1.4004
Eks Yaşı x Eksplant	1	0.681	2.0220
Genotip x Eks Yaşı x Eksplant	2	0.199	0.5906
Besi Ortamı	7	13.329	39.6031**
Genotip x Besi Ortamı	14	0.982	2.9162**
Eks Yaşı x Besi Ortamı	7	0.190	0.5645
Genotip x Eks Yaşı xBesi Ortamı	14	0.135	0.3998
Eksplant x Besi Ortamı	7	0.928	2.7574**
Genotip x Eksplant x Besi Ortamı	14	0.207	0.6164
Eks Yaşı x Eksplant x Besi Ortamı	7	0.228	0.6779
Genotip x Eks Yaşı x Eksplant x Besi Ortamı	14	0.121	0.3607
Hata 3	180	0.337	
Genel	287		

* : P≤0.05 hata sınırlar içinde istatistiksel olarak önemli.
** : P≤0.01 hata sınırlar içinde istatistiksel olarak önemli.

Erşan 92 çeşidi göstermiştir. Çukurova 1518 çeşidi ise, 1.68 sürgün/eksplant ile Erşan 92 çeşidinden istatistiksel olarak farklı olmayan bir sürgün rejenerasyon oranı göstermiştir. Coker 312 çeşidi, hem Çukurova 1518 ve hem de Erşan 92 çeşidinden istatistiksel olarak önemli derecede daha düşük sürgün rejenerasyon oranı ortalaması (1.28 sürgün/eksplant) göstermiştir. Sürgün rejenerasyon oranının genotiplere bağlı olarak değişmesi, genotiplerin rejenerasyon kapasitelerinin farklı olduğunu ortaya koymaktadır. Bu bulgular, Momtaz (1998) ve Gupta ve ark. (1997),'ın bulgularını desteklemektedir.

Sürgün rejenerasyon oranı, besi ortamlarına bağlı olarak 0.82 sürgün/eksplant ile 2.63 sürgün/eksplant arasında değişmiştir (Çizelge 4.7). İncelenen ortamlar

Çizelge. 4.7. Farklı Pamuk Genotiplerinin 2 ve 5 Haftalık Fidelerinden Alınan Sürgün Ucu ve Kotiledon Nodu Eksplantlarının Farklı Besi Ortamlarında Sürgün Rejenerasyon Oranı (Sürgün Sayısı/Eksplant) Ortalamaları

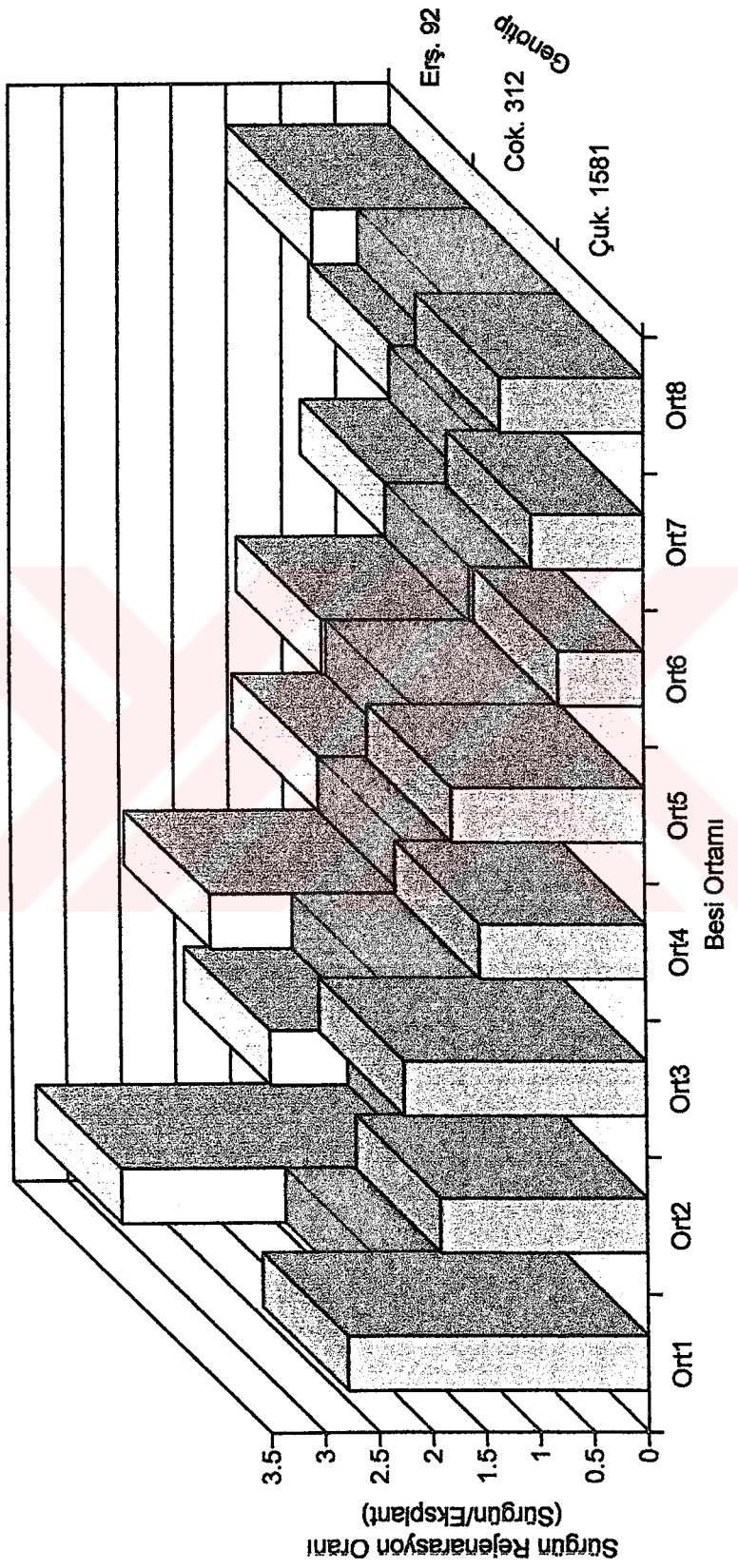
Genotip	Eksplant Yaşı	Eksplant	Besi Ortamı No								Ort
			Ort1	Ort2	Ort3	Ort4	Ort5	Ort6	Ort7	Ort8	
Çukurova 1518	2 Hafta	S.Ucu	2.83	2.00	2.33	1.17	1.67	1.00	0.83	1.33	1.65
		K.Nodu	2.50	1.83	1.83	1.50	1.17	0.50	1.17	1.17	1.46
	5 Hafta	S.Ucu	3.67	2.00	2.67	2.33	2.67	0.83	1.17	1.50	2.10
		K.Nodu	2.17	1.83	2.17	1.17	1.67	0.83	1.00	1.33	1.52
	Ortalama		2.79 b+	1.92 de	2.25 cd	1.54 e-h	1.79 d-f	0.79 ıj	1.04 h-j	1.33 f-ı	1.68 A*
Coker 312	2 Hafta	S.Ucu	2.33	1.33	1.83	1.17	1.50	0.67	0.50	1.17	1.31
		K.Nodu	1.33	1.17	1.33	1.33	1.17	1.17	0.83	0.83	1.15
	5 Hafta	S.Ucu	2.17	1.17	2.17	1.83	1.67	0.67	0.67	1.17	1.44
		K.Nodu	1.33	1.17	1.50	1.50	1.17	0.83	1.17	1.17	1.23
	Ortalama		1.79 d-f	1.21 g-j	1.71e-g	1.46 e-h	1.38 e-h	0.83 ıj	0.79 j	1.08 h-j	1.28 B
Erşan 92	2 Hafta	S.Ucu	3.17	1.67	2.50	1.33	1.17	1.00	0.67	1.50	1.63
		K.Nodu	2.83	2.00	2.00	1.67	1.33	0.67	0.67	1.50	1.58
	5 Hafta	S.Ucu	4.17	1.83	2.83	1.33	1.50	1.00	1.00	1.50	1.90
		K.Nodu	3.00	2.17	2.50	1.50	1.67	0.67	0.67	1.50	1.71
	Ortalama		3.29 a	1.92 de	2.46 bc	1.46 e-h	1.42 e-h	0.83 ıj	0.75 j	1.50 e-h	1.70 A
Ortalama			2.63A**	1.68 C	2.14 B	1.49 CD	1.53 CD	0.82 E	0.86 E	1.31 D	
Eksplant Yaşı	2 Hafta										1.46 B[1]
	5 Hafta										1.65 A
Eksplant	S.Ucu		3.06 a[3]	1.67 de	2.39 b	1.53 de	1.69 de	0.86 fg	0.81 g	1.36 e	1.67 A[2]
	K. Nodı		2.19 bc	1.69 de	1.89 cd	1.44 e	1.36 e	0.78 g	0.92 fg	1.25 ef	1.44 B

+) Benzer harf ile gösterilen Genotip-Besi Ortamı kombinasyonu ortalamaları Duncan testine göre P≤0.05 hata sınırları içerisinde birbirinden farksızdır.
*) Benzer Harf ile gösterilen Genotip Ortalamaları LSD testine göre P≤0.05 hata sınırları içerisinde birbirinden farksızdır.
**) Benzer Harf ile gösterilen Besi Ortamı Ortalamaları Duncan testine göre P≤0.05 hata sınırları içerisinde birbirinden farksızdır
[1]) Benzer Harf ile gösterilen Eksplant Yaşı Ortalamaları P≤0.05 hata sınırları içerisinde birbirinden farksızdır
[2]) Benzer Harf ile gösterilen Eksplant Tipi Ortalamaları P≤0.05 hata sınırları içerisinde birbirinden farksızdır
[3]) Benzer harf ile gösterilen Eksplant- Besi Ortamı kombinasyonu ortalamaları Duncan testine göre P≤0.05 hata sınırları içerisinde birbirinden farksızdır.

içersinde en yüksek sürgün rejenerasyon oranı 2.63 sürgün/eksplant ile 1 nolu ortamdan (2 mg/l kinetin+2 mg/l BAP içeren MSB ortamı) elde edilmiştir. Yapılan Duncan testi karşılaştırmaları, bu ortamda elde edilen sürgün rejenerasyon oranı ortalamasının, incelenen diğer tüm ortamlarda elde edilen sürgün rejenerasyon oranı ortalamalarından istatistiksel olarak önemli derecede daha yüksek olduğunu göstermiştir. Bu sonuç, sürgün uçlarından en yüksek sürgün rejenerasyon oranını 2.5 mg/l kinetin+ 2.5 mg/l BAP içeren MS ortamında elde ettiklerini bildiren Agrawal ve ark. (1997)'nın bulgularını destekler niteliktedir. 3 nolu ortam (2 mg/l kinetin+ 2 mg/l zeatin içeren MSB ortamı) ise, 1 nolu ortam dışındaki diğer besi ortamlarında elde edilen sürgün rejenerasyon oranı ortalamalarına göre istatistiksel olarak önemli derecede daha yüksek sürgün rejenerasyon oranı ortalaması (2.14 sürgün/eksplant) göstermiştir. 2 nolu ortam (2 mg/l BAP+ 2 mg/l zeatin içeren MSB ortamı), 4 nolu ortam (2 mg/l PBA içeren MSB ortamı) ve 5 nolu ortamda (4 mg/l PBA içeren MSB ortamı) istatistiksel olarak birbirinden farklı olmayan sürgün rejenerasyon oranı ortalamaları elde edilmiştir. 6 nolu ortam (2 mg/l kinetin+ 0.5 mg/l IAA içeren MSB ortamı) ile 7 nolu ortam (0.5 mg/l kinetin+ 0.5 mg/l IAA+0.1 mg/l GA3 içeren MSB ortamı), incelenen besi ortamları içerisinde en düşük sürgün rejenerasyon oranı ortalamalarını göstermişlerdir. En yüksek eksplant reaksiyon oranı ortalaması sağlayan 8 nolu ortam (Büyüme düzenleyicisi içermeyen MSB ortamı) ise, 4 ve 5 nolu ortamlarda elde edilen sürgün rejenerasyon oranı ortalamalarından istatistiksel olarak farklı olmayan sürgün rejenerasyon oranı ortalaması göstermiştir.

Besi ortamlarının sürgün rejenerasyon oranı üzerindeki etkisi genotiplere bağlı olarak önemli derecede farklılık göstermiştir (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.6). Nitekim, Çukurova 1518 ve Erşan 92 çeşitleri 1 nolu ortamda diğer ortamlara göre istatistiksel olarak önemli derecede daha yüksek sürgün rejenerasyon oranı değerleri göstermesine karşılık, Coker 312 çeşidinin aynı ortamda gösterdiği sürgün rejenerasyon oranı ortalaması 3, 4 ve 5 nolu ortamlarda aynı çeşitten elde edilen sürgün rejenerasyon oranı ortalamalarından istatistiksel olarak farksız olmuştur.

Eksplant yaşı, sürgün rejenerasyon oranını önemli derecede etkilemiş ve 5 haftalık fidelerden alınan eksplantlar, iki haftalık fidelerden alınan eksplantlara göre

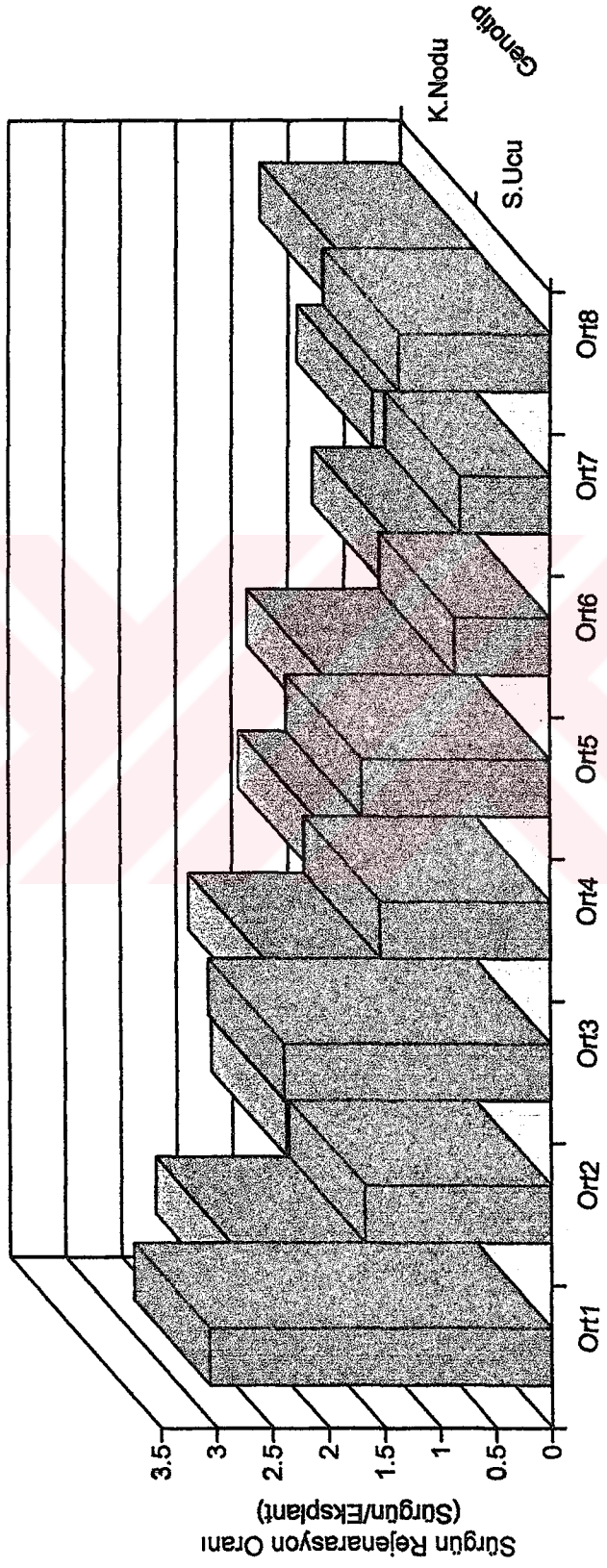


Şekil 4.6. Farklı Besi Ortamlarının Farklı Pamuk Genotiplerinde Sürgün Rejenerasyon Oranına Etkisi

istatistiksel olarak daha yüksek sürgün rejenerasyon oranı ortalaması göstermişlerdir (Çizelge 4.7). Bu bulgu, en yüksek sürgün rejenerasyon oranını 35 günlük fidelerden izole ettiği sürgün ucu ve kotiledon nodlarından elde ettiğini bildiren Agrawal ve ark. (1997)'nın bulgularını desteklemektedir. Diğer taraftan, bulgularımız, büyük eksplantların *in vitro* kültürde daha etkin rejenere olduğunu bildiren Hatipoğlu (2002)'nun görüşlerini doğrular niteliktedir.

Araştırma bulguları, eksplant tipinin sürgün rejenerasyon oranını istatistiksel olarak önemli derecede etkilediğini ortaya koymuştur (Çizelge 4.6). Nitekim, sürgün uçları 1.67 sürgün/eksplant'lık bir sürgün rejenerasyonu oranı ile kotiledon nodlarından elde edilen sürgün rejenerasyon oranı ortalamasından (1.44 sürgün/eksplant) istatistiksel olarak önemi derecede daha yüksek sürgün rejenerasyon oranı göstermiştir (Çizelge 4.7). Eksplant tipinin sürgün rejenerasyon oranına etkisi ile ilgili bu bulgular; sürgün meristemleri, ikincil yaprak nodları, birincil yaprak nodları ve kotiledon nodlarının sürgün oluşturma yeteneklerinde farklılık olduğunu bildiren Hemphill ve ark. (1998), apikal ve yan gözlerin kültüre alındığı çalışmada, en iyi sonuçların apikal gözlerden elde edildiğini bildiren Carvalho ve ark. (1997), gen transformasyonu için sürgün apikal meristemlerinden diğer eksplantlara göre daha kolay bitki rejenere olduğunu belirten Zhu ve ark. (1998) ve farklı eksplantları (yaprak, petiol, internod, nod, hipokotil ve sürgün ucu) inceledikleri çalışmada en iyi sonuçları sürgün uçları ve nodlardan elde ettiklerini bildiren Bajrovic ve ark. (2001)'nın bulgularını destekler niteliktedir.

