



T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PAMUKTA ANTER KÜLTÜRÜ İÇİN UYGUN
TARAKLANMA DÖNEMİ VE BESİ ORTAMININ
BELİRLENMESİ**

SEÇİL TAŞDEMİR

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

KAHRAMANMARAŞ 2016

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PAMUKTA ANTER KÜLTÜRÜ İÇİN UYGUN
TARAKLANMA DÖNEMİ VE BESİ ORTAMININ
BELİRLENMESİ

SEÇİL TAŞDEMİR

Bu tez,
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS
derecesi için hazırlanmıştır.

KAHRAMANMARAŞ 2016

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Seçil TAŞDEMİR tarafından hazırlanan ‘‘PAMUKTA ANTER KÜLTÜRÜ İÇİN UYGUN TARAKLANMA DÖNEMİ VE BESİ ORTAMININ BELİRLENMESİ’’ adlı bu tez, jürimiz tarafından 11/08/2016 tarihinde oy birliği ile Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Adem BARDAK (DANIŞMAN)

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Ziya DURLUPINAR (ÜYE)

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Doç. Dr. Oktay ERDOĞAN (ÜYE)

Biyosistem Mühendisliği Anabilim Dalı

Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.

Doç. Dr. Mustafa ŞEKKELİ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Seçil TAŞDEMİR



Bu çalışma KSÜ BAP tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 2014/2-49YLS

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.

**PAMUKTA ANTER KÜLTÜRÜ İÇİN UYGUN TARAKLANMA DÖNEMİ VE
BESİ ORTAMININ BELİRLENMESİ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

SEÇİL TAŞDEMİR

ÖZET

Pamuk, değişik kullanım alanlarıyla dünyada tarım, sanayi ve ticaret sektörlerinde önemli konumu olan ürünlerden birisidir. Pamuk bitkisinde yapılan çalışmalarda doku kültürü yöntemlerinden biri olan anter kültürü önemli yer tutmaktadır. Pamuk bitkisinde şimdiye kadar tam olarak kallus ve haploid bitki rejenerasyonu için uygun besi ortamı bulunamamıştır. Yapılan diğer çalışmalarda indirekt organogenesis yoluyla kallus oluşturma yoluna gidilmiştir. Bu çalışma da *Gossypium barbadense* L. türüne ait Aşkabat 100 ve *Gossypium hirsutum* L. türüne ait Stoneville 453 genotipleri kullanılarak, MS (Muroshige and Skoog) ve NRM (Nas and Read Medium) ortamları farklı hormon konsantrasyonları, şok uygulaması ve tarak boyları denemeye alınarak anter kültürü için ideal doku kültürü ortamı belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmanın sonucunda MS besi ortamının anter kültürü tekniği için en ideal besi ortamı olduğu, hormon konsantrasyonu olarak 1 mg/l NAA + 1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l Kinetin, alt kültür hormon konsantrasyonu olarak 1mg/l NAA + 0,5 mg/l BA + 0,5 mg/l TDZ, şok uygulaması olarak +4 °C ve +40 °C'nin birlikte uygulandığı şok uygulamasının en ideal uygulamalar olduğu sonucuna varılmıştır. Elde edilen sonuçlar kontrol grubuyla karşılaştırılırken çekirdek bölünmesi gerçekleşmeden alınan veya çekirdek bölünmesine yakın olan Aşkabat 100 genotipinde 2 mm ve 3 mm tarak boylarından yapılan ekimde en iyi kallus gelişiminin gözlemlendiği görülmüştür.

Anahtar Kelime: Pamuk, Besi Ortamı, Anter Kültürü, Kallus

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Ağustos/ 2016

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Adem BARDAK

Sayfa sayısı: 51

DETERMINATION OF SUITABLE SQUARING PERIOD AND GROWTH MEDIUM FOR ANTHER CULTURE IN COTTON

(M.Sc. THESIS)

SEÇİL TAŞDEMİR

ABSTRACT

Cotton is one of the most important products in agriculture, industry and commerce due to its different areas of usage. In previous works involving the cotton plant, the anther culture which is a method of tissue culture plays an important role. The proper growth medium for the callus and haploid plant regeneration of cotton is yet to be discovered. In previous researches, it has been tried to create callus through indirect organogenesis. In this study, the Aşkabat 100 genotype from the *Gossypium barbadense* L. species and Stoneville 453 genotype from the *Gossypium hirsutum* L. species have been used. As the growth medium, MS (Muroshige and Skoog) and NRM (Nas and Read Medium) have been used in the study. The research showed that MS (Muroshige and Skoog) growth medium is the ideal one for the anther culture technique. As a hormon concentration 1 mg/l NAA + 1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l kinetin had better results and 1mg/l NAA + 0,5 mg/l BA + 0,5 mg/l TDZ has better results as sub-culture and as a shock treatment +4 °C and +40 °C treatment had the higher callus number results. According to the results, it has been observed that the best callus growth was obtained from the 2 mm and 3 mm squaring length from Aşkabat 100 cultivar while the anthers picked during mid to late uninucleate stage compared to the control group.

Key Words: Cotton, Tissue Media, Anther Culture, Callus

University of Kahramanmaraş Sütçü İmam
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Agricultural Biotechnology, August / 2016

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Adem BARDAK

Page Number: 51

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmam süresince desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen kıymetli hocam ve danışmanım olan Yrd. Doç. Dr. Adem BARDAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Engin bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım ve çalışmamın her aşamasında sağladığı bilimsel katkılardan dolayı ve aynı zamanda çalışmalarımı yürüttüğüm yer olan ÜSKİM'in olanaklarından yararlanmamı sağlayan saygı değer hocam Prof. Dr. Yüksel BÖLEK'e teşekkürü borç bilirim.

Her zaman ve her yerde yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyeceğini bildiğim değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Ziya DUMLUPINAR'a şükranlarımı sunarım. Çalışmamda çıkmazlara düştüğümü hissettiğim zamanlarda çok değerli tavsiyelerini ve kaynaklarını benden esirgemeyen sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Nevzat SEVGİN'e, araştırmanın maddi desteğini sağlayan BAP'a, arkadaşlarım Halil TEKEREK, Döne PARLAK, Elif DAĞGEÇEN, Khezir BHATTİ, Awara Muhammed HAMAKHAN, Medet KORKUNÇ'a ve diğer laboratuvar arkadaşlarıma ayrıca teşekkür ederim.

En zor anlarımda bile benim yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini, ilgilerini ve sevgilerini asla esirgemeyen, bana her zaman yol gösterip yaşama sevinci veren, emeklerini hiçbir zaman ödeyemeyeceğim babam Çelebi TAŞDEMİR'e, annem Seçkin TAŞDEMİR'e, hayatımın mutluluk kaynakları olan kardeşlerim Erkan TAŞDEMİR ve Ali Eren TAŞDEMİR'e saygılarımı ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Seçil TAŞDEMİR

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	6
3. MATERYAL VE METOT	14
3.1. Materyal	14
3.1.1. Bitki materyali	14
3.1.2. Besi ortamı	14
3.1.3. Hormonlar	15
3.2. Metot	16
3.2.1. Çalışmada kullanılacak tohumların toprak hazırlığı ve seraya ekilmesi	16
3.2.2. Stok çözeltilerinin hazırlanması	17
3.2.2.1. Makro ve mikro elementlerin stok çözeltilerinin hazırlanması	17
3.2.2.2. Vitamin stok çözeltisinin hazırlanması	17
3.2.2.3. Büyüme düzenleyicilerin stok çözeltilerinin hazırlanması	17
3.2.3. Besi ortamlarının hazırlanması	18
3.2.3.1. Kontrol grubu besiyerinin hazırlanması	18
3.2.3.2. Farklı konsantrasyonlardaki bitki büyüme düzenleyicileri ile besiyerlerin hazırlanması	18
3.2.4. Tarakların seradan alınması ve incelenmesi	19
3.2.5. Yüzey sterilizasyon aşaması	20
3.2.6. Mikrosporların besiyerine ekim aşaması	21
3.2.7. Anterlerin gelişimi için şok uygulamaları	22
3.2.8. Oluşan kallus sayısı ve kallusların renklerinin gözlenmesi	22
3.2.9. Kallus çoğaltma (alt kültür) aşaması	23
3.2.10. Rejenerasyon aşaması	24
3.2.11. Analiz	25
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	26