Varyans analizi sonuçları, eksplant tipi X besi ortamı interaksiyonunun istatistiksel olarak önemli olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.6). Bu sonuç, besi ortamlarının sürgün rejenerasyon oranı üzerindeki etkisinin eksplant tipine bağlı olarak değiştiğini ortaya koymaktadır. Nitekim, her iki eksplantta da en yüksek sürgün rejenerasyon oranı ortalamaları 1 nolu ortamda (2 mg/l kinetin+2 mg/l BAP içeren MSB ortamı) elde edilmesine karşılık, kotiledon nodları 3 nolu ortamda (2 mg/l kinetin+2 mg/l zeatin içeren MSB ortamı), 1 nolu ortamdakinden istatistiksel olarak farklı olmayan sürgün rejenerasyon oranı göstermiştir (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.7). Buna karşılık, sürgün uçlarının 1 nolu ortamda gösterdiği sürgün rejenerasyon oranı ortalamasının, bu eksplantın diğer ortamlarda gösterdiği sürgün rejenerasyon



Şekil 4.7. Farklı Besi Ortamlarının Farklı Pamuk Eksplantlarında Sürgün Rejenerasyon Oranına Etkisi

oranı ortalamalarından istatistiksel olarak önemli derecede daha yüksek olduğu ortaya çıkmıştır.

4.2.2. Köklenme

Sekiz nolu besi ortamında sürgünlerin sağlıklı şekilde geliştikleri, kültür sırasında (bazan ilk kültür aşamasında çoğunlukla ilk alt kültürde) kendiliğinden kök oluşturdukları gözlenmiştir. Bununla birlikte kültür sırasında daha fazla sayıda sürgün oluşturan büyüme düzenleyicisi içeren ortamlarda elde edilen tabanlarında kallus bulunan sürgünlerin köklenmeleri için iki veya üç kez büyüme düzenleyicisi içermeyen 8 nolu MSB besi ortamında alt kültüre alınmaları gerekmiştir.

4.2.2.1. Köklenme Oranı (%)

Çukurova-1518, Coker 312 ve Erşan 92 pamuk çeşitlerinin 2 ve 5 haftalık *in vitro* fidelerinden sağlanan sürgün ucu ve kotiledon nodu eksplantlarının, 8 farklı besi ortamındaki kültürleri sonrasında elde edilen sürgün rejeneratlarının uzamaları ve köklenmeleri amacıyla aktarıldıkları büyüme düzenleyicisi içermeyen MSB besi ortamında elde edilen köklenme oranlarına (%) ilişkin varyans analiz sonuçları, Çizelge 4.8.'de verilmiştir.

Çizelgeden izlendiği gibi sürgünlerin rejenere oldukları besi ortamları köklenme oranını istatistiksel olarak önemli derecede etkilemiştir. İncelenen diğer faktörlerin köklenme oranına etkisi istatistiksel olarak önemsiz çıkmıştır.

Köklenme oranı, sürgünlerin rejenere oldukları besi ortamlarına bağlı olarak % 13.9 ile % 90.6 arasında değişmiştir (Çizelge 4.9). En yüksek köklenme oranı, 8 nolu ortamda (büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamı) rejenere olan sürgünlerde saptanmıştır. En düşük köklenme oranı, 6 (2 mg/l kinetin+ 0.5 mg/l IAA içeren MSB ortamı) ve 7 nolu ortamda (0.5 mg/l kinetin+ 0.5 mg/l IAA+ 0.1 mg/l GA3 içeren MSB ortamı) rejenere olan sürgünlerde saptanmıştır. 2 nolu ortamda (2 mg/l BAP+ 2 mg/l zeatin içeren MSB ortamı) ve 5 nolu ortamda (4 mg/l PBA içeren MSB ortamı) rejenere olan sürgünlerdeki köklenme oranı ortalamaları, 6 ve 7 nolu

Çizelge 4.8. Farklı Pamuk Genotiplerinin Farklı Yaştaki *İn Vitro* Fidelerinden Alınan Farklı Eksplantlarından Farklı Besi Ortamlarında Elde Edilen Sürgün Rejeneratlarının Büyüme Düzenleyicisi İçermeyen MSB Besi Ortamındaki Köklenme Oranlarına (%) İlişkin Varyans Analiz Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F Değeri
Tekerrür	2	397.635	1.4817
Genotip	2	129.692	0.4833
Hata 1	4	268.369	
Eksplant Yaşı	1	28.311	0.0431
Genotip x Eks Yaşı	2	0.256	0.0004
Hata 2	6	656.149	
Eksplant	1	954.343	2.3562
Genotip x Eksplant	2	127.399	0.3145
Eks Yaşı x Eksplant	1	95.603	0.2360
Genotip x Eks Yaşı x Eksplant	2	1.830	0.0045
Besi Ortamı	7	16206.733	40.0135**
Genotip x Besi Ortamı	14	198.360	0.4897
Eks Yaşı x Besi Ortamı	7	53.686	0.1325
Genotip x Eks Yaşı xBesi Ortamı	14	26.306	0.0649
Eksplant x Besi Ortamı	7	89.353	0.2206
Genotip x Eksplant x Besi Ortamı	14	62.469	0.1542
Eks Yaşı x Eksplant x Besi Ortamı	7	39.718	0.0981
Genotip x Eks Yaşı x Eksplant x Besi Ortamı	14	35.554	0.0878
Hata 3	180	405.032	
Genel	287		

**:P≤0.01 hata sınırlar içinde istatistiksel olarak önemli.

ortamlarda rejenere olan sürgünlerden elde edilen köklenme oranı ortalamalarından istatistiksel olarak farksız olduğu gibi, 1, 3 ve 4 nolu ortamlarda rejenere olan sürgünlerden elde edilen köklenme oranı ortalamalarından da istatistiksel olarak farksız olmuştur. 1 (2 mg/l BAP+ 2 mg/l kinetin içeren MSB ortamı) ve 4 nolu ortamda (2 mg/l PBA içeren MSB ortamı) rejenere olan sürgünlerden elde edilen köklenme oranı ortalaması ise, 6 ve 7 nolu ortamda rejenere olan sürgünlerden elde edilen köklenme oranı ortalamalarından istatistiksel olarak daha yüksek olmuştur.

Rejenerasyon oranı ile ilgili veriler doğrultusunda en yüksek sürgün sayılarının 1 nolu besi ortamında elde edildiği bildirilmişti. Ancak bu ortamda elde edilen

Çizelge. 4.9. Farklı Pamuk Genotiplerinin 2 ve 5 Haftalık Fidelerinden Alınan Sürgün Ucu ve Kotiledon Nodu Eksplantlarından Farklı Besi Ortamlarında Elde Edilen Sürgün Rejeneratlarının Köklenme Oranı (%) Ortalamaları

Genotip	Eksplant Yaşı	Eksplant	aBesi Ortamı No								Ort
			Ort1	Ort2	Ort3	Ort4	Ort5	Ort6	Ort7	Ort8	
Çukurova 1518	2 Hafta	S.Ucu	29.0	17.7	22.3	27.7	24.3	16.7	16.7	100.0	31.8
		K.Nodu	32.0	21.7	24.3	27.7	16.7	0.0	11.0	89.0	27.8
	5 Hafta	S.Ucu	27.7	20.0	26.3	28.7	19.0	16.7	11.0	91.7	30.1
		K.Nodu	30.3	21.7	19.3	27.7	19.3	11.0	16.7	89.0	29.4
Coker 312	2 Hafta	S.Ucu	17.7	22.0	15.0	22.0	19.3	16.7	33.3	100.0	30.8
		K.Nodu	22.0	11.0	16.7	22.3	22.3	11.0	11.0	83.3	25.0
	5 Hafta	S.Ucu	17.7	16.7	23.3	27.7	19.3	16.7	33.3	89.0	30.5
		K.Nodu	16.7	11.0	19.3	19.3	22.3	16.7	16.7	89.0	26.4
Erşan 92	2 Hafta	S.Ucu	21.3	17.7	27.7	22.0	27.7	11.0	16.7	91.7	29.5
		K.Nodu	23.0	23.3	19.3	19.3	22.0	16.7	0.0	89.0	26.6
	5 Hafta	S.Ucu	25.7	21.7	19.3	25.0	22.3	16.7	16.7	83.3	28.8
		K.Nodu	27.3	21.7	27.3	27.7	31.7	16.7	0.0	91.7	30.5
Ortalama			24.2 b+	18.8 bcd	21.7 bc	24.8 b	22.2 bcd	13.9 d	15.3 cd	90.6 a	

+) Aynı satır içerisinde benzer harf ile gösterilen ortalamalar Duncan testine göre P≤0.05 hata sınırları içerisinde birbirinden farksızdır.

sürgünler, hormonsuz besi ortamında (8 nolu) elde edilen bitkilerle kıyaslandığında, diğer hormon içeren ortamlardakine benzer şekilde kısa boylu, tabanlarında kallus oluşumları ve fenolik bileşik dağılımları ile karakterize edilmişlerdir. Diğer hormon içeren besi ortamlarında olduğu gibi bu besi ortamında elde edilen bitkilerin çoğunluğu uzamaları ve köklenmeleri için hormonsuz 8 nolu ortamda sürdürülecek birkaç alt kültür gerektirmektedir. Diğer taraftan başlangıçtan itibaren 8 nolu besi ortamında kültüre alındığında eksplantların çoğalma katsayısı düşük olmakla birlikte, tabanında fenolik bileşik etkisi olmayan ve kallus oluşturmayan kolaylıkla köklenebilen sağlıklı bitkiler üretmişlerdir. Sürgünlerin uzamaları ve köklenmeleri için yapılacak alt kültürler dikkate alındığında, 1 nolu besi ortamındaki çoğalma katsayısını dengeleyecek şekilde 8 nolu hormonsuz besi ortamında 5-6 hafta içinde köklü sağlıklı bitkiler elde edilmektedir. Pamukta genetik transformasyon çalışmaları ya da değerli materyalin çoğaltılması söz konusu ise bu araştırmadaki bulgularımız doğrultusunda, sürgün uçlarından bitki rejenerasyonu için hormon içermeyen besi ortamının kullanılmasını önerebiliriz.

Sürgün rejenerasyon ve köklenme oranları ile ilgili bulgularımız, en iyi sonuçların eksplantların hormonsuz MS besi ortamında kültüre alınmasıyla elde edildiğini ve dokuların bu besi ortamında 2 haftalık aralıklarla alt kültüre alındıklarını ve sürgünlerin 5-6 haftada 4 yapraklı aşamaya ulaştıkları bildiren Gould ve ark. (1991); sürgün uzamasının büyüme düzenleyicisi içermeyen özellikle sıvı MS besi ortamında daha iyi olduğunu vurgulayan Agrawal ve ark. (1997); 18 besi ortamı içinde en yüksek rejenerasyon yüzdesinin hormon içermeyen tam yoğunluklu MS tuzları ve vitaminlerden oluşan ortamda elde edildiğini ve bitkilerin vitamin içeren tam yoğunluktaki MS besi ortamında 6 hafta içinde köklendiklerini bildiren Zapata ve ark. (1999)'nın bulgularını desteklemektedir.

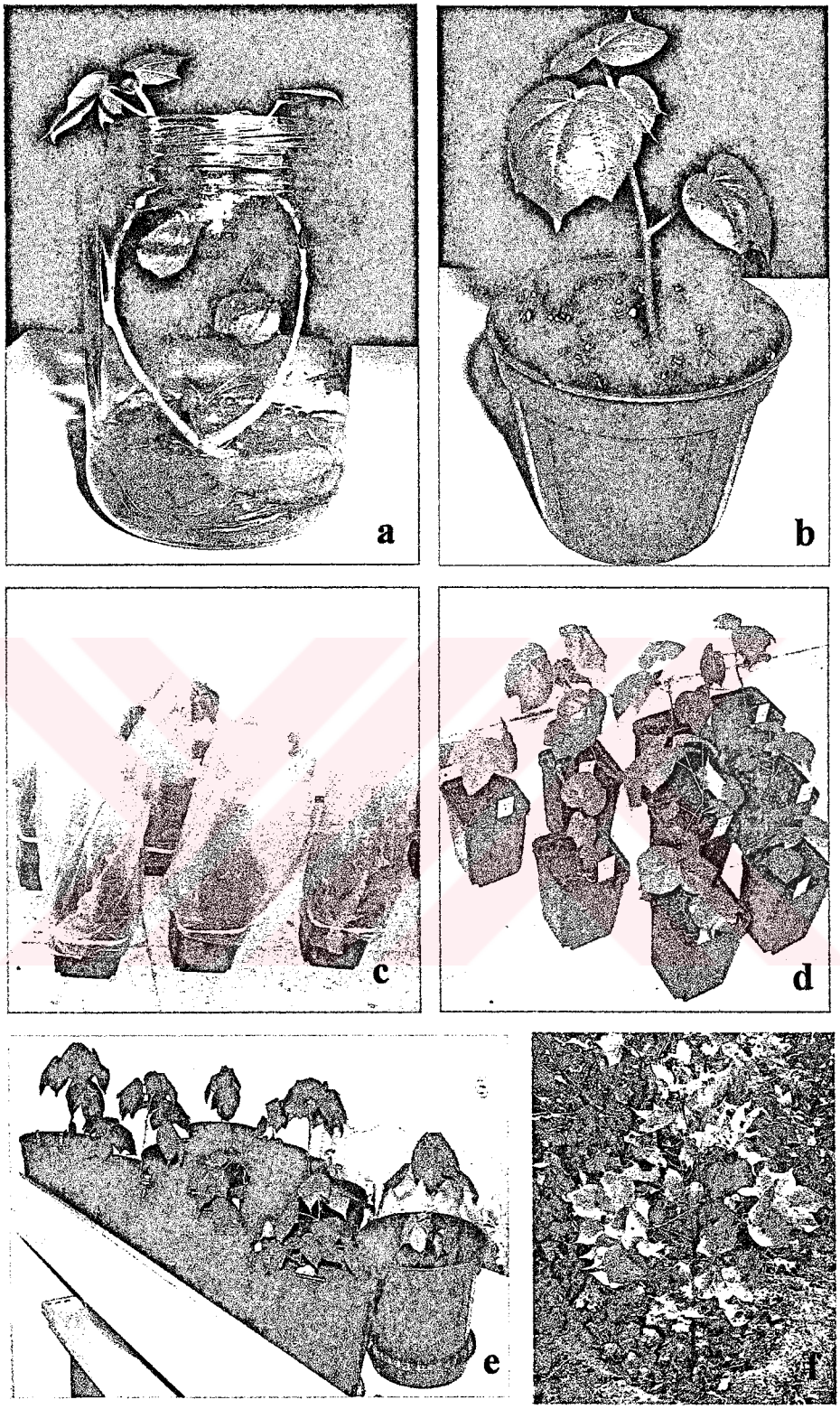
Çalışmamızdaki köklenme oranı yönünden genotipler arasında istatistiki açıdan önemli farklılık bulunmadığına dair bulgularımız, köklenme frekansının çeşide bağlı olabileceğini belirten Gould ve ark. (1991), kök organogenesis indüksiyonunun genotipe bağımlılığı ve güvenilir olmamasına bağlı olarak kök oluşumundaki başarısızlık nedeniyle rejenerasyon potansiyelindeki kayıpların genotiplere bağlı

olarak % 30-80 arasında değiştiğini bildiren Luo ve Gould (1999) 'nın bulgularından farklıdır.

4.2.3. Alıştırma Aşaması Bulguları ve Tartışma

Köklenen sürgünler, steril torf içeren saksılara aktarılmıştır. Sera koşullarının sağlandığı büyütme odasına yerleştirilen saksılar, önce polipropilen torbalarla kapatılıp, iki hafta sonra torbalara kesilerek delikler açılmış, üçüncü haftada delikler genişletilmiş ve dördüncü haftada torbalar çıkarılarak bitkilerin dış koşullara alışması sağlanmıştır (Şekil 4.8). 2-3 ay sonra köklenmiş bitkiler daha büyük saksılara aktarılmış ve gelişmeleri sağlanmıştır (Şekil 4.8). İlk yıl yürütülen ön çalışma sırasında organogenesis yoluyla elde edilen köklü bitkilerin bir kısmı ÇUTAEM deneme alanına aktarılmıştır. Bitkiler tarla koşullarında çiçeklenmişler, ancak sezon süresince tüm deneme alanında etkili olan pembe kurt zararı nedeniyle ne yazık ki kör kozalar elde edilebilmiştir (Şekil 4.8). Ancak kozalarda tohumların oluştuğu gözlenmiştir. İkinci yıl yürütülen çalışmalarda ise tarlaya aktarılması beklenen yaklaşık 40 adet bitkinin tamamı büyütme odasında bir elektrik arızası nedeniyle çıkan yangın sonucu kaybedilmiştir.

Açıklanan alıştırma yöntemine göre yetiştirilen bitkilerin yaşama oranı % 90 olarak belirlenmiştir. Bu sonuç, dış ortama adaptasyon için seraya aktarılan bitkilerin yaşama şansının % 95 olduğunu ve bitkiler saksıya aktarıldıktan 4 ay sonra tamamında koza oluşumunun gözlendiğini bildiren Agrawal ve ark. (1997); köklenmiş bitkilerin ototrofik büyüme için Hoaglands solusyonuna aktarılarak ve ilk iki hafta polietilen torbalar ile kapatılarak dış ortama adapte edildiklerini, daha sonra saksılara geçirildiklerini ve bitkilerin % 90'ının olgunluğa ulaşarak normal olarak çiçeklendiklerini ve fertil olduklarını saptayan Gupta ve ark. (1997); bulgularıyla benzerlik göstermektedir.



Şekil 4.8. Organogenesis Çalışmalarında Köklenme ve Dış Koşullara Alıştırma Aşamaları. a. Köklenmiş *İn Vitro* Sürgün , b. Saksıya Aktarılma, c. İlk Alıştırma Aşaması (Nem Kontrolü - Büyütme Odası), d. Alıştırma Aşaması (Sera Koşulları), e. Sera Koşullarında Bitkilerin Dış Koşullara Alıştırılması, f. Alıştırma Sonrası Tarlaya Aktarılan Bitki.

4.3. Somatik Embriyogenesis Bulguları ve Tartışma

4.3.1. Hipokotil Eksplantı Bulguları ve Tartışma

4.3.1.1. Çukurova 1518 Pamuk Çeşidi İle Yürütülen Besi Ortamı Belirleme Denemesi İle İlgili Bulgular ve Tartışma

Kültüre alınan hipokotillerde yapılan periyodik gözlemlerde kallus oluşumu ve oluşan kallusun özellikleri saptanmaya çalışılmıştır. Genel olarak kullanılan besi ortamlarının tamamında oranları değişmek üzere kallus oluşumu gözlenmiştir. Aynı zamanda kullanılan farklı besi ortamlarında oldukça farklı morfolojiye ve gelişim seyrine sahip kallus oluşumu saptanmıştır. Elde edilen kallusların açık krem renkli, gevşek sulu yapılı; sarımsı yeşil kırılgan; yeşil kompakt ileri dönemde karlı; kolay çoğalabilen veya gelişme göstermeyen gibi farklı özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. Başlangıç kültür süresinin sonunda (4-6 hafta), eksplantlar alt kültüre aktarılırken pek çok araştırıcı tarafından tanımlandığı şekilde (Davidonis ve Hamilton, 1983; Shoemaker ve ark., 1986; Firoozabady ve ark., 1987; Trolinder ve Goodin, 1987; Trolinder ve Goodin, 1988 a ve b; Zimmerman ve Robacker, 1988; Trolinder ve Xhixian, 1989; Gawel ve Robacker, 1990; Firoozabady ve DeBoer, 1993; Sakhanokho ve ark., 1998; Sakhanokho ve ark., 2001; Zhang ve ark., 2001; Mishra ve ark., 2003) embriyogenik [sarımsı yeşil, sarımsı krem, granüler ve kırılgan (+ +)], ve orta derecede embriyogenik [sarımsı yeşil, orta derecede kırılgan (+)] özellikte kallus oluşturan eksplantların sayısı belirlenmiş ve petri kutusu başına embriyogenik kallus oluşturan hipokotillerin oranı yüzde olarak saptanmıştır. Genel olarak oksinlerin yüksek oldukları ortamlarda kallus oluşumunun daha fazla olduğu, 2,4-D içeren ortamlarda krem sarı renkli, kırılgan veya gevşek yapılı, NAA içeren ortamlarda ise daha çok yeşilimsi sarı veya çoğunlukla koyu yeşil kompakt kalluslar elde edilmiştir.

4.3.1.1. (1). Kallus İndüksiyonu Oranı (%)

Farklı besi ortamlarında kültüre alınan Çukurova-1518 pamuk çeşidi hipokotillerinin kallus oluşturma oranlarına uygulanan varyans analizi sonuçları Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.10. Çukurova 1518 Pamuk Çeşidi Hipokotillerinin Farklı Besi Ortamlarındaki Kallus İndüksiyon Oranları ile İlgili Varyans Analiz Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F Değeri
Tekerrür	2	0.041	1.1590
Besi Ortamı	23	0.094	2.6700**
Hata	46	0.035	
Genel	71		

** : P≤0.01 hata sınırlar içinde istatistiksel olarak önemli.

Çizelgeden izlendiği gibi besi ortamları kallus indüksiyon oranını istatistiksel olarak önemli derecede etkilemiştir.

Araştırmada incelenen 24 farklı besi ortamında saptanan kallus indüksiyon oranı (%) ortalamaları Çizelge 4.11'de verilmiştir. Kallus indüksiyon oranı, besi ortamlarına bağlı olarak, % 33.3 ile % 99.0 arasında değişmiştir. En yüksek kallus indüksiyon oranı, % 99.0 ile 5 nolu ortamda (0.1 mg/l kinetin+2 mg/l NAA içeren MSB ortamı) elde edilirken, en düşük kallus indüksiyon oranı ise 1 nolu ortamda (0.1 mg/l kinetin+ 0.1 mg/l NAA içeren MSB) elde edilmiştir. Kinetin ile NAA'nın kombine edildiği ortamlarda, genellikle NAA konsantrasyonu arttıkça kallus indüksiyon oranında artış eğilimi ortaya çıkmıştır. Ancak, 0.1 mg/l kinetin içeren ortamlarda NAA konsantrasyonundaki artış, kallus indüksiyon oranında istatistiksel olarak önemli artışa neden olmuş, diğer kinetin konsantrasyonlarında NAA konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak kallus indüksiyon oranında ortaya çıkan artışlar istatistiksel olarak önemli olmamıştır. Bu sonuç, pamuk hipokotillerinden etkin bir kallus indüksiyonu için ortamdaki NAA/kinetin oranının yüksek olması gerektiğini ortaya koymaktadır. Araştırmadan elde edilen bu bulgu, Brar ve ark. (1998) ve Sunilkumar ve Rathore (2001)'nin bulgularını desteklemektedir.

Çizelge 4.11. Çukurova 1518 Hipokotillerinin Farklı Besi Ortamlarındaki Kallus İndüksiyon Oranı (%) Ortalamaları

Besi Ortamı No	Besi Ortamı İçeriği	Kallus İndüksiyon Oranı (%)	Kallus Özelliği
1	0.1 mg/l kinetin+0.1 mg/l NAA içeren MSB	33.3 e*	-
2	0.1 mg/l kinetin+0.5mg/l NAA içeren MSB	40.0 de	-
3	0.1 mg/l kinetin+1 mg/l NAA içeren MSB	60.0 bcde	-
4	0.1 mg/l kinetin+1.5 mg/l NAA içeren MSB	73.3 abcd	+
5	0.1 mg/l kinetin+2 mg/l NAA içeren MSB	99.0 a	++
6	0.5 mg/l kinetin+0.1 mg/l NAA içeren MSB	40.0 de	-
7	0.5 mg/l kinetin+0.5 mg/l NAA içeren MSB	53.3 cde	-
8	0.5 mg/l kinetin+1 mg/l NAA içeren MSB	53.3 cde	-
9	0.5 mg/l kinetin+1.5 mg/l NAA içeren MSB	66.7 abcde	+
10	0.5 mg/l kinetin+2 mg/l NAA içeren MSB	73.0 abcd	+
11	1 mg/l kinetin+0.1 mg/l NAA içeren MSB	46.7 de	-
12	1 mg/l kinetin+0.5 mg/l NAA içeren MSB	53.3 cde	-
13	1 mg/l kinetin+1 mg/l NAA içeren MSB	60.0 bcde	-
14	1 mg/l kinetin+1.5 mg/l NAA içeren MSB	66.7 abcde	-
15	1 mg/l kinetin+2 mg/l NAA içeren MSB	86.3 abc	+
16	0.1 mg/l PBA+0.1 mg/l 2,4-D içeren MSB	92.7 ab	+
17	0.1 mg/l PBA+0.5 mg/l 2,4-D içeren MSB	92.7 ab	++
18	0.1 mg/l PBA+1 mg/l 2,4-D içeren MSB	86.3 abc	++
19	0.5 mg/l PBA+0.1 mg/l 2,4-D içeren MSB	73.3 abcd	+
20	0.5 mg/l PBA+0.5mg/l 2,4-D içeren MSB	53.3 cde	-
21	0.5 mg/l PBA+1 mg/l 2,4-D içeren MSB	73.3 abcd	++
22	1mg/l PBA+0.1 mg/l 2,4-D içeren MSB	60.0 bcde	-
23	1 mg/l PBA+0.5 mg/l 2,4-D içeren MSB	53.3 cde	-
24	1 mg/l PBA+1 mg/l 2,4-D içeren MSB	59.7 bcde	-

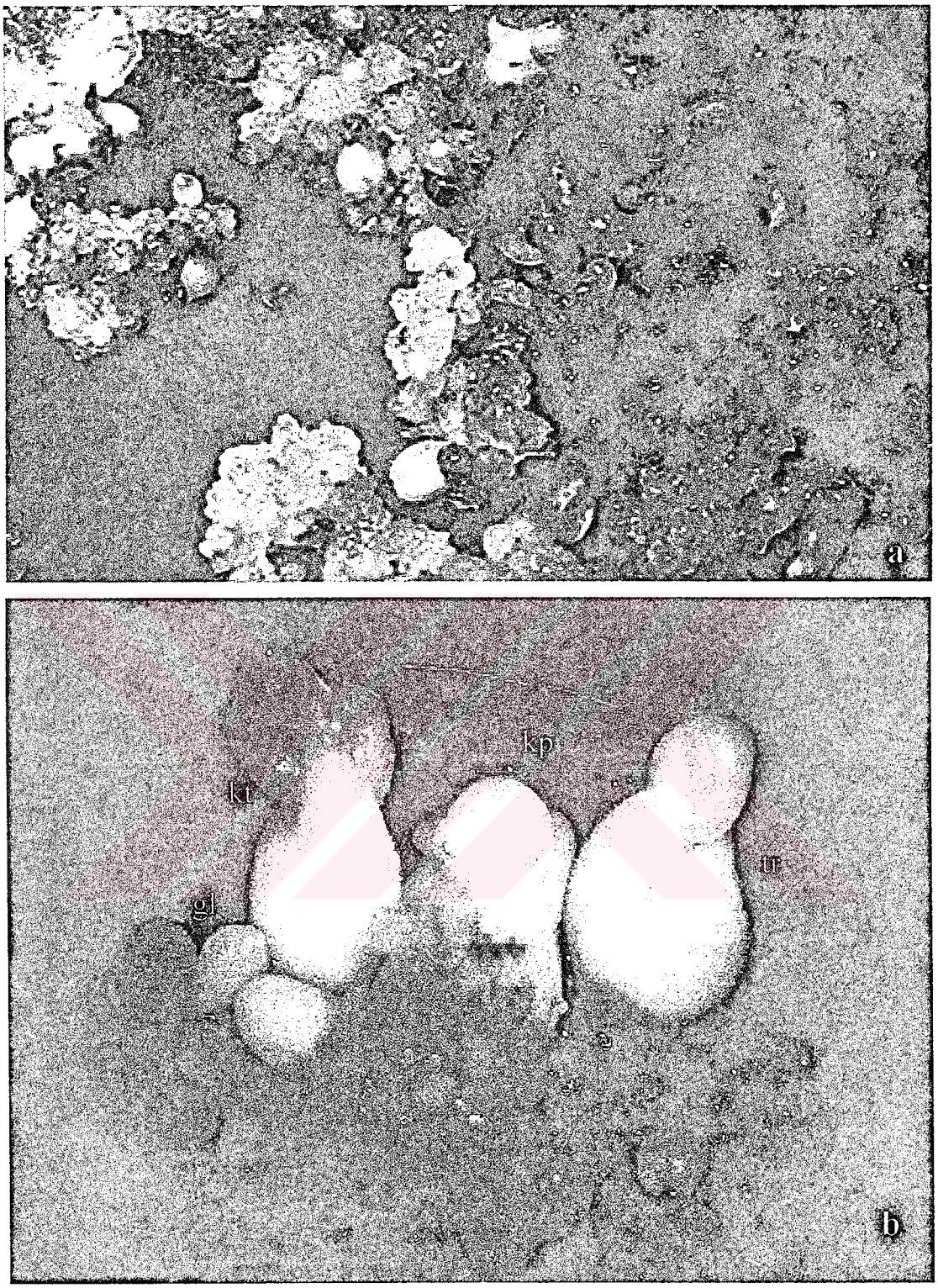
*) Aynı sütun içinde benzer harf ile gösterilen ortalamalar Duncan testine göre P≤0.05 hata sınırları içerisinde istatistiksel olarak farklı değildir.

PBA ve 2,4-D'nin kombine edildiği ortamlarda ise, en yüksek kallus indüksiyon oranı, 0.1 mg/l PBA'nın 0.1 veya 0.5 mg/l 2,4-D ile kombine edildiği ortamlarda elde edilmiştir. Söz konusu besi ortamı kombinasyonlarında elde edilen kallus indüksiyon oranı ortalamalarının, 0.1 mg/l kinetin ve 1.5 veya 2 mg/l NAA içeren ortamlarda elde edilen kallus indüksiyon oranı ortalamalarından istatistiksel olarak farksız olduğu ortaya çıkmıştır. Bu durumun, 2,4-D'nin kallus indüksiyonu açısından NAA'ya göre daha etkin bir oksin olmasından kaynaklandığı söylenebilir (Hatipoğlu, 2002).

Farklı besi ortamlarında elde edilen kalluslar yapı ve görünümleri açısından farklılık göstermiştir (Çizelge 4.11) . 5, 17, 18 ve 21 nolu ortamlarda oluşan kallusların genellikle embriyogenik [sarımsı yeşil, sarımsı krem, kırılgan (+ +)] kallus olduğu gözlenmiştir. Pamukta daha önce yapılan bir çok araştırmada da embriyogenik kalluslar, ya yüksek NAA/kinetin oranına sahip besi ortamlarında (Shoemaker ve ark., 1986; Gawel ve Robacker, 1990; Firoozabady ve DeBoer, 1993) ya da düşük konsantrasyonda 2,4-D içeren ortamlarda elde edilmiştir (Trolinder ve Goodin, 1987; Trolinder ve Goodin, 1988b) .

4.3.1.2. Çukurova 1518, Coker 312 ve Erşan 92 Pamuk Çeşitleri İle Yürütülen Deneme İle İlgili Bulgular ve Tartışma

İlk kültür aşamasında kullanılan besi ortamlarının tamamında incelenen genotiplerin kallus oluşturduğu gözlenmiş, daha sonra kallus çoğaltma ortamına aktarılan kallusların bir kısmında farklılaşmalar saptanmıştır. Hipokotillerden elde edilen embriyogenik olarak tanımlanan kalluslar, materyal ve metot bölümünde verilen yöntem uyarınca sıvı kültüre aktarılmışlardır. Sıvı kültürde ilk farklılaşmalar Coker 312 çeşidinde gözlenmiştir. Birinci haftada kallusun süspansiyon içinde tamamen dağıldığı, 2. haftada süspansiyonun yoğunlaştığı, başlangıçtaki saydam renginin koyulaştığı ve içinde az sayıda beyazımsı krem renkli pro-embriyogenik yapıların ve embriyogenik hücre kümelerinin oluştuğu gözlenmiştir. Kültürün 3.'üncü haftasında ise beyazımsı krem rengi pro-embriyogenik yapıların çok açık yeşilimsi krem renkli globular yapılara dönüştükleri ve yeni pro-embriyogenik yapıların oluşmaya devam ettiği izlenmiştir (Şekil 4.9). Kültür süresinin sonunda ise süspansiyonun kirli kahverengi, yoğun ve az miktarda kalp, torpido ve birkaç adet kotiledon aşamasında ve çok sayıda globular dönemde somatik embriyolar içerdiği görülmüştür (Şekil 4.9). Coker 312 çeşidinin, 1, 2, 4 ve 5 nolu besi ortamlarında elde edilen kalluslarının sıvı kültürlerinde bu farklılaşmalar benzer şekilde olmuş, ancak 3 nolu besi ortamından gelen kallusların sıvı kültürde benzer şekilde dağılmadığı, süspansiyonun yoğunlaşmadığı, kültür renginin çok az değiştiği ve sonuçta bu uygulamada çok az sayıda embriyo oluştuğu gözlenmiştir.



Şekil 4. 9. Pamuk Hipokotillerinden Oluşan Kallusun Sıvı Ortamda Kültürü Sonrası Elde Edilen Embriyogenik Yapılar ve Farklı Gelişme Aşamalarındaki Somatik Embriyolar. a. Sıvı Kültür Sonrası Embriyogenik Yapılar, b. Embriyo Gelişme Ortamında Globular (gl), Kotiledon (kt), Kalp (kp) ve Torpido (tr) Dönemindeki Somatik Embriyolar.

.

Çukurova 1518 pamuk çeşidinin iyi tepki veren sıvı kültürlerinde yukarıda açıklanan farklılaşmalar ancak 4. haftadan sonra başlamış ve çok daha yavaş seyretmiştir. Bu nedenle Coker 312 için sıvı kültür süresi 4-5 haftada sürdürülürken, Çukurova 1518 için 6-7 haftaya kadar uzatılmıştır. Sıvı kültüre aktarılan kallusun oluştuğu besi ortamları dikkate alındığında, 5, 1 ve 4 nolu besi ortamlarından elde edilen kalluslardan globular ve ileri dönem embriyolar, 2 nolu besi ortamında oluşan kalluslardan yalnız globular embriyolar ve 3 nolu besi ortamında oluşan kalluslardan ise hiçbir embriyogenik yapının oluşmadığı gözlenmiştir. 3 nolu besi ortamında oluşan açık krem renkli sulu yapılı kalluslar sıvı ortama aktarıldıklarında hiç bir farklılaşma izlenememiştir.