3.3.	Taraktan Elde Edilen Kallus İnteraksiyonu	26
	3.3.1. Genotip interaksiyonu.....	26
	3.3.2. Besi ortamı interaksiyonu	27
	3.3.3. Hormon konsantrasyonlarının interaksiyonları	27
	3.3.4. Şok uygulamasının interaksiyonu.....	29
	3.3.5. Tarak boylarının interaksiyonu	30
	3.3.6. İnteraksiyonların kallus sayısına etkisi	30
3.4.	Kallusların Alt Kültür İnteraksiyonları	38
	3.4.1. Alt kültürde genotip interaksiyonu.....	38
	3.4.2. Alt kültürde besi ortamı interaksiyonu	39
	3.4.3. Alt kültürde hormon konsantrasyonları interaksiyonu.....	39
	3.4.4. Alt kültürde tarak boylarının interaksiyonu	40
	3.4.5. Alt kültürde interaksiyonların kallus sayısına etkisi.....	41
4.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	45
	KAYNAKLAR.....	46
	ÖZGEÇMİŞ.....	50

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1 Mikrospor kültürü ve anter kültürünün yapılışı	4
Şekil 3.1 Seradan görünüm	16
Şekil 3.2 Tarakların oluşması	19
Şekil 3.3 Taraklardan ayrılan anterlerin mikroskopta incelenmesi	20
Şekil 3.4 Yüzey sterilizasyonu.	21
Şekil.3.5 Anterlerin ekim aşaması	22
Şekil 3.6 Alt kültür aşamasındaki kalluslar.....	23
Şekil 3.7 Karanlık evresinden sonra aydınlık ortama alınan petrilerin iklim odasından görünümü	24
Şekil 4.1 Genotiplerin oluşturdukları kallus renklerinde ki farklılıklar.....	27
Şekil 4.2 Alt kültüre alım süreleri geciken kalluslarda oluşan kahverengimsi yapılar.....	38

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 1.1 Dünya lif pamuk üretimi(Bin ton).....	2
Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan pamuk genotipleri.	14
Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan besi ortamları ve içerikleri.....	15
Çizelge 3.3 Anterlerin aktarıldığı MS besi ortamının hormon konsantrasyonları	18
Çizelge 3.4 Anterlerin aktarıldığı NRM besi ortamının hormon konsantrasyonları	19
Çizelge 3.5 Kallusların alt kültüre alındığı MS besi ortamının hormon konsantrasyonları.	24
Çizelge 3.6 Kallusların alt kültüre alındığı NRM besi ortamının hormon konsantrasyonları	24
Çizelge 4.1 Genotiplerin oluşturdukları renk ve kallus sayısı farkı	26
Çizelge 4.2 Aşkabat 100 genotipindeki besi ortamı interaksyonları.	27
Çizelge 4.3 Stoneville 453 genotipindeki besi ortamı interaksyonları	27
Çizelge 4.4 Aşkabat 100 genotipindeki hormon konsantrasyonlarının interaksyonları.	28
Çizelge 4.5 Stoneville 453 genotipindeki hormon konsantrasyonlarının interaksyonları ..	28
Çizelge 4.6 Aşkabat 100 genotipindeki şok uygulamalarının interaksyonları.....	29
Çizelge 4.7 Stoneville 453 genotipindeki şok uygulamalarının interaksyonları.....	29
Çizelge 4.8 Aşkabat 100 genotipindeki tarak boyu interaksyonları.....	30
Çizelge 4.9 Stoneville 453 genotipindeki tarak boyu interasksiyonları	30
Çizelge 4.10 Uygulanan interaksyonların kallus sayısına etkisi	31
Çizelge 4.11 Uygulanan interaksyonların kallus sayısı ve renk üzerine etkisi	34
Çizelge 4.12 Genotiplerin oluşturdukları alt kültür aşamasında renk ve kallus sayısı farkı	38
Çizelge 4.13 Aşkabat 100 genotipinde alt kültürde besi ortamı interaksyonları.....	39
Çizelge 4.14 Stoneville 453 genotipinde alt kültürde besi ortamı interaksyonları.....	39
Çizelge 4.15 Aşkabat 100 genotipinde alt kültürde hormon konsantrasyonlarının interaksyonları	40
Çizelge 4.16 Stoneville 453 genotipinde alt kültürde hormon konsantrasyonlarının interaksyonları	40

Çizelge 4.17 Aşkabat 100 genotipinde alt kültürde tarak boylarının interaksyonları	40
Çizelge 4.18 Stoneville 453 genotipinde alt kültürde tarak boylarının interaksyonları	41
Çizelge 4.19 Uygulanan interaksyonların alt kültürde kallus sayısına etkisi.....	42
Çizelge 4.20 Uygulanan interaksyonların alt kültürde kallus sayısı ve renk üzerine etkisi	43



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	:Celcius derece
g	:Gram
mg	:Miligram
l	:Litre
ml	:Millilitre
µl	:Mikrolitre
mm	:Milimetre
ph	:Asitlik derecesi
C₂H₅OH	:Etanol
2,4-D	:2,4 Diklor fenoksi asetik asit
BA	:Benzil adenin
IBA	:Indol bütirik asit
NAA	:Naftalik asetik asit
TDZ	:Thidiazuron
MS	: Muroshige and Skoog
NRM	:Nas Read Medium
IAA	:Indol butirik asit

1. GİRİŞ

Pamuk bitkisi yüzyıllar önce insanların tanışmış olduğu ve işlenmesi açısından çırçır sanayisinin, lifi ile tekstil sanayisinin, çekirdeği ile yağ ve yem sanayisinin, linteri ile de kâğıt sanayisinin hammaddesidir.

Dünya’da pamuğun önemi her geçen gün artmaktadır. Özellikle ekonomik büyüme ile pamuk tüketimi arasında pozitif bir ilişki vardır. Dünya’da yetiştirilmekte olan pamukların büyük bir kısmı *Gossypium hirsutum* L. türüne aittir. Pamuk üretiminin yarısından fazlası gelişmekte olan tekstil sektöründe kullanılmaktadır.

Dünyada en büyük pamuk üretimi Çin’de gerçekleşmektedir. Çin’i pamuk üretiminde artış gösteren Hindistan izlemekte, bu ülkeleri ise ABD, Pakistan, Brezilya, Avustralya, Özbekistan ve Türkiye takip etmektedir. (Anonim, 2013)

Dünya lif pamuk üretimi 2004–2007 yılları arasında 26 milyon ton seviyelerinde gerçekleşirken, 2008/2009 döneminde 23.5 milyon ton, 2009/2010 döneminde ise 22.2 milyon ton seviyesine gerilemiştir. 2010/2011 döneminde üretim artış eğilimine girmiş ve 25 milyon tonu aşmıştır. 2011/2012 tahminleri üretimin 28 milyon tonu yakalamış, 2012/2013 döneminde lif pamuk üretimin 26.8 milyon tona ve 2013/2014 döneminde 26.2 milyon tona ulaşmıştır. 2014/2015 döneminde ise lif pamuk üretimi 26.2 milyondur. Ülkemizin dünya üretimindeki payı, 2011/2012 sezonunda % 2.7; 2012/2013 sezonunda % 3.12; 2013/2014 sezonunda % 2,9; 2014/2015 sezonunda % 2.7 olmuştur. 2015/2016 sezonunda ise %3.3 olacağı tahmin edilmektedir. (Anonim, 2015)

Çizelge 1.1’de görüldüğü gibi dünya pamuk üretimi son yıllarda 26 milyon ton seviyelerinde seyrederken 2015/2016 sezonunda bir önceki yıla göre % 13 azalarak 22,6 milyon tona gerilemiştir. Bu düşüşte özellikle Çin, ABD ve Pakistan gibi ülkelerin üretimindeki azalış etkili olmuştur. Dünyada en büyük pamuk üretimi uzun yıllardan beri Çin’de gerçekleşirken son yıllarda Hindistan’da pamuk ekim alanlarının artışıyla bu durum değişmiştir. Mevcut durumda 6,2 milyon ton lif pamuk üretim değeriyle Hindistan en büyük üretici olmuştur. Bu ülkeyi Çin, ABD, Pakistan izlemektedir. Son yıllarda Avustralya’daki üretimin azalması sonucu Türkiye dünya pamuk üretiminde 7’nci sıraya yükselmiştir. (Anonim, 2016)