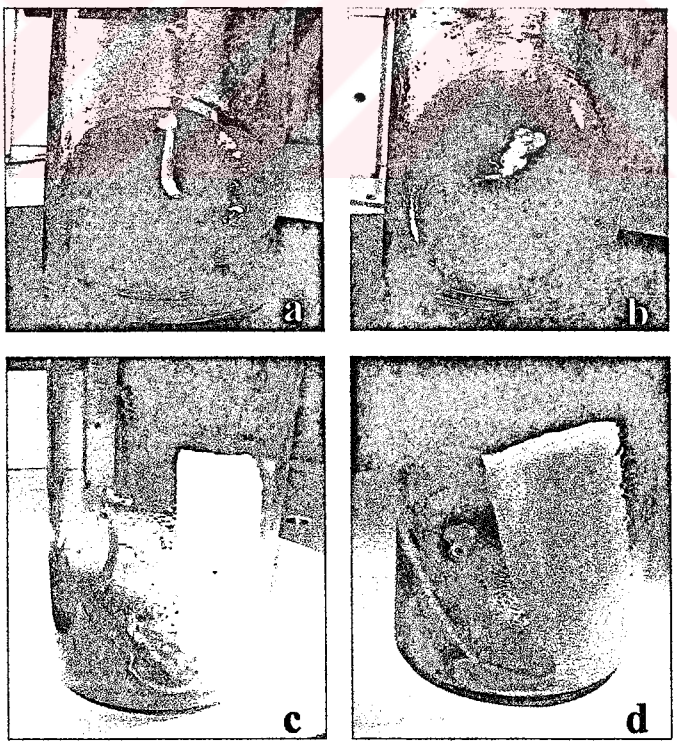
Az miktarda embriyogenik kallus elde edilen Erşan 92 çeşidinin sıvı kültürlerindeki gözlemlerimiz ise diğer genotiplere göre oldukça farklı olmuştur. Sıvı kültür aşamasına aktarılırken diğer genotiplerin kallusları kolaylıkla parçalanırken, Erşan 92 çeşidinin kalluslarının kısmen daha zor kesildikleri ve sıvı kültüre aktarıldıklarında süspansiyon içinde dağılmadıkları izlenmiştir. Kültür süresi boyunca kalluslar dağılmadıkları için süpansiyon yoğunlaşmamış ve rengi değişmemiştir. Kültürün 2. haftasında süspansiyon içinde az sayıda koyu yeşil iri globular yapılar gözlenmiş, ancak bunlarda kültür süresinin sonuna kadar hiçbir farklılaşma gözlenememiştir. Anılan yapılar embriyo gelişme ortamına aktarıldığında da hiçbir farklılaşma ve gelişme izlenmemiştir.

Sıvı kültür süresinin sonunda elde edilen pro-embriyogenik yapılar ve farklı gelişme aşamalarındaki somatik embriyoları içeren embriyogenik kallus kütleleri materyal ve metot bölümünde belirtilen yöntem uyarınca süzülmüş yıkanmış ve steril filtre kağıdı üzerinde kurutulmuştur. Globular, kalp, torpido ve az sayıda kotiledon aşamasındaki somatik embriyo içeren bu materyalden torpido ve kotiledon aşamasındaki somatik embriyolar bağlı oldukları kütleden alınıp embriyo gelişme ortamına tek tek yerleştirilmiştir. Bu işlem sırasında embriyoların bulundukları hücre kümesinden kolaylıkla ayrılabildikleri gözlenmiştir. Erken dönem pro-embriyogenik yapılar ve globular embriyolar içeren hücre kümeleri ise olabildiğince besi ortamı ile temas edebilecekleri şekilde besi ortamı üzerine yayılarak yerleştirilmişlerdir. Somatik embriyo oluşumu yönünden ilk tepkilerin alındığı Coker 312 çeşidinin

gelişme ortamlarında yapılan gözlemleri doğrultusunda petri içindeki yoğunlaşan sıvı nedeniyle yeterince sağlıklı gelişemedikleri izlenmiştir. Bu nedenle daha sonra somatik embriyolar ve pro-embriyogenik yapılar içeren materyal gelişme ortamına aktarılmadan önce ortamın üzerine steril filtre kağıdı konulup bekletilmiş ve daha sonra kullanılmıştır. Bu uygulama sonrası gelişmenin daha iyi olduğu saptanmış ve Çukurova 1518 ve Coker 312 çeşitlerinden elde edilen materyaller için besi ortamları bu şekilde kullanılmıştır. Aynı zamanda Coker 312 çeşidinden elde edilen materyalin bir kısmı besi ortamın üzerine yerleştirilmiş steril filtre kağıdı üzerinde kültüre alınmış ve sağlıklı şekilde geliştikleri gözlenmiştir. Ancak bu konuda yeterli sayıda uygulama yapılamadığı için istatistiki olarak yararını kanıtlayamamakla birlikte gözlemlerimiz doğrultusunda söz konusu uygulamanın kullanılabileceğini söyleyebiliriz.

Sıvı kültürde ilk tepkilerin alındığı Coker 312 çeşidinden elde edilen ilk somatik embriyolar, gelişme ortamındaki kültür süresinin sonunda tüplerdeki köklendirme ortamına aktarılmış (Şekil 4.10), ilk 1 hafta indirekt ışık koşullarının sağlandığı büyütme dolabında kültüre alınmış ve daha sonra direkt ışık koşullarının sağlandığı büyütme odasına aktarılmışlardır. Büyütme odasında tüp içindeki yoğun nem nedeniyle somatik embriyoların vitrifiye oldukları, sağlıksız, kısmen sarı saydam renge dönüştükleri ve gelişemedikleri gözlenmiştir. Benzer sorunlar, daha az etkili olmakla birlikte, petri kutusunda gelişme ortamındaki somatik embriyolarda da ortaya çıkmıştır. Bu sorunun üstesinden gelmek için materyal ve metot bölümünde tanımlandığı şekilde; besi ortamı ilave edilen kültür tüpleri besi ortamı katılaşıncaya kadar eğik bir şekilde muhafaza edilmiş ve böylece ortamın tüp içerisinde eğik bir düzlem oluşturması sağlanmıştır. Bu durum, kültür tüpleri içerisindeki somatik embriyoların tüp içersinde yoğunlaşan sıvı ile temasını önlenmiştir. Aynı zamanda tabanda biriken sıvı rulo halindeki steril kağıt havlu ile alınmıştır. Coker 312'den oluşan ilk embriyolarda yapılan bu uygulama ile 5 mm'den büyük embriyoların sağlıklı şekilde geliştikleri gözlenmiş ve daha sonraki köklenme ortamlarında kültüre alınan somatik embriyolar için kullanılmıştır. Çukurova 1518 ve Coker 312 çeşitlerinden embriyo gelişme ortamında torpido ve kotiledon aşamasına ulaşan embriyolar, eğik bir düzlem oluşturacak şekilde embriyo

köklendirme ortamı içeren tüplere geçirilmişlerdir. Bu aşamada kotiledon aşamasına gelmiş somatik embriyolardan Çukurova 1518 çeşidinden 42 adet ve Coker 312 çeşidinden 60 adet embriyo köklendirme ortamına geçirilmiştir. Yukarıda belirtildiği üzere tüp içindeki yoğunlaşan sıvının alınması için kağıt havlular yerleştirilmiş ve 1 hafta sonra yenileriyle değiştirilmiştir. Bu işlem sonrasında ilk bir hafta içinde kültürlerin tamamında konulan kağıt havlu parçalarından kaynaklanan yoğun bakteri enfeksiyonu olduğu gözlenmiştir. Anılan kağıt havluların sterilizasyonu sırasında ortaya çıkan ancak daha sonra anlaşılan bir otoklav arızası nedeniyle havluların sterilize olamadıkları anlaşılmıştır. Tüplerdeki somatik embriyolara antibiyotik uygulaması yapılmış, ancak ne yazık ki uygulama sonrasında 1-2 hafta içerisinde enfeksiyonun yeniden yaygınlaştığı izlenmiş ve embriyolar kurtarılamamıştır. Ancak antibiyotik uygulaması sırasında (köklendirme ortamında 2 haftalık kültür sonrasında) embriyoların yaklaşık %15'inde [Çukurova 1518 (6 / 42) ve Coker 312 (9 / 60)] kök oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Somatik Embriyoların Köklendirilmesi ve Bakteri Enfeksiyonu. a ve b. Köklendirme Ortamındaki Somatik Embriyolar, c ve d. Otoklav Arızası Nedeniyle Enfekte Olan Somatik Embriyolar.

4.3.1.2.(2). Kallus İndüksiyon Oranı (%)

Hipokotilleri kültüre alınan farklı pamuk çeşitlerinin farklı besi ortamlarında saptanan kallus indüksiyon oranlarına (%) ilişkin varyans analiz sonuçları, Çizelge 4.12'te verilmiştir.

Çizelge 4.12. Farklı Pamuk Çeşitlerinin Hipokotil Eksplantlarının Farklı Besi Ortamlarındaki Kallus İndüksiyon Oranları ile İlgili Varyans Analiz Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F Değeri
Tekerrür	2	137.623	0.5562
Genotip	2	1047.504	4.2336
Hata 1	4	247.427	
Besi Ortamı	4	475.885	2.6932
Genotip x Besi Ortamı	8	265.892	1.5048
Hata2	24	176.698	
Genel	44		

Çizelgeden izlendiği gibi, genotip ve besi ortamının kallus indüksiyon oranı üzerindeki etkisi istatistiksel olarak önemsiz olmuştur. Kallus indüksiyon oranı, besi ortamlarına bağlı olarak, % 75.2 ile % 96.9 arasında; genotiplere bağlı olarak ise % 74.3 ile % 95.2 arasında değişmiştir (Çizelge 4.13). Farklı besi ortamı-genotip kombinasyonlarında ise, % 53.3 ile % 99 arasında değişen kallus indüksiyon oranı ortalamaları elde edilmiştir. Ancak, kallus indüksiyon oranında incelenen faktörlere bağlı olarak ortaya çıkan bu değişimlerin istatistiksel olarak önemsiz olduğu ortaya çıkmıştır. Bu sonuç, söz konusu denemede kullanılan besi ortamlarının, uygun besi ortamı belirlenmesi amacıyla yürütülmüş olan çalışmada incelenen 24 besi ortamı arasından en çok tepki veren besi ortamları olması nedeniyle beklenen bir sonuçtur.

Çizelge 4.13. Farklı Pamuk Çeşitlerinin Hipokotil Eksplantlarının Farklı Besi Ortamlarındaki Kallus İndüksiyon Oranı (%) Ortalamaları

Genotip	Besi Ortamı No					Ortalama
	1	2	3	4	5	
Çuk.1518	86.0	73.3	86.0	86.3	92.7	84.9
Cok. 312	92.7	99.0	92.7	92.7	99.0	95.2
Erş.92	66.3	53.3	60.0	92.7	99.0	74.3
Ortalama	81.7	75.2	79.6	90.6	96.9	

4.3.1.2.(2). Embriyogenik Kallus İndüksiyon Oranı (%)

Farklı pamuk çeşitlerinin hipokotillerinin farklı besi ortamlarında embriyogenik kallus oluşturma oranlarına uygulanan varyans analiz sonuçları Çizelge 4.14'te verilmiştir.

Çizelge 4.14. Farklı Pamuk Çeşitlerinin Hipokotil Eksplantlarının Farklı Besi Ortamlarındaki Embriyogenik Kallus Oluşturma Oranları ile İlgili Varyans Analiz Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F Değeri
Tekerrür	2	174.720	0.4914
Genotip	2	5379.221	15.1276 *
Hata 1	4	355.589	
Besi Ortamı	4	1168.543	7.7608 **
Genotip x Besi Ortamı	8	364.544	2.4211 *
Hata2	24	150.569	

* : P≤0.05 hata sınırlar içinde istatistiksel olarak önemli.
** : P≤0.01 hata sınırlar içinde istatistiksel olarak önemli.

Çizelgeden izlendiği gibi, embriyogenik kallus oluşturan hipokotillerin oranı genotip ve besi ortamından istatistiksel olarak önemli derecede etkilenmiştir. Ayrıca, bu iki faktörün interaksiyonu istatistiksel olarak önemli çıkmıştır. Çeşitlere bağlı olarak embriyogenik kallus indüksiyon oranı % 12.0 ile % 58.5 arasında değişmiştir (Çizelge 4.15). Çukurova 1518 ve Coker 312 çeşitleri birbirlerinden istatistiksel

Çizelge 4.15. Farklı Pamuk Genotiplerinin Hipokotil Eksplantlarının Farklı Besi Ortamlarındaki Embriyogenik Kallus Oluşturma Oranı (%) Ortalamaları

Genotip	Besi Ortamı No					Ortalama
	1	2	3	4	5	
Çuk. 1518	40.0 bcde+	33.3 cdef	20.0 efg	53.3 bc	73.3 ab	44.0 A*
Coker 312	33.3 cdef	46.7 bcd	33.3 cdef	86.3 a	92.7 a	58.5 A
Erşan 92	13.3 efg	20.0 defg	6.7 g	6.7 g	13.3 efg	12.0 B
Ortalama	28.9 C**	33.3 BC	20.0 C	48.8 AB	59.8 A	

* : Aynı sütun içinde benzer harf ile gösterilen ortalamalar LSD testine göre P≤0.05 hata sınırları içerisinde istatistiksel olarak farklı değildir.

** : Aynı satır içinde benzer harf ile gösterilen ortalamalar Duncan testine göre P≤0.05 hata sınırları içerisinde istatistiksel olarak farklı değildir.

\+ : Benzer harf ile gösterilen Genotip-Besi Ortamı kombinasyonu ortalamaları Duncan testine göre P≤0.05 hat sınırları içerisinde istatistiksel olarak farklı değildir.

olarak farklı olmayan, ancak Erşan 92 çeşidine göre istatistiksel olarak daha yüksek embriyogenik kallus indüksiyon oranı ortalamaları göstermişlerdir.

Farklı genotiplerin embriyogenik kallus oluşumu yönünden farklı tepkiler vermesi ile ilgili bulgularımız, Shoemaker ve ark. (1986), Trolinder ve Goodin (1987), Zimmerman ve Robacker (1988), Trolinder ve Xhixian (1989), Gawel ve Robacker (1990), Firoozabady ve DeBoer (1993), Senechal ve ark. (1994), Wang ve ark. (1994), Brar ve ark. (1998), Sakhanokho ve ark. (1998), Sakhanokho ve ark. (2001) ve Mishra ve ark. (2003)'nın bulgularını destekler niteliktedir.

Araştırmamızda en yüksek embriyogenik kallus indüksiyon oranını veren Coker 312 pamuk çeşidinin embriyogenik kallus oluşturma potansiyeli nedeniyle pamuk biyoteknolojisinde model bitki olarak kullanıldığı bilinmektedir (Umbeck ve ark., 1987; Trolinder ve Goodin, 1987; Trolinder ve Goodin, 1988a ve b; Trolinder ve Xhixian, 1989; Gawel ve Robacker, 1990; Carvalho ve ark., 1992; Senechal ve ark.,1994; Wang ve ark. (1994); Sunilkumar ve Rathore, 2001; Mishra ve ark., 2003). Embriyogenik kallus indüksiyon oranı açısından Çukurova 1518 çeşidinin istatistiki olarak Coker 312 ile aynı grupta yer almasını ise, anılan çeşidin Coker kanı taşımasına bağlayabiliriz. Çukurova 1518 pamuk çeşidi, ABD'de Coker 201 ve diğer ülkelerde ve ülkemizde de Carolina Queen 201 olarak bilinen çeşitten seleksiyonla elde edilmiştir (Harem, 2000). Düşük oranda embriyogenik kallus indüksiyon oranı gösteren Erşan 92 çeşidi ise, Coker çeşitlerinin tersine, doku kültüründe iyi reaksiyon

göstermedikleri bilinen (Gawel ve Robacker; 1990; Senechal ve ark., 1994 ve Mishra ve ark., 2003) Acala tipi pamuklar ile akrabalık ilişkisi içersindedir (Harem, 2000). Erşan 92 pamuk çeşidi, Sayar 314 çeşidi ile Taşkent 1 melezlemesi sonucunda elde edilmiştir ve Sayar 314 çeşidinin ise Acala 130/314 soyu ile Deltapine 15'in melezlenmesi ile elde edildiği bilinmektedir (Harem, 2000).

İncelenen besi ortamlarına bağlı olarak, embriyogenik kallus indüksiyon oranı % 28.9 ile % 59.8 arasında değişmiştir (Çizelge 4.15). En yüksek embriyogenik kallus indüksiyon oranı ortalaması (% 59.8), 5 nolu ortamda (0.1 mg/l kinetin+ 2 mg/l NAA içeren MSB ortamı) kültür edilen hipokotil eksplantlarından elde edilmiştir. 4 nolu ortamda (0.1 mg/l PBA + 2 mg/l NAA içeren MSB ortamı) kültüre alınan hipokotil eksplantları, 5 nolu ortamda kültüre alınan hipokotil eksplantlarından istatistiksel olarak farklı olmayan embriyogenik kallus indüksiyon oranı ortalaması (% 48.8) göstermiştir. Ancak, 4 nolu ortamda elde edilen embriyogenik kallus indüksiyon oranı ortalamasının, 5 nolu ortam yanında 2 nolu ortamda (0.1 mg/l PBA+ 1 mg/l 2.4-D içeren MSB ortamı) elde edilen embriyogenik kallus indüksiyon oranı ortalamasından da istatistiksel olarak farklılık göstermediği ortaya çıkmıştır. 1 (0.1 mg/l PBA+ 0.5 mg/l 2,4-D içeren MSB ortamı) ve 3 (0.5 mg/l PBA+ 1 mg/l 2,4-D içeren MSB ortamı) nolu ortamlarda kültüre alınan hipokotil eksplantları ise, 4 ve 5 nolu ortamdakilere göre istatistiksel olarak önemli derecede daha düşük embriyogenik kallus indüksiyon oranı ortalamaları göstermişlerdir. Araştırmada elde edilen, NAA içeren besi ortamlarında yüksek embriyogenik kallus indükisyon oranlarının elde edilmesi şeklindeki bulgu, Shoemaker ve ark. (1986), Trolinder ve Goodin (1988a), Gawel ve Robacker (1990), Firoozabady ve DeBoer (1993), Rajasegar ve ark. (1996), Brar ve ark. (1998), Sakhanokho ve ark. (2001), Sunilkumar ve Rathore (2001) ve Mishra ve ark. (2003)'nın bulgularını desteklemektedir.