Çizelge 1.1 Dünya Lif Pamuk Üretimi (Bin Ton) (Anonim, 2016)

Sıra	Ülkeler	2011/2012	2012/2013	2013/2014	2014/2015	2015/2016
1.	Hindistan	6.001	6.095	6.770	6.510	6.240
2.	Çin	7.400	7.300	6.929	6.480	5.260
3.	ABD	3.391	3.770	2.811	3.550	2.820
4.	Pakistan	2.294	2.204	2.076	2.230	1.610
5.	Brezilya	1.884	1.261	1.705	1.550	1.550
6.	Özbekistan	880	1.000	940	890	860
7.	Türkiye	750	858	760	847	779
8.	Avustralya	1.225	1.018	890	450	470
	Diğer	3.459	3.332	3.402	3.543	3.051
	Toplam	27.284	26.838	26.283	26.130	22.640

Türkiye’de pamuk tarımı genellikle Ege Bölgesi, Güneydoğu Anadolu Bölgesi ile Çukurova ve Antalya yörelerinde yapılmaktadır. Son 10 yıllık süreçte pamuk ekim alanlarının yaklaşık % 25 oranında gerilediği görülmektedir. (Anonim, 2015)

Dünya’da uzun yıllar boyunca uygulanan ıslah çalışmaları ile bitkilerin verimi, kalitesi, erkenciliği, biyotik ve abiyotik streslere dayanıklılığı açısından pek çok pamuk çeşidi elde edilmiştir. Günümüzde ise yaygın olarak klasik ıslah yöntemleri uygulanarak, yeni çeşitlerin geliştirilmesi konusunda birçok çalışma yapılmaktadır. Fakat bu yöntem uzun zaman dilimine ve yoğun iş temposuna gereksinim duymaktadır. Bu yüzden bu süreyi kısaltmak ve daha verimli sonuçlar elde etmek için doku kültürü tekniklerinden faydalanılmaktadır.

Islah çalışmalarında başarıyı etkileyen konular arasında en önemli olanları varyasyon ve seleksiyondur. Varyasyon, ufak değişimler ile yıllarca kendiliğinden oluşabildiği gibi; melezleme, mutasyon ve poliploidi gibi de suni olarak oluşturulabilir. Seleksiyon ise amaca uygun bitkilerin seçilerek sürekli kontrollü karşılaştırılma yapılmasıdır. Böylece daha iyi çeşitlerin geliştirilmesine olanak sağlanmış olur.

Özgen 1984, Nüfus ve refah seviyesinin artışı ve tekstil sanayisinin gelişmesiyle birlikte pamuk tüketimi de artmaktadır. Oluşan bu talebi karşılamak için verimli ve yüksek lif kalitesine sahip pamuk çeşitlerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Ülkemiz pamuk tarımında

kullanılan çeşitler yurt dışından getirilip ülkemizde tescil edilerek satılmaktadır. Pamuk tarımında yabancı firmalarla rekabet edebilmek için yerli ve üstün özelliklere sahip pamuk çeşitlerinin hızlı bir şekilde geliştirilmesi (ıslahı) gerekmektedir. Pamuk ıslah sürecinde özellikle biyoteknolojik ve moleküler yöntemlerin kullanılması büyük avantajlar sağlamaktadır. Biyoteknolojik yöntemlerden kısa sürede haploid saf hatlar elde etmek amacıyla genelde polen ve anter kültürü kullanılmaktadır. Haploid tekniği kullanılmadan klasik ıslah yöntemi ile saf hatlar elde edilebilmekte ancak bu yöntem ile yabancı tozlanan bitkilerde 10-12 yıl, kendine tozlanan bitkilerde 6-7 yıl gibi süreye ihtiyaç duyulmaktadır. Islah süresinin kısalmasının yanında yüzde yüz homozigot hatlar geliştirilebileceğinden haploid bitki eldesi çok önemli bir biyoteknolojik yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır.

Bitki biyoteknolojisi 1838 yılında Schwan ve Schleiden'in totipotensi teorisi ile başlamıştır. Tek bir hücreden farklılaşma ya da bölünme yoluyla organ veya tam bir bitkinin elde edilmesi yöntemine "totipotensi" denir. Bitki biyoteknolojisinde ki önemli boyuttaki gelişmeler 1900'lü yıllarda başlamıştır. Watson ve Crick tarafından genetik yapının moleküler düzeyde tanımlanması, özellikle de bitkilerde moleküler yöntemlerin kullanılmasına vesile olmuştur. 1970'li yıllarda haploid bitkilerin elde edilmesi, protoplast kaynaştırması ve somatik melezlemeler, taksonomik veya genetik olarak farklı türler arasındaki eşeysel uyumsuzlukların aşılması, mutasyonlar, DNA formundaki genetik materyal transferleri gibi ciddi düzeyde çalışmalar yapılmıştır. Haploid bitkilerin elde edilmesi bitki ıslahı açısından büyük bir öneme sahip olduğundan (Heiser, 1976; Andrews, 1985), anter kültürü tekniği yaygın olarak kullanılmaktadır (Vasil ve ark., 1994).

Anter kültürü tekniği; içerisinde olgunlaşmamış polenleri (mikrosporları) bulunduran anterlerin, tomurcuklardan ayrılarak *in vitro* koşullarda yapay besi ortamlarına alınması ve burada olgunlaşmamış polenlerden haploid embriyoların elde edilmesidir (Ellialtıoğlu ve ark., 2000). Bunun için öncelikle en iyi kallusu oluşturabilecek uygulamaları belirlemek gerekmektedir. Böylece anterden bitki rejenerasyonuna doğru gidilecek ve sonuçta indirekt organogenesis yoluyla haploid bitki üretimi daha kolay olacaktır.

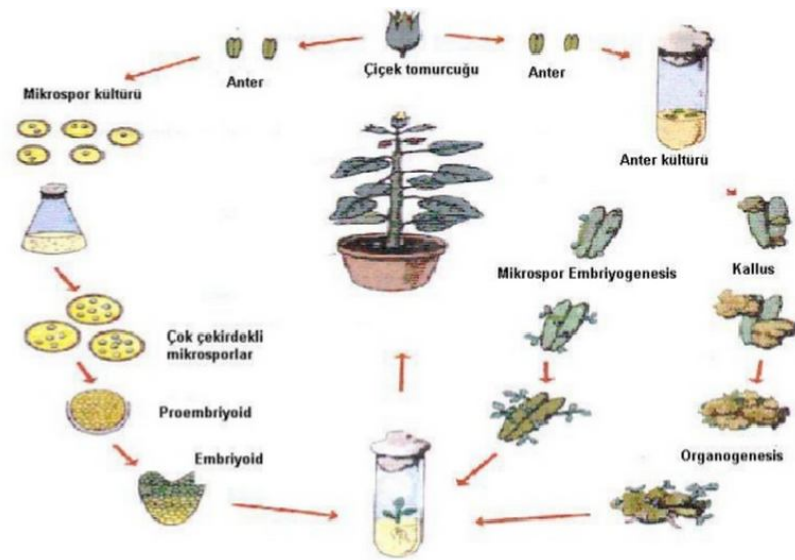
Anter kültürü tekniğinin haploid bitkiler elde etmek için yaygın olarak kullanılmasının sebebi ise bir anterin içinde binlerce mikrosporun bulunması ve bu sayede çok sayıda haploid bitki elde edilebilmesidir. Anter kültüründe temel olarak erkek gameti oluşturacak polen hücresinin gelişimi durdurulup polen hücresinden direkt olarak embriyonun oluşturulmasıdır. Bu tekniğin diğer *in vitro* haploid bitki elde etme tekniklerine göre avantajı;

bir anter içerisinde binlerce mikrosporun bulunması ve bir anterden çok sayıda haploid bitki elde edilebilmesidir. Anter kültürünün temel prensibi, normal olarak erkek gameti oluşturacak olan polen hücresinin gelişimini durdurmak ve somatik hücrelerde olduğu gibi polen hücresini direkt olarak embriyo oluşturmaya zorlamaktır.