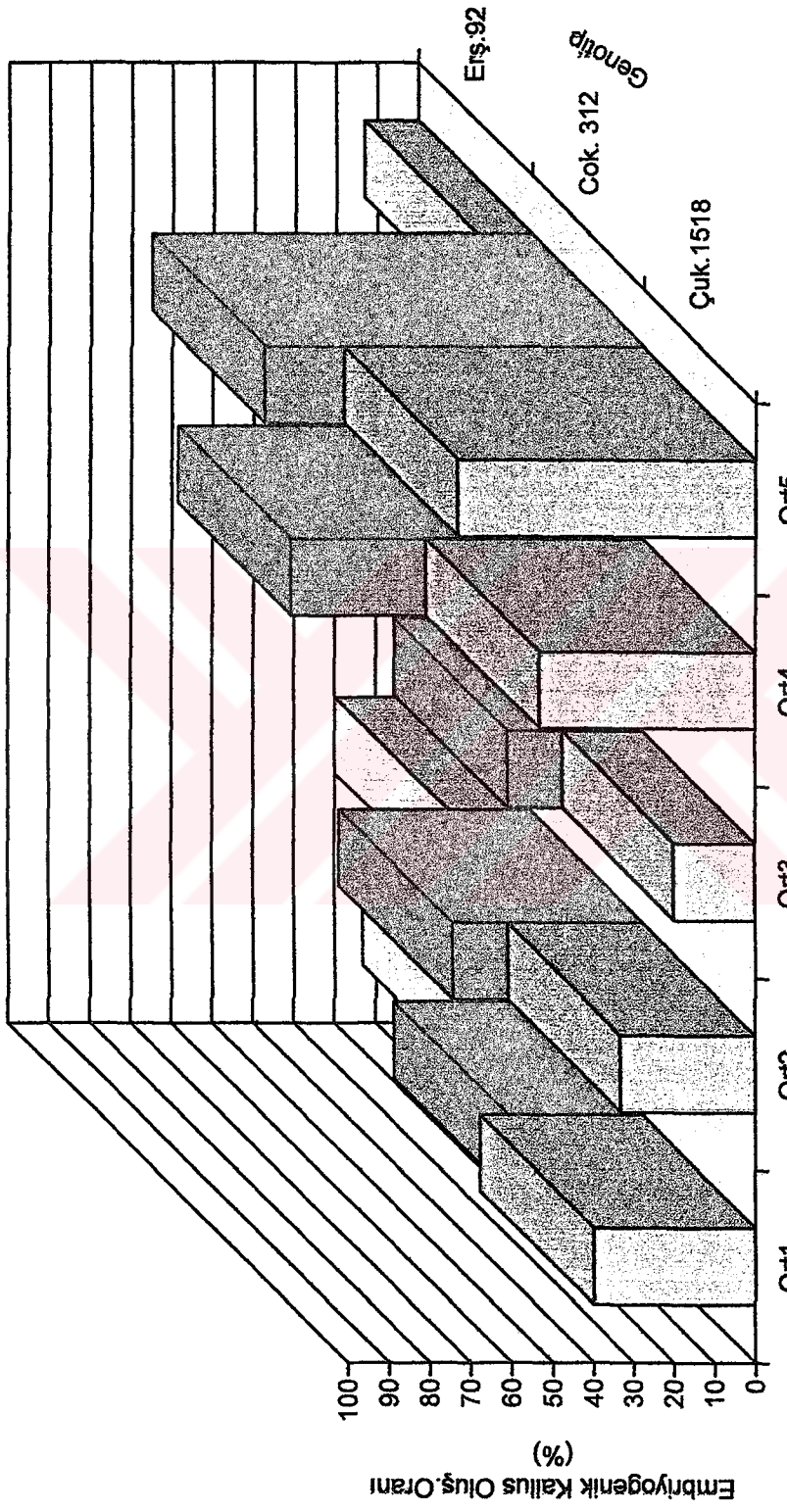
Embriyogenik kallus oluşumu ve çoğalmasının besi ortamlarına bağlı olarak farklılık göstermesi yönündeki bulgular ise, Trolinder ve Goodin (1987), Trolinder ve Goodin (1988 a), Zimmerman ve Robacker (1988), Trolinder ve Xhixian (1989), Gawel ve Robacker (1990), Rajasegar ve ark. (1996), Holmuratov ve ark. (2000),

Zhang ve ark. (2001) ve Mishra ve ark. (2003)'nın bulguları ile benzerlik göstermektedir.

Varyans analizi sonuçlarında genotip x besi ortamı interaksiyonunun istatistiki olarak önemli çıkması, besi ortamlarının embriyogenik kallus indüksiyon oranı üzerindeki etkisinin genotiplere bağlı olarak farklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır. Nitekim, Coker 312 çeşidinde 4 ve 5 nolu ortamlar diğer ortamlara göre istatistiksel olarak önemli derecede daha yüksek embriyogenik kallus indüksiyon oranları sağlamasına karşılık, Erşan 92 çeşidinde besi ortamları embriyogenik kallus indüksiyon oranı açısından istatistiksel olarak önemli bir farklılık yaratmamıştır (Çizelge 4.15 ve Şekil 4.11). Çukurova 1518 çeşidinde ise, 1, 4 ve 5 nolu ortamlar birbirinden istatistiksel olarak farklı olmayan embriyogenik kallus indüksiyon oranı sağlamışlardır. İçerdikleri büyüme düzenleyicisi çeşit ve konsantrasyonu açısından farklı besi ortamlarının farklı genotiplerde farklı kallus indüksiyon oranına neden olmaları, farklı genotiplerden alınan hipokotil eksplantlarının genotipik yapılarının farklı olması nedeniyle farklı düzeylerde hormon içermeleri ve içerdikleri hormon konsantrasyonuna bağlı olarak ta besi ortamında bulunan büyüme düzenleyicilerinden farklı düzeylerde etkilenmeleri ile açıklanabilir. Nitekim, Hatipoğlu (2002), farklı genotiplerin *in vitro* kültürde farklı besi ortamlarına gereksinim duyabildiklerini bildirmektedir.

4.3.1.2.(3). Somatik Embriyo Sayısı (somatik embriyo/ g kallus)

Embriyogenik olarak tanımlanan kalluslar sıvı kültüre aktarılmış, 6-8 hafta sonra ise somatik embriyo gelişme ortamına geçirilmiştir. Gelişme ortamında 4-6 haftalık kültür sonrasında oluşan globular, kalp ve ileri dönem embriyoların sayımı yapılmıştır. Erşan 92 çeşidinden hem yeterli düzeyde embriyogenik kallus elde edilememesi, hem de sıvı kültürden gelişme ortamına aktarılan bu kalluslarda somatik embriyo oluşumu izlenememiş olması nedeniyle, bu çeşit somatik embriyo sayısı açısından değerlendirme dışı bırakılmıştır.



Şekil 4.11. Farklı Besi Ortamlarının Farklı Pamuk Genotiplerinde Embriyogenik Kallus Oluşturan Hipokotil Oranı (%) Üzerindeki Etkileri

Farklı pamuk çeşitlerinin hipokotillerinden farklı besi ortamlarında oluşan 1 g embriyogenik kallus başına elde edilen somatik embriyo sayılarına uygulanan varyans analizi sonuçları Çizelge 4.16'da verilmiştir.

Çizelge 4.16. Farklı Pamuk Çeşitlerinin Hipokotil Eksplantlarının Farklı Besi Ortamlarında Oluşturdukları Kalluslardan Elde Edilen Somatik Embriyo Sayıları ile İlgili Varyans Analiz Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F Değeri
Tekerrür	1	0.961	22.0122
Genotip	1	975.655	22356.9121 **
Hata 1	1	0.044	
Besi Ortamı	4	121.638	32.0544 **
Genotip x Besi Ortamı	4	48.039	12.6595 **
Hata2	8	3.795	
Genel	19		

* : P≤0.05 hata sınırlar içinde istatistiksel olarak önemli.
** : P≤0.01 hata sınırlar içinde istatistiksel olarak önemli.

Çizelgeden izlendiği gibi; 1 g embriyogenik kallus başına oluşan somatik embriyo sayısı, genotipler ve embriyogenik kallusların oluştuğu besi ortamından istatistiksel olarak önemli derecede etkilenmiştir. Ayrıca, bu iki faktörün interaksiyonunun istatistiksel olarak önemli olduğu ortaya çıkmıştır.

Coker 312 çeşidi 1 g embriyogenik kallus başına oluşan 352.1 adet somatik embriyo sayısı ortalaması ile 1 g embriyogenik kallus başına 20.2 adet somatik embriyo oluşturan Çukurova 1518 çeşidine göre 1 g embriyogenik kallus başına istatistiksel olarak önemli derecede daha yüksek somatik embriyo sayısı göstermiştir (Çizelge 4.17).

Farklı genotiplerin embriyogenesis kapasitesi ve somatik embriyo oluşturma açısından farklılık göstermesi ile ilgili bulgularımız; Shoemaker ve ark. (1986), Trolinder ve Goodin (1987), Zimmerman ve Robacker (1988), Trolinder ve Xhixian (1989), Gawel ve Robacker (1990), Firoozabady ve DeBoer (1993), Senechal ve ark. (1994), Wang ve ark. (1994), Brar ve ark. (1998), Sakhanokho ve ark. (1998), Sakhanokho ve ark. (2001) ve Mishra ve ark. (2003)'nın bulgularını destekler niteliktedir.

Çizelge 4.17. Farklı Pamuk Çeşitlerinin Hipokotil Eksplantlarının Farklı Besi Ortamlarında Oluşturdukları Kalluslardan Elde Edilen Somatik Embriyo Sayıları (somatik embriyo sayısı / gram kallus) Ortalamaları

Genotip	Besi Ortamı No					Ortalama
	1	2	3	4	5	
Çuk.1518	12.5 d +	0.0 d	0.0 d	8.5 d	80.0 c	20.2 B*
Cok. 312	423.0 ab	300.0 b	8.5 d	435.5 a b	593.5 a	352.1 A
Ortalama	217.8 B**	150.0 B	4.3 C	221.8 B	336.8 A	

* : Aynı sütun içinde benzer harf ile gösterilen ortalamalar P≤0.05 hata sınırları içerisinde istatistiksel olarak farklı değildir.

** : Aynı satır içinde benzer harf ile gösterilen ortalamalar Duncan testine göre P≤0.05 hata sınırları içerisinde istatistiksel olarak farklı değildir.

\+ : Benzer harf ile gösterilen Genotip-Besi Ortamı kombinasyonu ortalamaları Duncan testine göre P≤0.05 hat sınırları içerisinde istatistiksel olarak farklı değildir.

Embriyogenik kallusların oluştuğu besi ortamlarına bağlı olarak, söz konusu embriyogenik kalluslarda bir gram embriyogenik kallus başına oluşan somatik embriyo sayısı, 4.3 ile 336.8 arasında değişmiştir. En yüksek somatik embriyo sayısı ortalaması, 336.8 somatik embriyo/g kallus ile 5 nolu ortamda (0.1 mg/l kinetin+ 2 mg/l NAA içeren MSB ortamı) oluşan embriyogenik kalluslardan elde edilmiştir. Söz konusu ortamda oluşan embriyogenik kalluslardan elde edilen bu somatik embriyo sayısı ortalamasının, diğer ortamlarda oluşan embriyogenik kalluslardan elde edilen somatik embriyo sayısı ortalamalarından istatistiksel olarak önemli derecede daha yüksek olduğu ortaya çıkmıştır. 1 (0.1 mg/l PBA+ 0.5 mg/l 2,4-D içeren MSB ortamı), 2 (0.1 mg/l PBA+ 1 mg/l 2,4-D içeren MSB ortamı) ve 4 nolu ortamda (0.1 mg/l PBA+ 2 mg/l NAA içeren MSB ortamı) oluşan embriyogenik kallusların birer gramı başına elde edilen somatik embriyo sayısı ortalamaları ise birbirinden istatistiksel olarak farksız, ancak 3 nolu ortamda (0.5 mg/l PBA+ 1 mg/l 2,4-D içeren MSB ortamı) oluşan embriyogenik kalluslardan elde edilen somatik embriyo sayısı ortalamasından istatistiksel olarak önemli derecede daha yüksek olmuştur.

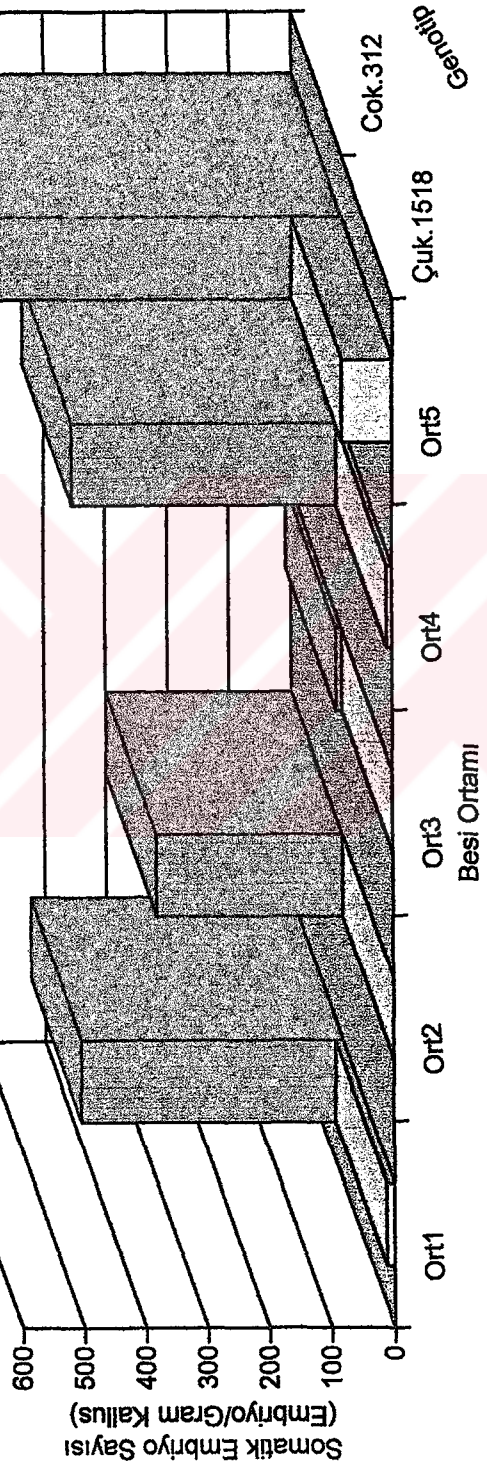
Somatik embriyo sayısının kallus oluşumu ve sürdürülmesi için kullanılmış olan besi ortamlarına bağlı olarak farklılık göstermesi ile ilgili bu bulgular, Trolinder ve Goodin (1987), Trolinder ve Goodin (1988a), Zimmerman ve Robacker (1988), Trolinder ve Xhixian (1989), Gawel ve Robacker (1990), Rajasegar ve ark. (1996),

Zhang ve ark. (2001) ve Mishra ve ark. (2003)'nın bulguları ile benzerlik göstermektedir.

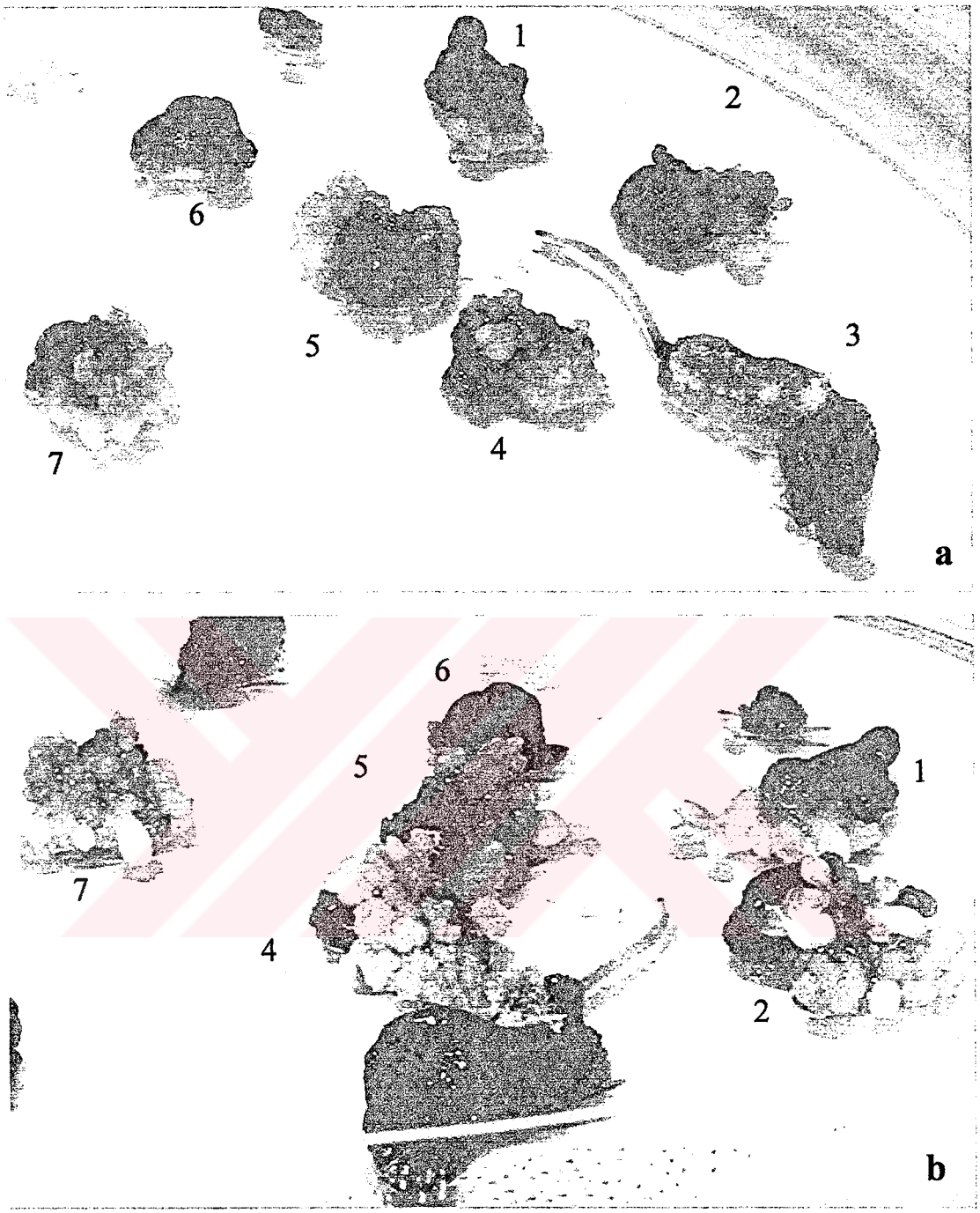
Varyans analizi sonuçları, genotip X besi ortamı interaksiyonunun istatistiksel olarak önemli olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.16). Bu sonuç, embriyogenik kallusların oluştuğu besi ortamlarının somatik embriyo sayısı üzerindeki etkisinin genotiplere bağlı olarak değiştiğine işaret etmektedir. Nitekim; Çukurova 1518 çeşidinde, 5 nolu ortamda oluşan embriyogenik kalluslar, diğer ortamlarda oluşan embriyogenik kalluslara göre istatistiksel olarak önemli derecede daha yüksek somatik embriyo sayısı ortalaması göstermiştir (Çizelge 4.17 ve Şekil 4.12). Buna karşılık, Coker 312 çeşidinde, 1 ve 4 nolu ortamlarda oluşan embriyogenik kalluslar, 5 nolu ortamda oluşan embriyogenik kalluslardan istatistiksel olarak farklı olmayan somatik embriyo sayısı ortalaması sağlamışlardır. Diğer taraftan, tüm besi ortamlarının ortalaması olarak embriyogenik kallusları Çukurova 1518 çeşidine göre daha yüksek somatik embriyo sayısı sağlayan Coker 312 çeşidinin embriyogenik kallusları, 3 nolu ortamda Çukurova 1518 çeşidinin embriyogenik kalluslarından elde edilen somatik embriyo sayısı ortalamasından istatistiksel olarak farklı olmayan somatik embriyo sayısı ortalaması sağlamıştır.

4.3.1.2.(4). Anormal Somatik Embriyo Oluşumu

Sıvı kültür sonrasında gelişme ortamına aktarılan farklı gelişme devresindeki somatik embriyo ve pro-embriyoidler içeren hücre kümeleri üzerinde anormal embriyo gelişimleri gözlenmiştir. Normal görünümlü embriyolar köklendirme ortamına aktarılırken, anormal görünümlü ve üzerlerinde ikincil somatik embriyo oluşumları gözlenen embriyolar gelişme ortamına aktarılmışlar, kültürün 1. haftasında embriyo sayımları (somatik embriyo sayısı/anormal embriyo) yapılmıştır. Bu amaçla ilk tepkilerin alındığı ve çok sayıda embriyonun elde edildiği Coker 312 pamuk çeşidinin kültürleri kullanılmıştır. İlk gözlemlerde saptanan 27 adet anormal görünümlü embriyonun boylarının 6-12 mm arasında değiştiği, 5 adetinde kotiledon içermeyen hipokotilin bulunduğu, 16 adetinin üzerlerinde açık kahverengi kallus oluşumu başladığı gözlenmiştir (Şekil 4.13). Aynı zamanda, incelenen 27 adet



Şekil 4.12. Farklı Pamuk Çeşitlerinde Farklı Besi Ortamlarının Hipokotillerden Elde Edilen Embriyogenik Kalluslardan Oluşan Somatik Embriyo Sayısı Üzerine Etkisi



Şekil 4.13. Somatik Embriyogenesis Çalışmalarında Oluşan Anormal Somatik Embriyolar ve Üzerlerinde İkincil Somatik Embriyo Oluşumları. a. Gelişme Ortamında Kültüre Alınan Anormal Embriyolar ve Üzerlerinde İkincil Somatik Embriyo Oluşumları, b. Bir hafta Sonra Anormal Embriyolar Üzerindeki Somatik Embriyoların Gelişimleri .

somatik embriyonun 9 adedinin üzerinde farklı gelişme dönemlerinde bulunan ikincil somatik embriyo oluşumu saptanmış, gelişme ortamına aktarılmaları aşamasında yapılan sayımlarda 9 anormal embriyodan toplam 300 adet globular ve 38 adet ileri dönem somatik embriyo oluştuğu belirlenmiştir.

Somatik embriyogenesis çalışmalarımızda anormal somatik embriyo oluşumu ile ilgili bulgularımız, Firoozabady ve DeBoer (1993), Trolinder ve Goodin (1988), Zhang ve ark.(1996), Zhang ve ark. (2000), Sakhanokho ve ark. (2001)'nın bulguları ile benzerlik göstermektedir. Aynı zamanda anormal somatik embriyolar üzerinde ikincil somatik embriyo oluşumları ve bunların kültürde normal embriyolar olarak gelişim seyirlerini sürdürmesine dair gözlemimiz, somatik embriyogenesis yoluyla elde ettikleri anormal *in vitro* bitkileri eksplant olarak kullanan ve bu şekilde etkin bir rejenerasyon sistemi geliştirmiş olan Zhang ve ark. (2000)'nın bulgularını destekler niteliktedir.

4.3.2. Olgunlaşmamış Embriyo Eksplantı İle İlgili Bulgular ve Tartışma

4.3.2.1. Çukurova 1518 Pamuk Çeşidi İle Yürütülen Besi Ortamı Belirleme Denemesi İle İlgili Bulgular ve Tartışma

Kültüre alınan olgunlaşmamış embriyolarda yapılan periyodik gözlemlerle kallus oluşumu ve oluşan kallusun özellikleri saptanmaya çalışılmıştır. Yapılan ilk incelemelerde, embriyolarda şişkinleşme olduğu gözlenmiştir. Kültürün 3-4. haftasında, özellikle 21 ve 28 günlük embriyolarda çimlenme başlangıcı ortaya çıkmıştır. 3. hafta sonunda şişkinleşmiş ve kısmen de çimlenmeye başlayan embriyolar, indüksiyon ortamında alt kültüre alınmıştır. Alt kültür ortamında, alt kültürün ilk haftasından itibaren hipokotil tabanlarından kallus oluşumu başlamıştır. Embriyoların ilk kültüre alınmalarından 7 hafta sonra, kültür kaplarında kallus oluşturan embriyolar sayılarak, kallus indüksiyon oranı saptanmıştır. Genel olarak kullanılan besi ortamlarının tamamında oranları değişmek üzere kallus oluşumu gözlenmiştir. Aynı zamanda kullanılan farklı besi ortamlarında oldukça farklı morfolojiye ve gelişim seyrine sahip kallus oluşumu saptanmıştır. Elde edilen

kallusların açık krem renkli, gevşek sulu yapılı; sarımsı yeşil kırılgan; yeşil kompakt ileri dönemde karlı; kolay çoğalabilen veya gelişme göstermeyen gibi farklı özelliklere sahip olduğu saptanmıştır. Oluşan kalluslar sonraki alt kültüre aktarılırken pek çok araştırıcı tarafından (Davidonis ve Hamilton, 1983; Shoemaker ve ark., 1986; Firoozabady ve ark., 1987; Trolinder ve Goodin, 1987; Trolinder ve Goodin, 1988a ve b; Zimmerman ve Robacker, 1988; Trolinder ve Xhixian, 1989; Gawel ve Robacker, 1990; Firoozabady ve DeBoer, 1993; Sakhanokho ve ark.,1998; Sakhanokho ve ark., 2001; Zhang ve ark., 2001; Mishra ve ark., 2003) tanımlandığı şekilde; embriyogenik [sarımsı yeşil, sarımsı krem, granüler ve kırılgan (+ +)], ve orta derecede embriyogenik [sarımsı yeşil, orta derecede kırılgan (+)] özellikte kallus oluşturan embriyoların sayısı belirlenmiş ve petri kutusu başına eksplantların embriyogenik kallus oluşturma oranları yüzde olarak saptanmıştır. Genel olarak oksinlerin yüksek olduğu ortamlarda kallus oluşumunun daha fazla olduğu, 2,4-D içeren ortamlarda krem sarı renkli kırılgan veya gevşek yapılı, NAA içeren ortamlarda ise daha çok yeşilimsi sarı veya çoğunlukla koyu yeşil kompakt kalluslar oluştuğu gözlenmiştir.

4.3.2.1.(1). Kallus İndüksiyon Oranı (%)

Çukurova 1518 çeşidinin farklı yaşlardaki olgunlaşmamış embriyolarının içerikleri büyüme düzenleyicisi çeşidi ve konsantrasyonu yönünden farklı 9 besi ortamında saptanan kallus indüksiyon oranlarına (%) ilişkin varyans analiz sonuçları, Çizelge 4.18'de verilmiştir. Çizelgeden izlendiği gibi, embriyo yaşı ve besi ortamı kallus indüksiyon oranını istatistiksel olarak önemli derecede etkilemiştir.

Embriyo yaşı arttıkça, kallus indüksiyon oranı önemli derecede artış göstermiş ve 28 günlük embriyolar, diğer daha genç embriyolara göre istatistiksel olarak önemli derecede daha yüksek kallus indüksiyon oranı ortalaması göstermiştir (Çizelge 4.19). 21 günlük embriyolar ise, 14 günlük embriyolara göre daha yüksek kallus indüksiyon oranı ortalaması göstermiştir. Embriyo yaşı ile kallus indüksiyon oranı arasındaki ilişkiyi ortaya koyan bu bulgular, Vlachostergios ve ark. (1998)'nın bulgularını desteklemektedir. Diğer taraftan, embriyo yaşının artması ile kallus

Çizelge 4.18. Çukurova 1518 Pamuk Çeşidinin Farklı Yaşlardaki Olgunlaşmamış Embriyolarının Farklı Besi Ortamlarındaki Kallus İndüksiyon Oranları ile İlgili Varyans Analiz Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F Değeri
Tekerrür	2	181. 031	1.6761
Embriyo yaşı	2	5262. 271	48.7230 **
Hata 1	4	108. 004	
Besi Ortamı	8	1505. 095	5.8378 **
Embriyo Yaşı x B. Ortamı	16	202. 574	0.7857
Hata 2	48	257. 818	1.6761
Genel	80		

** : P≤0.01 hata sınırları içinde istatistiksel olarak önemli.

indüksiyon oranının artması, daha büyük eksplantların in vitro kültürde daha iyi reaksiyon göstediğini bildiren Hatipoğlu (2002)'nun görüşünü de desteklemektedir.

Kallus indüksiyon oranı, besi ortamlarına bağlı olarak, % 34.4 ile % 83.3 arasında değişmiştir. En yüksek kallus indüksiyon oranı (83.1), 6 nolu ortamda (0.5 mg/l PBA + 1 mg/l 2,4-D içeren MSB ortamı) elde edilmiştir. 1 (0.1 mg/l PBA + 0.1 mg/l 2,4-D içeren MSB ortamı), 2 (0.1 mg/l PBA + 0.5 mg/l 2,4-D içeren MSB ortamı), 3 (0.1 mg/l PBA + 1 mg/l 2,4-D içeren MSB ortamı) ve 5 nolu (0.5 mg/l PBA + 0.5 mg/l 2,4-D içeren MSB ortamı) ortamlar 6 nolu ortamdan istatistiksel olarak farklı olmayan kallus indüksiyon oranı ortalamaları sağlamışlardır. En düşük kallus indüksiyon oranı ise 8 nolu ortamdan (1 mg/l PBA + 1 mg/l 2,4-D içeren MSB ortamı) elde edilmiştir. Genellikle, ortamda 2,4-D konsantrasyonu arttıkça, kallus indüksiyon oranında artış eğilimi ortaya çıkmıştır.

Embriyo yaşı ve kullanılan besi ortamları dikkate alındığında, en yüksek tepki 28 günlük embriyolarda elde edilmiş, kallus gelişimi de bu eksplantlarda diğerlerine göre daha iyi olmuştur. Çizelge 4.19'daki embriyogenik kallus oluşumu ile ilgili gözlemler de dikkate alınarak, eksplant olarak 28 günlük embriyoların, besi ortamı olarak 2, 3 ve 6 nolu besi ortamlarının ve hipokotiller için kullanılan diğer iki besi ortamının sonraki çalışmalarda kullanılması kararlaştırılmıştır.

Çizelge 4.19. Çukurova 1518 Pamuk Çeşidinin Farklı Yaşlardaki Embriyolarının Farklı Besi Ortamlarındaki Kallus İndüksiyon Oranı (%) Ortalamaları ve Kallus Özellikleri

Embriyo Yaşı	Besi Ortamı No									Ortalama
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
14 günlük	46.7	60.0	60.0	20.0	36.7	70.0	20.0	10.0	40.0	40.4 C*
21 günlük	43.3	70.0	79.7	36.7	86.3	89.3	50.0	40.0	63.3	62.1 B
28 günlük	89.7	99.0	80.0	66.7	96.0	90.0	60.0	53.3	70.0	78.3 A
Ortalama	59.9ABC**	76.3 AB	73.2 AB	41.1 CD	73.0 AB	83.1 A	43.3 CD	34.4 D	57.8 BC	60.2
Kallus Özelliği	+	++	++	-	-	++	-	-	-	

* : Aynı sütun içinde benzer harf ile gösterilen ortalamalar LSD testine göre P≤0.05 hata sınırları içerisinde istatistiksel olarak farklı değildir.
** : Aynı satır içinde benzer harf ile gösterilen ortalamalar Duncan testine göre P≤0.05 hata sınırları içerisinde istatistiksel olarak farklı değildir.
++ : Embriyogenik (sarımsı yeşil, sarımsı krem, granüler ve kırılgan) kallus
+ : Orta derecede embriyogenik (sarımsı yeşil, orta derecede kırılgan) kallus

4.3.2.2. Çukurova 1518, Coker 312 ve Erşan 92 Pamuk Çeşitleri İle Yürütülen Deneme ile İlgili Bulgular ve Tartışma

Üç çeşit ile yürütülen olgunlaşmamış embriyo kültürü sırasında yapılan gözlemler, kallus oluşumunun Çukurova 1518 çeşidinde yürütülen denemedekine benzer şekilde seyrettiğini ortaya koymuştur. İlk kültür aşamasında özellikle 4 ve 5 nolu besi ortamlarında ve az miktarda da 1 nolu ortamda embriyoların çimlenme eğiliminde oldukları gözlenmiştir. Embriyo eksplantlarından embriyogenik kallus oluşumu ve gelişmesi beklendiği kadar fazla olmamış, genel olarak hipokotillere göre daha düşük tepki alınmıştır. Nitekim az miktarlarda oluşan kalluslar çoğaltılmaları için aynı besi ortamlarında 4-6 haftada bir alt kültürlere alınmıştır. Kallusların çoğaltılma aşamasında kallus yapılarında farklılaşma ve embriyogenik özelliklerin azalıp kallusların kahverengi, krem sulu veya kompakt yeşil kalluslara dönüştüğü gözlenmiştir. Olgunlaşmamış embriyoların kültüre alınması sırasında sıvı kültür yapma olanağımızın bulunmaması nedeniyle, 4 alt kültür sonra olgunlaşmamış embriyolardan elde edilen kalluslar hormonsuz katı besi ortamına aktarılmış, ancak yalnızca Coker 312 çeşidinde 2, 4 ve 5 nolu ortamlardan gelen kalluslarda globular embriyo benzeri yapılar gözlenmiştir. Ancak, bu yapılarda herhangi bir gelişme görülmemiştir. Bu durumun kallusların hormonlu besi ortamlarında uzun süreli alt kültüre alınmasının sonucu olduğunu söyleyebiliriz. Nitekim başlangıçta embriyogenik olarak tanımlanan kalluslarda kültür süresi boyunca farklılaşmalar ve deformasyonlar görülmüştür. Daha sonra sıvı ortam yapma olanağı bulunduğunda, her üç genotipten alınan kalluslar sıvı kültüre aktarılmıştır. Ancak yalnız Coker 312 çeşidinden ve hipokotil eksplantlarına kıyasla daha az sayıda somatik embriyolar (517 globular + 19 ileri dönem embriyo /gram kallus) elde edilmiştir.