Anter kültüründe donör bitkiden kaynaklanan ve anter kültürü tekniğinden kaynaklanan faktörler bulunmaktadır. Anter verici bitkiden kaynaklanan faktörler, genotip ve donör bitkinin yetiştirme koşulları; anter kültürü tekniğinden kaynaklanan faktörler ise anterlerin gelişme dönemi, yapılan ön uygulamalar, besin ortamının bileşimi ve inkübasyon koşulları olarak sıralanabilir (Ellialtıoğlu ve ark., 2002).

Bu faktörler içerisinde en önemli olan besin ortamı ve genotip belirlemedir. Araştırmacılar uzun yıllardır farklı denemeler ile bu iki faktöre ağırlık vermişlerdir. Ayrıca, anter kültürü tekniğine başlamadan önce donör bitkiden alınan mikrosporların çekirdek sayısı da besin ortamlarının içeriğinde olduğu gibi başarıyı etkilemektedir.

Şekil 1.1’de anter kültürü ve mikrospor kültürü tekniklerinin işleyişi şematik olarak verilmiştir. Buna göre anter kültüründe tek çekirdekli mikrosporları bulunduran anterler ortama doğrudan ekilirken, mikrospor kültüründe anterlerdeki mikrosporların izolasyon ortamında serbest hale geçmesi sağlanır. Değişik filtreme yöntemlerinden geçirilen mikrospor süspansiyonlarına bir seri işlemler uygulandıktan sonra mikrospordan oluşan çökelti, sıvı besi ortamı ile uygun yoğunluğa ulaşıncaya kadar karıştırılarak kültüre alınır. (Tuncer ve ark., 2007.)



Şekil 1.1 Mikrospor kültürü ve anter kültürünün yapıları (Reynolds, 1997)

Kallus, farklılaşmamış hücre topluluğudur. Kallus elde etmek için bitkilerin değişik organ dokularından kök, kotiledon, hipokotil, yaprak ayası, damar, çiçek durumu, embriyo (olgun ve olgunlaşmamış), gövde segmentleri vb. bitki kısımları eksplant olarak kullanılmaktadır. Kallus, embriyogenik olabilir veya olmayabilir. Ancak, kallus dokusundan bitki rejenerasyonu için embriyogenik kallus önem taşımaktadır.

Murashige ve Skoog (1954) yeni bir besi ortamı bulmuşlardır. 1960 yılında Maheswari anter kültürü denemesini, protoplast kültürü denemesini gerçekleştirmişlerdir. Watson ve Crick tarafından genetik kısımların moleküler düzeyde tanımlanması, özellikle bitkilerde moleküler yöntemlerin kullanılmasının önünü açmıştır (Vasil ve Therge, 1994).

Çalışmada, *Gossipium barbadense* L. türüne ait Aşkabat100, *Gossipium hirsutum* L. türüne ait Stoneville 453 kullanılarak bu türlere ait en uygun besin ortamını ve haploid bitki üretimi için mikrosporların uygun gelişim döneminin saptanması amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Tulecke (1953), *Ginkgo biloba* bitkisinde bulunan olgun çiçek tozlarının ilk kez doku kültürü tekniği ile haploid kallus elde edebilmek için uyarılabileceğini gözlemlemiştir.

Guha ve Mahasvari (1964), *Datura innoxia* bitkisinde mikrosporlarından haploid embriyo oluşumunu sağlamıştır.

Baluch (1979), *Gossypium* türleri üzerinde devam ettiği anter kültürü çalışmasında; *G. thirsutum* L. ve *G. arboreum* L. x *G. anomalum* L. ve *G. arboreum* L. x *G. hirsutum* L. melezlerinin mayoz safhasının ileri aşamasından tetrad safhasına kadar farklı gelişme evrelerinde mikrospor bulunduran anterlerini, karbon kaynağı olarak sakkaroz ve büyüme düzenleyicisi olarak da 5 mg/l NAA ve 1 mg/l kinetin eklenmiş olan Gresshof ve Doy (1972) besi ortamında, 25±1°C'deki koşullarda kültüre almıştır. Kültüre aldıktan üç hafta sonra anterlerin dış kısmına doğru çıkan beyazımsı kallus gelişimini gözlemiş ve bu kallusun, mikrospor orijinli gibi olduğunu bildirmiştir. Çalışmada kullanılan *G. hirsutum* L. türü ve *G. arboreum* L. x *G. anomalum* L. ve *G. arboreum* L. x *G. hirsutum* L. melezlerden kallus elde edilirken, *G. herbaceum* L. ve *G. arboreum* L. türlerinden kallus elde edilemediğini aktarmıştır.

Sunderland ve Roberts (1979), tütünde yaptıkları bir çalışmada, anterlere uygulanan 10-20 günlük 5-7 °C soğuk şoku uygulaması ile vejetatif çekirdek bölünmesi 24 saat içinde oluşmaya başlarken soğuk uygulanmayan anterlerde 6. günde oluşmaya başlamıştır.

Rashid ve Reinert (1980), 8 gün boyunca 10 °C soğuk muamelesi uyguladıkları tütün tomurcukları içerisindeki embriyojenik polen taneciklerini belirlemek için yoğunluk gradiyenti santrifüjleme yöntemini uygulamışlardır. 'Abinitio polen kültürü' adı verilen bu yöntemin ilk kez kullanımı ile % 2 oranında bir embriyogenesis başarısı elde edilmiştir.

Immura ve Harada (1980), aspirasyon ile azalan atmosferik basınç uygulamasıyla tütün anterlerinde ön muamele olan soğuk şoku uygulamasının polen embriyogenesisini arttırdığını belirlemişlerdir

Turaev ve Shamina (1985), 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) içerisinde glikoz bulunan

agar ile elde edilen Nitsch ortamlarında kültüre almışlardır. Araştırmacılar, kinetinin kallus oluşumu için olmazsa olmaz olmadığını; ancak diğer faktörlerle kombinasyon halinde iken pozitif etkiler ortaya çıkardığını; 2,4-D'nin, incelenen hatlarda kallus induksiyonunu sınırlayan bir etmen olduğunu ve 2 mg/l konsantrasyonunda kallus induksiyonunda pozitif bir etkiye sahip olduğunu; glikozun % 3'ü geçmemek koşuluyla gerekli olduğunu ve % 5-10 glikozda, tüm hatlarda, kallus oluşumunun inhibe olduğu sonucuna varmışlardır.

Bajaj (1990), anter kültüründe elde edilen başarının genotip, donör bitkinin yetiştirme şartları, anter ve çiçek gözüne yapılan ön muameleler, mikrospor gelişme safhası ve inkübasyon koşulları gibi çok sayıda şartlara bağlı olduğunu bildirmiştir.

Hassawi ve Liong (1990), buğday ve triticale'de yaptıkları çalışmada; çeşit, inkübasyon sıcaklığı ve çiçek tozu gelişimi döneminin anter kültürü üzerine etkilerini araştırmışlardır. İnkübasyon sıcaklığının kallus oluşturma ve bitki rejenerasyonu üzerine fazla etkisi olmadığını ancak çiçek tozu gelişim döneminin yanında kallus oluşumunun büyük ölçüde artırdığını bulmuşlardır.

Last ve Brettel (1990), yaptıkları bir çalışmada, besi ortamına sakkaroz yerine maltoz ilave edildiğinde, embriyoid formasyonunun 3-4 kat arttığını gözlemlemişlerdir.

Pescitelli ve ark. (1990), yaptıkları bir çalışmada, anterlerin izolasyonu tekniğinin, düşük sıcaklık uygulamasının ve sakkaroz seviyesinin mısır bitkisinde mikrospor kültürüne etkisini araştırmışlardır. İzolasyon tekniğinde pensler yardımıyla anterlerden kesilerek alınan mikrosporların ezilerek alınan mikrospora göre 3 kat daha fazla embriyoya benzer yapı elde edilebileceğini ortaya koymuşlardır. Ön sıcaklık uygulaması (15 °C'de 4 gün) yapılan mikrosporların ön sıcaklık uygulaması yapılmayanlara göre 2 kat daha fazla embriyoya benzer yapı elde edilebileceğini ve ayrıca en yüksek yanıt aldıkları sakkaroz konsantrasyonunun % 8-9.5 olduğunu yaptıkları çalışmalar ile ortaya koymuşlardır.

Lashermes ve ark. (1991), Batı Asya ve Kuzey Afrika'dan elde edilen bazı buğday genotiplerinde anter kültürü çalışmalarında; genotipler arasında varyasyon gözlendiğini ve sonuçların bitki ıslahı çalışmalarında kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Baba (1992), yaptığı bir çalışmada anter kültürü ile çeşitli yerli arpa çeşitlerinde N6 ortamında 15 ve 30 günlük +4 °C'de soğuk ön muamele sonucu kallus ve embriyoid eldesi

araştırılmıştır. 15 günlük ön uygulamada Tokak, Yerçil ve Gem çeşitlerinden kallus oluşurken, Gem çeşidinden ise embriyoid oluştuğu gözlenmiştir.

Ranaweera ve Pathirana (1992), susam bitkisi anterlerini kullanarak yürüttükleri doku kültürü çalışmasında, MS kültür ortamına ilave ettikleri, farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış 2,4-D, IAA (3-indolasetik asit) ve BAP (6- benzilaminopürin) büyüme düzenleyicileri kullanmışlardır. Eksplant olarak kullanacakları anterleri, çiçekler tam olarak açmadan önce alarak haploid bitki üretimi için oldukça önemli bir aşama olan soğuk ön işleme almışlar ve bu işlemi anterleri 8 °C'de 24 saat karanlık bir ortamda tutarak gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar farklı kombinasyonda ve konsantrasyonda hazırladıkları 5 farklı kültür ortamını, meydana gelen kallus yüzdelerini hesaplayarak kallus oluşumu için en uygun büyüme düzenleyici kombinasyonu ve konsantrasyonunu araştırmışlar ve bu ortamlardan hangisinin en iyi sonucu verdiğini araştırmışlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre 10mg/l 2,4-D, 2mg/l IAA ve 2mg/l BAP düzenleyicileri ile hazırlanan kültür ortamının en iyi sonuç verdiğini belirtmişlerdir.

Tiainen (1992), patatesten yapılmış olduğu anter kültürü çalışmasında Ağustos ayından Temmuz ayına kadar her ay anterleri kültüre almıştır. Ayrıca tomurcuklar +6 °C ve +30 °C ön sıcaklık uygulamalarına tabi tutulmuştur. Çalışmada hiçbir ön uygulamanın yapılmadığı kontrol grubu ve +6 °C'lik ön uygulama sonucunda iyi sonuç verdiğini belirlenmiştir. Sonuçlar aylar bazında değerlendirildiğinde, Eylül ve Ekim aylarında yüksek sonuçlar (% 15-20) elde edilmiştir. Ancak bu embriyolardan sadece % 6-8 oranında bitkiye dönüşüm sağlanmıştır. Şubat-Mayıs arasındaki aylarda alınan anterlerde embriyo oluşum oranı % 1-3 oranında olmuştur.

Ball ve ark. (1993), buğday anter kültüründe besi ortamında farklı 2,4-D ve IAA konsantrasyonları ile kallus indüksiyonunun etkilerini belirlemek için yaptıkları araştırmada, bitki büyüme düzenleyicisi konsantrasyonunun kallus sayısı, yeşil ve albino bitki sayısı ve bitki rejenerasyonunu büyük bir oranda etkilediğini, indüksiyon ortamına IAA'in yerine 2,4-D ilave edildiğinde reaksiyonun arttığını, 2,4-D'li ortamda bitki rejenerasyonunun azaldığını, ortama 0.3 mg/l IAA ilavesinin ise yeşil bitki yüzdesini artırdığını saptamışlardır.

Kristiansen ve Andersen (1993), biberde anter kültüründe kullanılacak olan donör bitkilerin yaşının, kültür esnasındaki sıcaklığın ve ışık süresinin etkisini araştırmışlardır. Sıcaklık olarak 22 °C, 26 °C ve 30 °C olmak üzere 3 farklı sıcaklık; ışık olarak 11, 15 ve 19

saat olmak üzere 3 farklı fotoperiyod kullanmışlardır. Çalışmanın sonucunda, sıcaklığın ve bitki yaşının embriyo oluşumunda etkili olduğunu, ancak fotoperiyodun etkili olmadığını belirlemişlerdir.

Kwon ve ark. (1993), *Sesamum indicum* ve *Sesamum orientale* çeşitlerinde hipokotil ve kotiledon eksplantları kullanarak kallus elde edilmesini araştırmışlardır. Çalışmalarında NAA, 2,4-D, BAP ve IAA'nın farklı konsantrasyonları ile modifiye edilmiş MS kültür ortamı kullanmışlardır. Çalışmalarındaki amaç farklı çeşitlerden alınan eksplantların üzerine büyüme düzenleyicilerinin herhangi bir etkisinin olup olmadığını belirlemektir. Elde ettikleri sonuçlar göre 1 - 2 mg/l NAA ve 0.2 - 0.6 mg/l BAP'ın kombinasyonunda hazırlanan besi ortamındaki hipokotil ve kotiledon eksplantlarının kallus oluşturma bakımından en yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

Hatipoğlu ve ark. (1994), ekmeklik buğday ıslahında anter kültürü üzerine yürüttükleri çalışmada rejenerasyon oranının genotiplere bağlı olarak büyük ölçüde değiştiğini saptamışlardır.

Zhang ve ark. (1996), yabani pamuk türü *Gossypium klotzschianum* Anderss'te yürütülen anter kültürü çalışmalarında, tek çekirdekli mikrosporlar içeren anterleri taşıyan taraklara yüzey sterilizasyonu (1 dk % 70'lik alkol, 7-10 dk % 0.1'lik HgCl₂, 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 yasama şansı ve çoğalmasının büyüme düzenleyicisi çesidi 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 edilmistir. 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.

Saisingtong ve ark. (1996), mısır bitkisinde anter kültürü süresince kolkisin kullanarak kromozom katlanması isimli çalışmalarında 5–1000 µl aralığında kolkhisin eklenmiş besi ortamlarına 1–7 gün arasında 140°C sıcaklık uygulamışlardır. En yüksek yanıtı ETH-M 36 isimli genotipten 250 mg/l de 7 günlük ön uygulamadan 9.9 dihaploid bitki /100 anter olacak şekilde elde etmişlerdir.

Zhang ve ark. (1998), pamuk bitkisinde anter kültürü yoluyla bitki rejenerasyonu için *Gossypium* cinsinin kültür ve yabancı türlerini de kapsayan 83 genotip üzerinde çalışma yapmışlar, sadece *G. hirsutum* L.'nin Lumian No. 6, Coker 201 ve Siokra 1-3 çeşitlerinden ve yabancı bir tür olan *G. klotzschianum* Anderss'ten embriyo ve rejeneratif bitkiler elde etmişlerdir. Çalışmada, *G. klotzschianum* Anderss anterlerinden, 0.1 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l kinetin içeren MS besi ortamında direkt olarak embriyogenik olan kallus oluşmuş, *G. hirsutum* anterlerinden ise sakkaroz bulunmayan besi ortamında embriyogenik kallus elde edilmiştir. Yaptıkları bu çalışmada, pamuk anter kültüründe hem haploid, hem de diploid hücrelerin elde edildiğini, haploid hücre oranının % 10 olarak belirlendiği ve rejeneratif bitkilerin bazılarının haploid bitkiler olduğu bildirilmiştir. Pamuk anter kültürlerinden embriyogenik kallus oluşumu ve haploid bitkilerin elde edilmesinde, genotipin çok önemli olduğu, alt kültür sayısının fazlalığının ise 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.

Başer ve ark. (1999), buğdayda anter kültürü için yaptıkları çalışmalarda buğdayın vermiş olduğu tepkinin genotiplere bağlı olarak değiştiğini, bazı genotiplerden yüksek tepki alınırken bazılarında ise tepki alınmadığını belirtmişlerdir. Çalışmaya alınan genotiplerde kallus, albino ve yeşil bitkicik sayısının genotiplere göre oran bazında değişim gösterdiğini saptamışlardır.