4.3.2.2.(1). Kallus İndüksiyon Oranı (%)

Farklı besi ortamlarında kültüre alınan üç farklı pamuk çeşidinin 28 günlük embriyolarından elde edilen kallus indüksiyon oranı değerlerine uygulanan varyans analizi sonuçları Çizelge 4.20'de verilmiştir.

Çizelge 4.20. Farklı Pamuk Çeşitlerinin 28 Günlük Olgunlaşmamış Embriyolarının Farklı Besi Ortamlarındaki Kallus İndüksiyon Oranları ile İlgili Varyans Analiz Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F Değeri
Tekerrür	2	30.796	0.3185
Genotip	2	462.109	4.7798
Hata 1	4	96. 680	
Besi Ortamı	4	332.279	1.6480
Genotip x Besi Ortamı	8	109.219	0.5417
Hata2	24	201.622	
Genel	44		

** : P≤0.01 hata sınırlar içinde istatistiksel olarak önemli.

Çizelgeden izlendiği gibi, incelenen genotip ve besi ortamı faktörleri kallus indüksiyon oranını istatistiksel olarak önemli derecede etkilememiştir.

Kallus indüksiyon oranı, genotiplere bağlı olarak % 72.9 ile % 83.0 arasında değişmiştir (Çizelge 4.21).

Çizelge 4.21. Farklı Pamuk Genotiplerinin Farklı Besi Ortamlarında 28 Günlük Embriyolardan Kallus İndüksiyon Oranı (%) Ortalamaları

Genotip	Besi Ortamı No					Ortalama
	1	2	3	4	5	
Çukurova 1518	88.0	73.3	79.7	83.0	91.0	83.0
Coker 312	86.3	79.3	85.0	88.0	93.7	86.5
Erşan 92	64.7	60.0	60.0	89.7	90.3	72.9
Ortalama	79.7	70.9	74.9	86.9	91.7	

Besi ortamlarına bağlı olarak ise, % 70.9 ile % 91.7 arasında değişen kallus indüksiyon oranları elde edilmiştir. Ancak, bu değişimlerin istatistiksel olarak önemli olmadığı ortaya çıkmıştır. 28 günlük embriyolardan kallus indüksiyon oranı ile ilgili bu bulgular, besi ortamı belirlenmesi amacıyla yürütülmüş olan çalışmada 9 besi

ortamı arasından en çok tepki veren besi ortamlarının seçilmiş olduğu dikkate alındığında beklenen niteliktedir.

4.3.2.2.(2). Embriyogenik Kallus İndüksiyon Oranı (%)

Üç farklı pamuk çeşidinin 28 günlük embriyolarından beş farklı besi ortamında saptanan embriyogenik kallus indüksiyon oranı değerlerine uygulanan varyans analizi sonuçları Çizelge 4.22'de verilmiştir.

Çizelge 4.22. Farklı Pamuk Çeşitlerinin Olgunlaşmamış Embriyo Eksplantlarının Farklı Besi Ortamlarındaki Embriyogenik Kallus Oluşturma Oranları ile İlgili Varyans Analiz Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F Değeri
Tekerrür	2	99.772	0.9389
Genotip	2	2373.832	22.3396 **
Hata 1	4	106.261	
Besi Ortamı	4	768.123	4.8540 **
Genotip x Besi Ortamı	8	154.101	0.9738
Hata2	24	158.246	
Genel	44		

** : P≤0.01 hata sınırlar içinde istatistiksel olarak önemli.

Çizelgeden izlendiği gibi, genotip ve besi ortamı faktörü embriyogenik kallus indüksiyon oranını istatistiksel olarak önemli derecede etkilemiştir.

Coker 312 çeşidi, % 54.1'lik embriyogenik kallus indüksiyon oranı ile incelenen diğer iki çeşide göre istatistiksel olarak önemli derecede daha yüksek embriyogenik kallus indüksiyon oranı göstermiştir (Çizelge 4.23). Çukurova 1518 çeşidi ise, Erşan 92 çeşidine göre istatistiksel olarak daha yüksek embriyogenik kallus indüksiyon oranı göstermiştir. Embriyogenik kallus indüksiyon oranının genptiplere bağlı olarak değişimi ile ilgili bu bulgular; Shoemaker ve ark. (1986), Trolinder ve Goodin (1987), Zimmerman ve Robacker (1988), Trolinder ve Xhixian (1989), Gawel ve Robacker (1990), Firoozabady ve DeBoer (1993), Senechal ve ark. (1994), Wang ve ark. (1994), Brar ve ark. (1998), Sakhanokho ve ark. (1998),

Vlachostergios ve ark. (1998), Sakhanokho ve ark. (2001) ve Mishra ve ark. (2003)'nın bulgularını destekler niteliktedir.

Çizelge 4.23. Farklı Pamuk Genotiplerinin 28 Günlük Olgunlaşmamış Embriyo Eksplantlarının Farklı Besi Ortamlarındaki Embriyogenik Kallus Oluşturma Oranı (%) Ortalamaları

Genotip	Besi Ortamı No					Ortalama
	1	2	3	4	5	
Çukurova 1518	38.7	26.7	20.0	35.3	53.3	34.8 B*
Coker 312	37.7	53.3	26.7	72.3	80.3	54.1 A
Erşan 92	19.7	26.7	6.7	14.7	15.3	16.6 C
Ortalama	32.0 A**	35.6 A	17.8 B	40.8 A	49.7 A	35.1

* : Aynı sütun içinde benzer harf ile gösterilen ortalamalar LSD testine göre P≤0.05 hata sınırları içerisinde istatistiksel olarak farklı değildir.

** : Aynı satır içinde benzer harf ile gösterilen ortalamalar Duncan testine göre P≤0.05 hata sınırları içerisinde istatistiksel olarak farklı değildir.

Besi ortamlarına bağlı olarak, % 17.8 ile % 49.7 arasında değişen embriyogenik kallus indüksiyon oranları elde edilmiştir. Ancak, 3 nolu ortam (0.5 mg/l PBA+ 1 mg/l 2,4-D içeren MSB ortamı) dışındaki ortamlardan elde edilen embriyogenik kallus indüksiyon oranları istatistiksel olarak birbirinden önemli bir farklılık göstermemiştir. 3 nolu ortamda ise, incelenen diğer ortamların tümüne göre istatistiksel olarak daha düşük embriyogenik kallus indüksiyon oranı sağlanmıştır

Farklı besi ortamlarının embriyogenik kallus oluşumu yönünden farklılık göstermesine ile ilgili bulgularımız, Trolinder ve Goodin (1987), Trolinder ve Goodin (1988 a), Zimmerman ve Robacker (1988), Trolinder ve Xhixian (1989), Gawel ve Robacker (1990), Rajasegar ve ark. (1996), Holmuratov ve ark. (2000), Zhang ve ark. (2001) ve Mishra ve ark. (2003)'nın bulguları ile benzerlik göstermektedir.

Somatik embriyogenesis çalışmalarının sonucunda hipokotiller olgunlaşmamış embriyolara göre embriyogenik kallus ve somatik embriyo oluşumu yönünden daha iyi tepki vermişlerdir. Bizim çalışmamızda başlangıç aşamasından sonra hipokotiller bir kez alt kültüre alınırken, olgunlaşmamış embriyolar 4 kez (4-6 haftalık sürelerle) alt kültüre alınmışlar ve kallus morfolojilerinde farklılaşmalar izlenmiştir. Olgunlaşmamış embriyolardan yeterli tepki alınamamasının, kallusların

uzun süre alt kültürde kalmaları nedeniyle embriyogenik özelliklerinin azalmasının sonucunda ortaya çıktığını söyleyebiliriz. Bu konudaki izlenimimiz, kallusun embriyogenesis frekansının önce % 20'den % 90'a yükseldiğini, daha sonra % 60'a düştüğünü ve en yüksek düzeyin embriyogenik hücre kümelerinin oluşumundan sonraki erken dönem olduğunu bildiren Wang ve ark. (1994)'nın bulgularını destekler niteliktedir.

Somatik embriyogenesis çalışmalarında kullanılan her iki eksplant tipinde de kullanılan besi ortamlarında benzer tepkiler elde edilmiştir. En yüksek tepkiler Kin (0.1mg/l) + NAA (2.0 mg/l) içeren besi ortamında elde edilmiş kalluslardan sağlanmıştır. PBA (0.1mg/l) + NAA (2.0 mg/l) içeren besi ortamı ikinci sırada yer almıştır. Çalışmamızda en yüksek tepkinin NAA içeren besi ortamlarında alınması yönündeki bulgumuz, Shoemaker ve ark. (1986), Trolinder ve Goodin (1988 a), Gawel ve Robacker (1990), Firoozabady ve DeBoer (1993), Rajasegar ve ark. (1996), Brar ve ark. (1998), Sakhanokho ve ark. (2001), Sunilkumar ve Rathore (2001), Mishra ve ark. (2003)'nın bulgularını desteklemektedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, ülkemiz açısından büyük ekonomik öneme sahip olan pamuk bitkisinde, biyoteknolojik tekniklerin uygulanmasına bir alt yapı oluşturmak üzere, ülkemizde kültürü yapılan bazı pamuk çeşitlerinin, rejenerasyon çalışmalarında yaygın olarak kullanılan Coker 312 pamuk çeşidi ile de kıyaslanarak *in vitro* kültürde rejenerasyon yeteneklerinin belirlenmesi ve rejenerasyon protokolünün geliştirilmesi amaçlanmıştır. Araştırmada farklı pamuk çeşitlerinin anterlerinden ve farklı eksplantlarından organogenesis ve somatik embriyogenesis yoluyla bitki elde etme olanakları araştırılmıştır.

Anter kültürü çalışmalarında, *Gossypium hirsutum* L. türünden Çukurova 1518, Coker 312, Nazilli 84, Erşan 92, Maraş 92, Adana 98 ve Sayar 314 pamuk çeşitlerinin anterleri; organogenesis çalışmalarında, Çukurova 1518, Coker 312 ve Erşan 92 pamuk çeşitlerinin 2 ve 5 haftalık *in vitro* fidelerinden elde edilen sürgün ucu ve kotiledon nodları; somatik embriyogenesis çalışmalarında, Çukurova 1518, Coker 312 ve Erşan 92 pamuk çeşitlerinin 7 günlük *in vitro* fidelerinden elde edilen hipokotilleri ve 14, 21 ve 28 günlük olgunlaşmamış zigotik embriyoları kullanılmıştır.

Anter kültürü çalışmalarında; Coker 312 dışında kullanılan çeşitlerde genotiplere ve besi ortamlarına göre değişen oranlarda kallus elde edilmiş, kallus oluşumu açısından en yüksek değerler, Adana 98 ve Erşan 92 çeşitlerinin 0.1 mg/l kinetin ile 0.1 veya 0.5 mg/l 2.4-D içeren MS besi ortamlarında kültüre alınan anterlerinden elde edilmiştir. Elde edilen kalluslar farklı büyüme düzenleyicileri içeren katı rejenerasyon ortamlarına aktarılmış, ancak bitki rejenerasyonu gerçekleşmemiştir. Bu konuda yapılacak çalışmalarda, anterlerden elde edilen kallusların, sıvı kültür koşullarında kültürlerine devam edilmesi bitki rejenerasyonu açısından olumlu sonuçlar verebilir.

Organogenesis çalışmalarında kullanılan çeşitlerde en uygun eksplantın sürgün ucu olduğu, eksplant reaksiyon tepkisinin besi ortamlarına göre değiştiği, sürgün rejenerasyon oranı açısından Çukurova 1518 ve Erşan 92 pamuk çeşitlerinin 2 mg/l kinetin + 2 mg/l BAP içeren MSB besi ortamında diğer uygulamalara göre

daha yüksek değerler verdiği belirlenmiştir. Sürgün oluşumu açısından incelenen besi ortamlarından elde edilen *in vitro* bitkiler uzamaları ve köklenmeleri amacıyla bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MSB ortamına aktarılmış ve en yüksek köklenme oranı büyüme düzenleyicisi içermeyen sürgün rejenerasyon ortamında elde edilen sürgünlerde sağlanmıştır. Köklenen sürgünler steril torf içeren saksılara aktarılarak, sera koşullarının sağlandığı bitki büyütme odasında dış koşullara adaptasyonları sağlanmıştır. Köklenmeyen sürgünlerin aynı besi ortamında kültürlerine devam edilmiştir. Büyüme düzenleyicisi içeren rejenerasyon ortamlarında elde edilen sürgünlerde tabanda kallus oluşumu, fenolik bileşik dağılımları izlenmiş ve sağlıklı kök oluşumu, sürgünler 2-3 kez büyüme düzenleyicisi içermeyen MSB besi ortamına aktarılarak sağlanmıştır. Sürgün rejenerasyonu için büyüme düzenleyicisi içermeyen MSB besi ortamında kültüre alınan eksplantlarda çoğalma oranı düşük olmakla birlikte, *in vitro* kültür süresince eksplant tabanlarında kallus oluşumu ve fenolik bileşik dağılımı izlenmemiş, diğer besi ortamlarından gelen sürgünlere göre çok daha kısa sürede (4 hafta) köklenme gözlenmiş, sağlıklı ve güçlü kök yapısına sahip bitkiler elde edilmiştir. Organogenesis çalışmalarımızdan elde edilen sonuçlara göre, pamukta eksplant olarak sürgün uçlarının 2 mg/l kinetin ve 2 mg/l BAP içeren MSB besi ortamında kültüre alınıp, çoğalan sürgünlerin 2 aşama büyüme düzenleyicisi içermeyen MSB ortamına aktarılarak köklenmelerinin sağlanması veya çoğalma oranı düşük olmakla birlikte sağlıklı ve kısa sürede köklenen sürgünlerin elde edildiği büyüme düzenleyicisi içermeyen MSB ortamında direkt olarak kültürü önerilebilir.

Somatik embriyogenesis çalışmalarında ise kullanılan eksplantlara ve besi ortamlarına göre değişen oranlarda embriyogenik kallus elde edilmiştir. Embriyogenik kalluslar büyüme düzenleyicisi içermeyen sıvı besi ortamına aktarılmış, elde edilen somatik embriyolar ve embriyogenik yapıların katı ortamda olgunlaşması sağlanmıştır. Çalışmamızın bu bölümünde Çukurova 1518 çeşidinin hipokotillerinden ve Coker 312 çeşidinin hipokotil ve 28 günlük embriyolarından somatik embriyolar elde edilmiştir.

Hipokotil eksplantları ile yürütülen çalışmanın ikinci bölümünde Çukurova 1518, Coker 312 ve Erşan 92 pamuk çeşitlerinin hipokotilleri, Çukurova 1518 çeşidi

kullanılarak yürütülen birinci bölüm çalışmasında belirlenen 5 farklı besi ortamında kültüre alınmıştır. Kallus indüksiyon, embriyogenik kallus oranları ve somatik embriyo sayıları saptanmıştır. İlk kültür aşamasından sonra aynı besi ortamlarında bir kez alt kültüre alınan kalluslar, daha sonra hormon NH_4NO_3 içermeyen ek KNO_3 (1.9 g/l) ve glukoz (30 g) içeren sıvı MSB besi ortamlarında kültüre alınmıştır.

Çalışmamızda genotipler, embriyogenik kapasite ve somatik embriyo üretimi açısından farklılık göstermiştir. En yüksek somatik embriyo oluşumu Coker 312 pamuk çeşidinden elde edilmekle birlikte, Çukurova 1518 çeşidinden de önemli sayıda embriyo oluşumu elde edilmiştir. Erşan 92 pamuk çeşidinden somatik embriyo elde edilememiştir. Farklı hormon konsantrasyonları ve kombinasyonlarının anılan çeşit için kullanılması önerilebilir.

Olgunlaşmamış embriyo eksplantları ile yürütülen çalışmada, Çukurova 1518, Coker 312 ve Erşan 92 pamuk çeşitlerinin 28 günlük embriyoları, Çukurova 1518 çeşidi kullanılarak yürütülen birinci bölüm çalışmasında belirlenen 5 farklı besi ortamında kültüre alınmıştır. Kallus indüksiyon, embriyogenik kallus oranları ve somatik embriyo sayıları saptanmıştır. İlk kültür aşamasından sonra aynı besi ortamlarında 4 kez alt kültüre alınan kalluslar daha sonra hormon NH_4NO_3 içermeyen ek KNO_3 (1.9 g/l) ve glukoz (30 g) içeren sıvı MSB ortamlarında kültüre alınmıştır. Ancak hormon içeren ortamlarda uzun süreli alt kültürler sırasında embriyogenik kallusların farklılaştığı gözlenmiştir.

Genel olarak somatik embriyogenesis çalışmalarımızda, embriyogenik performans yönünden beklendiği gibi Coker 312 en yüksek tepkiyi vermiş, bu çeşidi Coker kanı taşıdığı bilinen Çukurova 1518 çeşidi izlemiştir. Kullanılan diğer çeşit Erşan 92 ise en düşük tepkilerin izlendiği genotip olmuş ve bu çeşitten somatik embriyo elde edilememiştir. Anılan çeşit için farklı hormon konsantrasyon ve kombinasyonları içeren besi ortamlarının kullanılmasını önerebiliriz.

Somatik embriyogenesis çalışmalarının sonucunda hipokotiller olgunlaşmamış embriyolara göre embriyogenik kallus ve somatik embriyo oluşumu yönünden daha iyi tepki vermişlerdir. Bizim çalışmamızda başlangıç aşamasından sonra hipokotiller bir kez alt kültüre alınırken, olgunlaşmamış embriyolar 4 kez (4-6 haftalık sürelerle) alt kültüre alınmışlar, kallus morfolojilerinde farklılaşmalar

izlenmiştir. Olgunlaşmamış embriyolardan yeterli tepki alınamamasının, kallusların uzun süre alt kültürde kalmaları nedeniyle embriyogenik özelliklerinin azalmasının sonucunda ortaya çıktığını söyleyebiliriz.