Terzioğlu ve ark. (2000), tarafından Kahramanmaraş biber populasyonunda anter kùltürü yapılarak, iki farklı inkübasyon koşulunun embriyo oluşunu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Denemeler sonucunda 29 °C’de ve sürekli ışıklandırılan koşullarda bekletilen anterlerden elde edilen embriyo sayısı, ilk 8 gün 35 °C ve karanlıkta tutulan, daha sonra fotoperiyodik düzende aydınlatılan ve 25 °C olan iklim odasında bekletilen anterlerden elde edilen embriyo sayısından daha fazla olduğunu saptamışlardır.

Korkut ve ark. (2003), yapmış oldukları bir çalışmada yerli ve yabancı ekmeklik buğday çeşit ile hatlarında haploid ve dihaploidlerin elde edilmesini araştırmışlardır. Ekmeklik buğday genotiplerinin kallus, albino ve yeşil bitkicik yanıtlarını düşük bulmuşlardır. 25 genotipten 23’ü kallus geliştirmiş, bunlardan 3 tanesinde hiçbir organogenesis görülmemiş, ancak 20 tanesinde organogenesis görülmüştür. 20 genotipin 15 tanesinde ise yeşil bitkicik elde etmişlerdir.

Ercan ve ark. (2001), 5 adet biber çeşidinde yaptıkları anter kùltürü uygulamasında 3 farklı besin ortamının kinetin, BA, NAA, 2,4-D ve aktif kömür içeren toplam 11 farklı versiyonunu kullanmışlardır. Araştırmada, % 1 aktif kömür + 5 mg/l 2,4-D + 5 mg/l kinetin içeren ortamlar ile aktif kömür + 4 mg/l NAA + 0.1 mg/l BA içeren MS besin ortamında, 35 °C’de 8 gün karanlıkta bekletilen anterlerden embriyo elde edilmiştir.

Korkut ve ark. (2003), ekmeklik buğdayın genotipleri üzerine yaptıkları çalışmalarda anter kùltüründe genotiplere göre değişmekle birlikte, yüksek oranda tepkiler elde etmişlerdir.

Çağlar ve ark. (2004), besin ortamlarının ve farklı sıcaklık ön uygulamalarının Kahramanmaraş kırmızı biber popùlasyonda anter kùltürü üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Ön uygulama olarak 4 °C, 29 °C ve 35 °C’de 7 gün süresince karanlıkta bekletmenin 37 farklı kombinasyonunu denemişlerdir. Besin ortamı denemelerinde NAA, 2,4-D, kinetin ve BA’nın farklı kombinasyonlarını denemeye almışlar ve besi ortamlarına 10 mg/l AgNO₃ ve % 0.25 aktif kömür eklemişlerdir. MS + 0.1mg/l BA + 4 mg/l NAA + % 0.25 aktif kömür + 10 mg/l AgNO₃ besi ortamından kallus gelişimi olmadan direkt haploid embriyolar elde edilmiştir.

Hassawı (2004), iki buğday çeşidi ile sürdürdüğü çalışmada 2 mg/l 2,4-D+ 1 mg/l kinetin içeren ortamda kùltüre alınan anterlerin 2 mg/l IAA + 1 mg/l kinetin içeren ortama göre önemli ölçüde daha yüksek kallus ve yeşil bitki oluşturduğunu saptamıştır.

Altındal (2005), çavdarda anter kültüründe önemli bir problem olan rejenerasyon kapasitesinin farklı uygulamalarla arttırılmasını amaçlamıştır. Diploid ve tetraploid kültür çavdarına ait anterlerin *in vitro* kültüründe, farklı uygulamaların kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonuna etkisi belirlenmeye çalışılmıştır. Denemede kültür ortamı olarak modifiye edilmiş N6 ortamı kullanılmıştır. Faktör olarak soğuk ön işlem (1 hafta +4 °C’de karanlıkta bekletme), ploidi (diploid ve tetraploid), karbon kaynakları (120 g/l maltoz ve 90 g/l sakaroz) ve hormonlar (2 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l kinetin ve 1 mg/l IAA) uygulanmıştır. Anterler 16 saat aydınlık / 8 saat karanlık olacak şekilde 2000-2200 lux arasında değişen aydınlatma koşullarında 22 °C’de tutulmuştur. Soğuk uygulaması anter tepki oranı ve kallus büyüklüğünü azaltmış, kallus oranını ise fazlaştırmıştır. Yine, soğuk uygulanmış anterlerden oluşan kalluslarda kök gelişiminin soğuk uygulanmayanlara göre daha fazla olduğu ortaya konulmuştur. Ploidi seviyesinin anter tepki oranı üzerine istatistiksel olarak önemsiz, kallus oluşumu ve kallus büyüklüğü üzerine ise önemli etkileri belirlenmiştir. Nitekim tetraploidlerde kallus büyüklüğü ve kallus oluşturan anter oranı diploidlerden daha yüksek, tepki gösteren anter oranı ise daha düşük bulunmuştur. Karbon kaynaklarının incelenen üç özelliğin (anter tepki oranı, kallus oranı ve kallus büyüklüğü) üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuş ve maltoz kullanıldığında kallus oranı ve kallus büyüklüğü artmış, anter tepki oranı ise azalmıştır. İncelenen özellikler (anter tepki oranı, kallus oranı ve kallus büyüklüğü) üzerine 2,4-D ve IAA in etkileri benzer olmuş ve aralarında önemli fark tespit edilmemiştir. İncelenen tüm faktörlerin (ön işlem x ploidi x karbon kaynakları x hormon) birbirleriyle olan etkileşimini istatistiksel olarak önemli olmuştur. Buna göre, araştırmada transforme olmayan değerler dikkate alındığında, tepki gösteren anter oranı % 27.00 - % 97.50, kallus oluşturan anter oranı % 13.00 - % 28.00, kallus büyüklüğü ise 1.03-6.03 mm arasında değişim göstermiştir.

Duran (2007), Ülkemizde ekonomik önemi olan *Triticum durum Desf.* (makarnalık buğday) (Gramineae)’un ‘Kundur 1149’, ‘Berkmen 469’ ve ‘DH-Berkmen’ genotipleri ile yapılan anter kültürü çalışmasında farklı süreli ön işlem koşullarının genotiplerin kallus oluşum miktarına olan etkisi araştırılmış ve en uygun ön işlem süresi ve genotip belirlenmiştir. Berkmen 469 genotipi % 0.62 kallus üretimi ile anter kültürüne en iyi cevap vermiş ve en iyi soğuk ön işlem süresi her genotip için 15 gün olarak belirlenmiştir. Oluşan kalluslar tuzlu koşullar için genotipler geliştirilebilmesi amacı ile MS kültür ortamına aktarılmıştır.

Memon ve ark. (2010), 3 farklı pamuk genotipi kullanarak olgunlaşmamış ovül ve anterden kallus elde etmeyi amaçlamışlardır. Çalışmada MS (Murashige ve Skoog) besi ortamı ve oksin türevlerinden olan 2,4-D, IAA, IBA ve Kinetin kullanmışlardır. Ancak anterlerden kallus elde edilememiştir. Ovülden ise % 88 oranında başarı sağlamışlardır. Bu çalışmada 2,4-D'nin konsantrasyonu 3 mg/l ve 4 mg/l'nin üzerine çıkarıldığında kallus miktarında azalma olduğu ortaya çıktığı gözlemlenmiştir.

Sarıer (2010), mısır bitkisinde anter kültürü ile yaptığı çalışmada 5 farklı besi ortamı ((MS-2) (IBA+Kinetin), YPI (2,4-D+IBA), MS-1 (2,4-D+NAA), N-6 (2,4-D+NAA) ve P II (IBA+Kinetin)) denemiş ve anter kültüründe tepkinin besi ortamı ve kullanılan genotiplere göre değişimini gözlemlemiştir.

Kaçar ve ark. (2014), ürettikleri bir çalışmada, öncelikle W. Murcott mandarin çeşidinde tek çekirdekli aşamadaki anterler tespit edilmiştir. Bu aşamadaki anterler ilk olarak ön uygulama olarak 4 °C ve 25 °C olmak üzere iki farklı sıcaklığa tabi tutulmuştur. Ön uygulamadan sonra anterler Nitsch ve Nitsch vitaminleri ile desteklenmiş N6 besin ortamında kültüre alınmıştır. Çalışmada, anterlerin gelişimini desteklemek amacıyla 0 mg/l TDZ, 0.1 mg/l TDZ ve 0.5 mg/l TDZ olmak üzere TDZ'nin üç farklı konsantrasyonu kullanılmıştır. Anterlerin yarısı karanlık diğer yarısı 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık olacak şekilde kültüre alınmıştır. Yapılan istatistiksel analizlerde en iyi gelişimin TDZ içermeyen ve 0.5 mg/l TDZ içeren ortamlarda olduğu tespit edilmiştir. Ön uygulamalar (4 °C ve 25 °C) arasında önemli bir fark bulunmamıştır. Kültür koşulları karşılaştırıldığında, karanlık koşullarda kültüre alınan anterlerin daha iyi gelişim gösterdiği belirlenmiştir. Anter kültüründe başarıyı etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Bunların arasında genotip, bitkilerin fizyolojik koşulları ve ön uygulamalar en başta gelmektedir. Bu çalışma kapsamında anterlerden elde edilen kalluslarda gelişim olduğu fakat embriyoid oluşmadığı gözlenmiştir. Bu durumun anter kültürünü etkileyen farklı faktörlerin etkilediği düşünülmektedir. Ayrıca turuncgillerde yürütülecek anter kültürü çalışmalarında anterlerin daha uzun sürelerde kültürde kalmalarının kallus ve embriyoid oluşumu bakımından etkili olabileceği düşünülmektedir.

3. MATERYAL ve METOT

2013-2015 yılları arasında yürütülen bu çalışmanın, denemelerde kullanılmak üzere tarla koşullarından elde edilen materyali, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Ziraat Fakültesi bünyesinde ki serada yetiştirilmiş olup, laboratuvar çalışmaları ise Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi ÜSKİM (Üniversite Sanayi Kamu İşbirliği Merkezi)'deki Doku Kültürü Laboratuvarında sürdürülmüştür.

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki materyali

Farklı pamuk türlerinden *Gossypium hirsutum* L. ait 1 adet *Gossypium barbadense* L. ait 1 adet olmak üzere toplam 2 adet genotip kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan pamuk genotipleri

Örnek	Genotip	Tür	Orijin	Genom
1.	Aşkabat 100	<i>G. barbadense</i> L.	Türkmenistan	AD
2.	Stoneville 453	<i>G. hirsutum</i> L.	A.B.D	AD

3.1.2. Besi ortamı

Çalışma da MS (1962) ve NRM (2004) besi ortamları kullanılmış olup ortam içerikleri Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan besi ortamları ve içerikleri

Makroelementler(mg/l)	NRM	MS
NH ₄ NO ₃	530	1650
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	700	-
CaCl ₂ .2H ₂ O	90	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	1600	370
KNO ₃	550	1900
KH ₂ PO ₄	1300	170
K ₂ SO ₄	-	-
Mikroelementler(mg/l)		
H ₃ BO ₃	6.2	6.2
CuSO ₄ .5H ₂ O	2.5	0.025
MnSO ₄ H ₂ O	20	16.9
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	2.5	0.25
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.8	8.6
Zn(NO ₃).6H ₂ O	-	-
Sequestrene 138 Fe	100	-
Sequestrene 130 Fe	-	-
FeSO ₄ .7H ₂ O	-	27.8
Na ₂ EDTA	-	37.3
KI	-	0.83
CoCl ₂ .6H ₂ O	-	0.025
Vitaminler(mg/l)		
Thiamine(B1)	0.6	0.1
Riboflavin(B2)	0.21	-
Nicotinic acid(B3)	1.15	0.5
Pyrodoxine(B6)	0.6	0.5
Vitamin E(a-tocopherol)	20	-
Vitamin C(Ascorbic acid)	1	-
Glycine	0.85	2
Folic acid	-	-
Biotin	-	-
Myinocitol	200	100
Sucreze	30(gr/l)	30(gr/l)
Agar	5.5(gr/l)	5.5(gr/l)
Gelrite	-	-

3.1.3. Hormonlar

Bitki büyüme düzenleyicilerinden olan oksin ve sitokin türevleri kullanılmıştır. Oksin türevlerinden; NAA (Naftalin asetik asit), IBA (Indol butirik asit), 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid), Sitokin türevlerinden; BA (Benzi ladenin), Kinetin ve TDZ (Thidiazuron) belirli konsantrasyonlarda kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Çalışmada kullanılacak tohumların toprak hazırlığı ve seraya ekilmesi

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Ziraat Fakültesi bünyesinde ki seraya, Mart ve Nisan aylarında (20.03.2014 - 08.04.2016) yaklaşık 200 adet saksıya, her bir saksıya 4 adet tohum gelecek şekilde ekim yapıldı. Tohumların çimlenmesi ve bitkilerin büyümesi için gerekli diğer tüm işlemler (sulama, gübreleme, ısıtma, seyreltme, hastalık ve zararlılar ile mücadele) zamanında gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1)



Şekil 3.1 Seradan görünüm a; Tohumların ekileceği sera, b; Tohumların ekilmesi, c; Ekimden 2 hafta sonra tohumların filizlenmesi, d; Tohumların filizlenmesinden 2.5 ay sonraki görüntüsü

3.2.2. Stok çözeltilerinin hazırlanması

3.2.2.1. Makro ve mikro elementlerin stok çözeltilerinin hazırlanması

Çizelge 3.2’de içerikleri verilen MS ve NRM besi ortamlarının makro ve mikro elementlerin standart besi ortamında bulunması gereken miktarlarının 10 katı olacak şekilde hassas terazide tartılmış ve otoklavlanmış ultrasaf su içeren balon jøjeye sırasıyla eklenip, içerisine miktatsız balık atılarak magnetik karıştırıcıda çözümleri sağlanmıştır. Elementler tamamen çözüldükten sonra karışımın hacmi 1000 ml’ye tamamlanmış daha sonra mikrodalgada kaynama aşamasına kadar ısıtılıp +4 °C deki buzdolabında muhafaza edilmiştir. Hazırlanacak her bir litre besi ortamı için, bu stok çözeltisinden kullanılmıştır.

Besi ortamında daha düşük konsantrasyonlarda bulunan mikroelementlerin ise ayrı ayrı stok çözeltileri hazırlanmıştır. Söz konusu mikroelementlerin her birisi standart besi ortamında bulunması gereken miktarının 100 katı olacak şekilde hassas terazide tartılmış ve otoklavlanmış ultra saf su içeren balon jøjeye ilave edilerek, içerisine miktatsız balık atılıp magnetik karıştırıcıda çözünmesi sağlanmıştır. Söz konusu element tamamen çözüldükten sonra karışımın hacmi 250 ml’ye tamamlanmış ve cam şişeye konularak +4 °C deki buzdolabında muhafaza edilmiştir. Hazırlanacak her bir litre besi ortamı için bu stok çözeltilerinin 1’er ml’si kullanılmıştır.

3.2.2.2. Vitamin stok çözeltisinin hazırlanması

Besi ortamında MS vitamin stoğu kullanılmıştır. Bu stoğun içerisinde Tiamin, Nicotinic Acid, Pyridoxine ve Glycine bulunmaktadır. Önceden hazırlanmış -20°C’de muhafaza edilen stoklardan vitamin stoğu karışımını hazırlamak için 50 ml lik falcon tüp kullanılmıştır. Bu nedenle 50 ml’lik stoktan 1 ml çektiğimiz de 0.1 mg Tiamin, 0.5 mg Pyridoxine, 0.5 mg Nicotinicacid ve 2 mg Glycine gelmektedir. Hazırlanan bu stok solüsyon +4 °C’deki buzdolabında muhafaza edilmiştir.

3.2.2.3. Büyüme düzenleyicilerin stok çözeltilerinin hazırlanması

Besi ortamları için hazırlanacak olan bitki büyüme düzenleyicilerinden ml konsantrasyonlu çözeltiler hazırlanmıştır. 100 mg büyüme düzenleyici hassas terazide tartılarak, üzerine % 60’lık C₂H₅OH eklenip çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra üzerine % 40’lık otoklavlanmış ultra saf su eklenerek 100 ml’ye tamamlanmıştır. Magnetik karıştırıcı

üzerinde hafif ısıtılarak oda sıcaklığında soğuması sağlanıp +4°C'deki buzdolabında muhafaza edilmiştir.