Somatik embriyogenesis çalışmalarında kullanılan her iki eksplant tipinde de kullanılan besi ortamlarında benzer tepkiler elde edilmiştir. En yüksek tepkiler, 0.1 mg/l kinetin ve 2 mg/l NAA MSB ortamında elde edilmiş kalluslardan sağlanmıştır.

Somatik embriyogenesis çalışmalarımızın bulguları doğrultusunda, embriyogenik kallus oluşumunun ve niteliğini kaybetmeden sürdürülmesinin çalışmanın başarısı için en önemli kriterlerden biri olduğunu söyleyebiliriz.

Bizim çalışmamızda yalnızca süreyi kısaltmakla kalmayıp, çok sayıda somatik embriyo oluşumunu sağlaması nedeniyle sıvı kültür aşamasının somatik embriyogenesis için önemli koşul olduğunu belirtmeliyiz.

Çalışmamızın somatik embriyogenesis bölümü ile ilgili elde edilen sonuçlar doğrultusunda eksplant olarak hipokotilleri, embriyogenik kallus oluşumu ve sürdürülmesi için, 0.1 mg/l kinetin ve 2 mg/l NAA MSB ortamını, embriyo oluşumu için hormonsuz sıvı besi ortamını (NH_4NO_3'ın uzaklaştırılıp, KNO_3 miktarının ikiye katlanmış olduğu MSB), somatik embriyoların gelişmesi ve olgunlaşması için sıvı kültür ile aynı içerikli, ancak agar ile katılaştırılmış olan embriyo gelişme besi ortamını, ileri dönem embriyoların köklenmeleri için aktif karbon içeren hormonsuz MSB besi ortamını önerebiliriz.

KAYNAKLAR

AGRAWAL, D.C., BANERJEE, A. K., KOLALA, R.R., DHAGE, A.B., KULKARNI, A.V., NALAWADE, S.,M., HAZRA, S. and KRISHNAMURTHY, K.V. 1997. In-vitro Induction of Multiple Shoots and Plant Regeneration in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Plant Cell Reports 16: 647-652 .

BAJAJ, Y.P.S. and GILL, M.S., 1986. Micropropagation and Germplasm Preservation Cotton (*Gossypium* spp) through Shoot Tip and Meristem Culture. Indian J.Exp Biol, 24: 561-562.

BAJAJ, Y.P.S. and GILL, M.S., 1992. Micropropagation of Cotton (*Gossypium* Species). 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.

BAJROVİC, K., AYDIN, Y., TALAS- OĞRAŞ, T., İPEKÇİ, Z., ALTINKUT, A., GENCER, O. and GÖZÜKIRMIZI, N., 2001. Direct Plant Regeneration from Node and Apex Explants of Cotton in Turkey. Biotechnol.& Biotechnol.Eq.5/2001/2,Supplement,73-76.

BALUCH, Z.A.M., 1979. *In Vitro* Anther Culture of *Gossypium* Species.The Pakistan Cottons, Pakistan Central Cotton Committee, Karachi, January, 161-162.

BRAR, K.S., SANDHU, B.S. and GOSAL, S.S. 1998. Tissue culture response of cultivated and wild cotton species. Crop Improvement 25 (1): 59-65.

CARVALHO, J.M.F.C., GONZALES-BENITO, E., PEREZ, C. and SANTOS, J.W., 1992. Response of Two Cotton Cultivars to Somatic Embryogenesis in Different Culture Media. Revista de Oleaginosas e Fibrosas 2 (1): 13-19.

CARVALHO, J.M.F.C., GONZALES-BENITO, E., PEREZ, C. and SANTOS, J.W., 1997. Effect of Explant Type, Carbon Source and Gelling Agent on Micropropagation of Cotton cv. CNPA Precoce.. Revista de Oleaginosas e Fibrosas 1 (1): 81-86.

ÇAĞIRGAN, O. ve BARUT, A., 2000. Nazilli Pamuk Araştırma Enstitüsü'ndeki Genetik - Stok Pamuk Çeşitlerinin Özellikleri. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, TAGEM, Nazilli Pamuk Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Yayın No:58.

DANI , R. G., VESMANOVA, O.Y., SHLYAKHOV, Y. V. and ERGASHEV, A. K. E., 1993. Studies on Clonal Micropropagation of Cotton through Meristem Culture. Advances in Plant Sciences, 6(2): 260-264.

DAVIDONIS, G. and HAMILTON, R.H., 1983. Plant Regeneration from Callus Tissue of (*Gossypium hirsutum* L.) Plant Science Letters, 32: 89-93.

DJATAEV, S.A., NASIROVA, G.B., HOLMURATOV, E.G., KRUPENJE, D.B., NASRETDINOVA, M.N., YAKUBOV, M.D. and ABDUKARIMOV, A., 1998. Cotton Meristems Regeneration and Transformation. World Cotton Research Conference-2, 6-12 Sep. Athens- Greece, p.117.

EFE, L., 2002. Pamukta (*Gossypium hirsutum* L. ve *G. barbadense* L.) Farklı Yaşlardaki Tohum Taslaklarından Kallus Oluşumu ve Bitki Rejenerasyonu Üzerine Bazı Büyüme Regülatörlerinin Etkisi ve Kallus Hücreleri ile Rejenere Olan Bitkilerde Kromozomal Varyasyonların Saptanması. Proje No:TOGTAG/TARP-2075.

FINER, J. J., REILLEY, A. A. and SMITH, R. H. 1983. Stimulation of Somatic Embryogenesis in Cotton (*Gossypium klothzschianum* Anders.). In Vitro, 19(3 II): 250.

FINER, J.J, 1988. Plant Regeneration from Somatic Embriyogenic Suspansion Cultures of Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Plant Cell Reports, 7(6): 399-402.

FIROOZABADY, E., DEBOER, D.L., MERLO, D. J., HALK, E.L., AMERSON, L.N., RASHKA, E. and MURRAY, E.E., 1987. Transformation of Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by *Agrobacterium tumefaciens* and Regeneration of Transgenic Plants. Plant Molecular Biology 10: 105-116.

FIROOZABADY, E. AND DEBOER, D.L., 1993. Plant Regeneration via Somatic Embriyogenesis in many Cultivars of Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). In Vitro Cell Dev. Biol. 29: 166-173.

GAMBORG, O.L., MILLER, R.A. and OJIMA, K., 1968. Nutrient Requirements of

SuspensionCultures of Soybean Root Cells. Exp. Cell Res. 50: 151-158.

GAWEL, N.J. and ROBACKER, C.D., 1990. Genetic Control of Somatic Embryogenesis in Cotton Petiole Callus Cultures. Euphytica, 49: 249-253.

GONZALES-BENITO, M. E., CARVALHO, J. M. F. C. and PEREZ, C., 1997a. Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Somatic Embriyogenesis – a Comparative Study Between two Cultivas. Phytomorphology, 47(4): 375 - 382.

GONZALES-BENITO, M. E., CARVALHO, J. M. F. C. and PEREZ, C., 1997b. Somatic Embryogenesis of an Early CottonCultivar. Pesquisa Agropecuaria Brasileira 32(5): 485-488.

GOULD, J., BANISTER, S., HASEGAWA, O., FAHIMA, M. and SMITH, R. H., 1991. Regeneration of *Gossypium hirsutum* L. and *Gossypium barbadense* L. from Shoot Apex Tissues for Transformation. Plant Cell Reports, 10:12-16.

GUO, J.C. and YUAN, F. H., 1994. Studies on Plant Regeneration from Somatic Cells and the Transfer Technique for Plantlets of Upland Cotton. Acta Agronomica Sinica. 20(2): 210-140.

GUPTA, S.K., SRIVASTAVA, A.K., SINGH, P.K. and TULI, R., 1997. *In vitro* Proliferation of Shoots and Regeneration of Cotton . Plant Cell Tissue and Organ Culture, 51:149-152.

HAREM, E., 2000. Türkiye'de Tescil Edilen Yerli ve Yabancı Pamuk Çeşitleri ve Özellikleri. TAGEM Nazilli Pamuk Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Yayın No:55.

HATİPOĞLU, R., 2002. Bitki Biyoteknolojisi. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Genel Yayın No: 190, Ders Kitapları Yayın No: A-58 , Ç.Ü. Yayınları No: 47, Adana.

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: 273-278.

HOLMURATOV, E.G., NASIROVA, G. B. and DJATAEV, S.A., 2000. The Induction of Callus Formating and Regenerating Process in Different Cotton Explants. The Inter-Regional Cooperative Research Network on Cotton, A joint Workshop and Meeting of the All Working Groups. 20-24 Sept. Adana-Turkey, 268-270.

ICAC, 1997. The ICAC Recorder, International Cotton Advisory Committee. Technical Information Section. Vol XV, No.4.

JAMES, C., 2003. Global Review of Commercialized TransgenicCrops, ISAAA Briefs No 30.

KALAMANI, A., 1994. Initiation of Callus and Plant Regeneration in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Madras Agricultural Journal. 81(11): 579-580.

KUMAR, S., SHARMA, P. and PENTAL, D., 1998. A Genetic Approach to *In Vitro* Regeneration of Non-regeneration Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Cultivars. Plant Cell Reports Abs. Vol. 18 : 59-63.

KUMRIA, R., SUNNICHAN, V. G., DAS, D. K., GUPTA, S. K., REDDY, V. S., BHATNAGAR R. K. and LEELAVATHI, S. 2003. High-frecuency Somatic Embriyo Production and Maturation into Normal Plants in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) through Metabolic Stress. Plant Cell Rep. 21:635-639.

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. 6:13-15.

LUO, J., BISWAS, G.G. and GOULD, J. 1999. Shoot Apex Transformation and Regeneration of Texas Cotton for Disease Resistance. Plant and Animal Genome VII Conference, 533.

LUO, J. and GOULD, J.H., 1999. *In vitro* Shoot-tip Grafting Improves Recovery of Cotton Plants from Culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 57: 211–213.

MANDESWAR, S. B., 1995. Regeneration of Cotton *Gossypium hirsutum* L. from Shoot Tip Culture. Advances in Plant Sci. 8(1): 89-94.

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, p.134-139.

MCNAUGHTON,C. and REY, M.E.C., 1998. Development of an Efficient Regeneration and Transformation System for Commercially Grown South African Cotton Cultivars. World Cotton Research Conference-2, 6-12 Sep.

Athens-Greece, p.101,.

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: 21–35.

MOMTAZ, O.A., 1998. Induction of Multiple Shoot Differentiation and Increasing Transformation Frequency in Shoot Tips of Egyptian Cotton (*G. barbadense* L.). World Cotton Research Conference-2, 6-12 Sep. Athens-Greece, p.110.

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) 131-136.

MURASHIGE, T. and SKOOG, F.M., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. Physiol. Plant., 15: 473-497.

ÖZÜDOĞRU, Y. 2002. Pamuk Durum ve Tahmin Raporu 2002/2003,TEAE, Yayın No: 89.

RAJASEGAR, G., RANGASAMY, S.R., VENKATACHALAM P. and RAO, G.R., 1996. Callus Induction, Somatic Embryoid Formation and Plant Regeneration in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Journal of Phytological Research, 9(2): 145-147.

SAKHANOKHO, H.F., SHARMA, G.C., ZIPH, A., SAHA S. and RAJASEKARAN K., 1998. Tissue Culture Potential of Diverse Diploid and Tetraploid Cotton Genotypes.Proceedings of the Beltwide Cotton Conference, Vol. 1 : 590-593.

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.

SATYAVATHI, V.V., PRASAD, V., GITA LAKSHMI, B. AND LAKSHMI SITA G., 2002. High Efficiency Transformation Protocol for three Indian Cotton Varieties via *Agrobacterium tumefaciens.* Plant Science 162:215–223.

SENECHAL, N.P., EL-ZIK, K.M. and TROLINDER, N.L. 1994. Inheritance of

Somatic Embryogenesis In Upland Cotton. Reprinted from Proceedings of the 1994 Beltwide Cotton Conferences, p. 706.

SHOEMAKER, R. C., COUCHE, L. J. and GALBRAITH, D.W., 1986. Characterization of Somatic Embriyogenesis and Plant Regeneration in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Plant Cell Reports, 3:178-181

STEEL, R.G.D. and TORRIE, J.H. 1960. Principles and Procedure of Statistics with Special References to the Biological Sciences. McGraw-Hill Book Comp.,Inc. New York.

SUNILKUMAR, G. and RATHORE, K., 2001. Transgenic Cotton: Factors Influencing Agrobacterium-Mediated Transformation and Regeneration. Molecular Breeding, 8: 37-52.

THEA, A.W., RAJASEKARAN, K. and ANDERSON, D.M., 2000. Cotton Biotechnology. Critical Reviews in Plant Sci.,19(6):511-550.

TROLINDER, N. L., and GOODIN, J. R., 1987. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Plant Cell Rep., 6:231-234.

TROLINDER, N. L., and GOODIN, J. R., 1988a. Somatic Embriyogenesis in Cotton (*Gossypium*) . I. Effects of Source of Explant and Hormone Regime . Plant Cell, Tissue and Organ Culture, V.12 (1) 31-42.

TROLINDER, N. L., and GOODIN, J. R., 1988b. Somatic Embriyogenesis in Cotton (*Gossypium*) . II. Requirements for Embryo Development and Plant Regeneration. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, V.12 (1) 43-53.

TROLINDER, N.L. and XHIXIAN, C., 1989. Genotype Specifity of the Somatic Embriyogenesis Response in Cotton. Plant Cell Reports, 8: 133-136.

TROLINDER, N. L., 1995. How to Genetically Engineer Cotton. Proceedings Beltwide Cotton Conferences (1995) V.1, 165-166.

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, Vol. 33, No. 3, pp. 565-571, May-June, 1986. Original article submitted May 7, 1985. (Plenum Publishing Corporation p. 439-444).

UMBECK, P., JOHNSON, G., BARTON, K. AND SWAIN, W.1987. Genetically Transformed Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Plants. Biotechnology, Vol.5: 263-266.

VLACHOSTERGIOS, D.N., ROUPAKIAS, D.G., and MAVROMATIS, A.G., 1998. Response to *In vitro* Regeneration of Immature Zygotic Cotton Embryos (*Gossypium spp.*). World Cotton Research Conference-2, 6-12 Sep.Athens-Greece, p.111.

WANG, Z.Z., LI, K.Q., ZHANG, D., HAO, L.F., GUO, D.Z. ANDAND LIU,Q., 1994. Variation and High Frequency Somatic Embriyogenesis of Embriyogenic Callus in *Gossypium hirsutum* L. Acta Botanica, Sinica 36(5): 331-338.

WU, J. Y. and SHE, J. M., 1990. Shoot Apex and Axillary Culture of *Gossypium* spp. Jiangsu Journal of Agric. Sci. 6(2): 22-26.

WU, F. A., HE, Z. Y., ZONG, Q. L. and SONG, Q. Q., 1992. The Role of Genotypes in Cotton Tissue Culture. China Cottons, 4:13-14.

ZAPATA, C., SRIVATANAKUL, M., PARK, S.H., LEE, B. M., SALAS, M.G. and SMITH, R.H., 1999. Improvements in Shoot Apex Regeneration of two Fiber Crops: Cotton and Kenaf. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 56:185-191.

ZHANG, B., FENG, R., LI, X. and LI, F., 1996. Anther Culture and Plant Regeneration Cotton (*Gossypium klotzschianum* Anderss). Chinese Science Bulletin, 41(2):145-148.

ZHANG, B., FENG, R., LI, F., LI X., LI, F. 1998 a. Plant Regeneration from Anther Culture Cultivated and Wild Species of *Gossypium* Genus. World Cotton Research Conference-2, 6-12 Sep. Athens-Greece, p.103.

ZHANG, B., FENG, R., LI, F., LIU, F., LIU, C., and YAO, C., 1998 b. Somatic Embriyogenic Patterns and Production of Artificial Seeds in *Gossypium hirsutum* L. World Cotton Research Conference-2, Athens-Greece, p.104.

ZHANG, B.H., LIU, F. and YAO, C.H., 2000. Plant Regeneration via Somatic Embryogenesis in Cotton Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 60: 89–94.

ZHANG, B.H., FENG, R., LIU, F. and WANG, Q., 2001. High Frequency Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration of an Elite Chinese Cotton Variety. Bot. Bull. Acad. Sin. 42:9-16.

ZHU, W.M., WU, J.Y., SHE, J.M., CAI, X.N., ZHU, Z. and LI, X.H.,1998. Application of the Shoot Apical Meristem of Cotton in Gene Transformation by Particle Bombardment. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences., 14(2):74-79

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: 269-274.

ÖZGEÇMİŞ

1960 yılında Adana ilinde dünyaya geldim. Orta öğrenimimi Adana'da tamamladım. 1980 yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü'nde başladığım lisans eğitimimi 1984 yılında tamamladım ve 1985 – 1988 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimimi tamamladım. 1989-1994 yılları arasında Bereket Tohum Sanayi ve Ticaret Ltd. Şirketi Bitki Doku Kültürü Laboratuvarı'nda teknik eleman olarak çalıştım. 1996-1998 yılları arasında Adana'da Milli Eğitim Bakanlığı, Yeşiloba İlköğretim Okulu'nda sınıf öğretmeni olarak görev yaptım ve 1998 yılı sonunda Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Çukurova Tarımsal Araştırma Enstitüsü'ne yatay geçiş yaptım. Halen bu kurumda araştırıcı olarak çalışmaktayım. Evli ve bir çocuk sahibiyim. 1997 yılında Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalında başladığım doktora çalışmama devam etmekteyim.