3.2.3. Besi ortamlarının hazırlanması

Çalışma da MS ve NRM besi ortamları kullanılmıştır. (Bkz. Çizelge 3.2)

Besi ortamlarını hazırlarken, makro ve mikro elementlerden istenilen hacme göre ölçülmüş vitaminler, şeker ve agar eklenerek otoklav edilmiştir. Stok olarak hazırlanan bitki büyüme düzenleyicilerde gerekli miktarda alınıp steril filtre olan kağıttan geçirilerek hazırlanan ortama karıştırılmıştır. Daha sonra streil kabin içerisinde elde edilen besiyeri 15cm çapında petrilere 20 ml dökülerek katılışmaları beklenmiştir.

3.2.3.1. Kontrol grubu besiyerinin hazırlanması

Besi ortamlarını hazırlarken, makro ve mikro elementler istenilen hacme göre ölçülmüş; vitaminler ve şeker eklendikten sonra ph 5.5'e ayarlanarak agar ilavesi yapılmıştır. 121°C de 15 dakika otoklav edildikten sonra oda sıcaklığında ilk sıcaklıklarını kaybeden besiyerler petrilere 20 aktarılmıştır. Kontrol grubu besiyerinde hormon kullanılmamıştır.

3.2.3.2. Farklı konsantrasyonlardaki bitki büyüme düzenleyicileri ile besiyerlerin hazırlanması

Kontrol grubunda ki gibi hazırlanan besiyerlerine ilave olarak, önceden stok olarak hazırlanan bitki büyüme düzenleyicilerinden gerekli miktarda alınıp steril filtrelili kağıttan geçirilerek hazırlanan ortama karıştırılmıştır. Daha sonra steril kabin içerisinde elde edilen besiyeri petrilere eşit 20 ml dökülerek katılışmaları beklenmiştir.(Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4)

Çizelge 3.3 Anterlerin aktarıldığı MS besi ortamlarının hormon konsantrasyonları

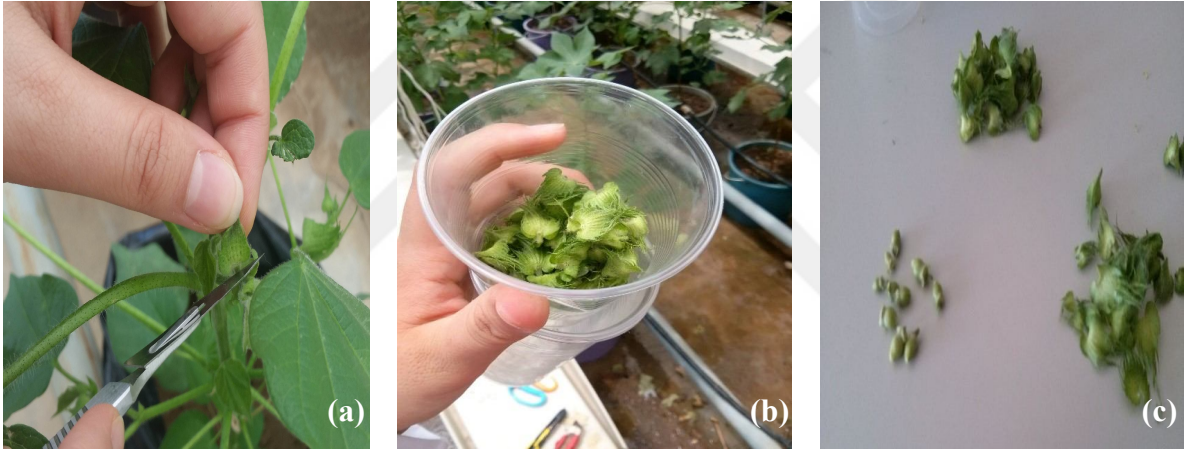
Ortam Numarası	Bitki Büyüme Düzenleyiciler		
1 numaralı MS ortamı	1 mg/l NAA	1 mg/l BA	-
2 numaralı MS ortamı	2 mg/l NAA	1 mg/l BA	-
3 numaralı MS ortamı	1 mg/l 2,4-D	1 mg/l Kinetin	1 mg/l NAA
4 numaralı MS ortamı	1 mg/l 2,4-D	1 mg/l Kinetin	2 mg/l NAA

Çizelge 3.4 Anterlerin aktarıldığı NRM besi ortamlarının hormon konsantrasyonları

Ortam Numarası	Bitki Büyüme Düzenleyiciler		
1 numaralı NRM ortamı	1 mg/l NAA	1 mg/l BA	-
2 numaralı NRM ortamı	2 mg/l NAA	1 mg/l BA	-
3 numaralı NRM ortamı	1 mg/l 2,4-D	1 mg/l Kinetin	1 mg/l NAA
4 numaralı NRM ortamı	1 mg/l 2,4-D	1 mg/l Kinetin	2 mg/l NAA

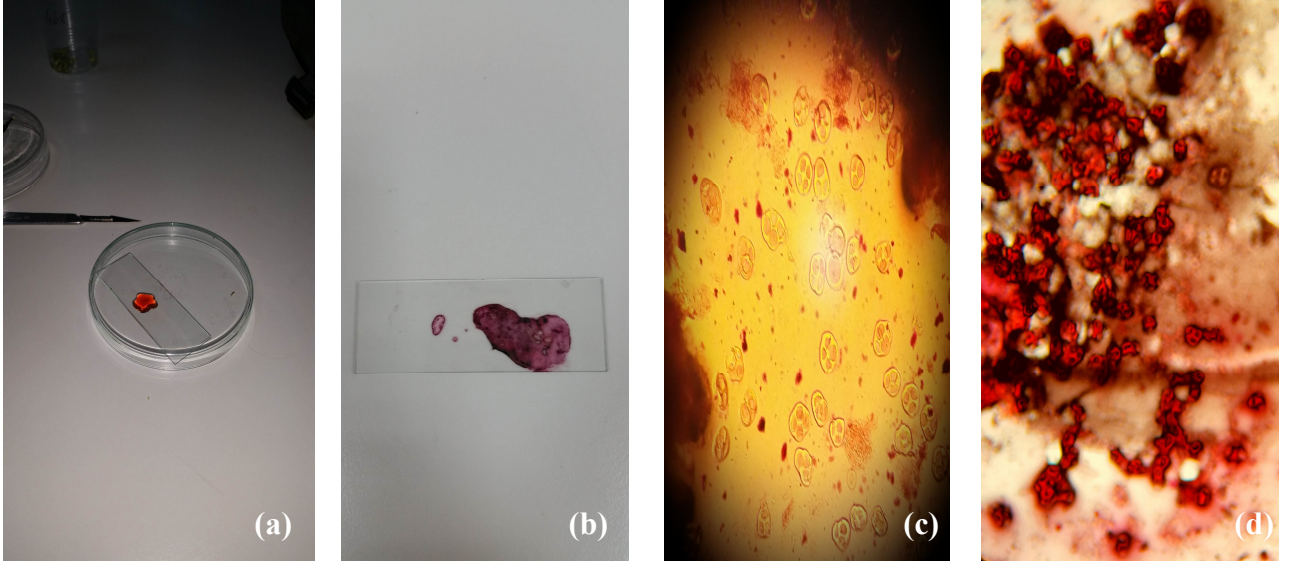
3.2.4. Tarakların seradan alınması ve incelenmesi

Mart ve Nisan aylarında ekimi yapılan *G.hirsutum* L. ve *G.barbedense* L. türlerine ait genotiplerden yaklaşık 2 ay kadar sonra taraklar toplu iğne başı şeklinde görülmeye başlanmıştır. Taraklar görülmeye başlandıktan 2 hafta sonunda istenilen boylarda 2 mm, 3 mm, 4 mm ve 5 mm taraklar alınmıştır.(Şekil 3.2)



Şekil 3.2 Tarakların oluşması a; büyüyen bitkilerden tarakların oluşması, b; çeşitli boylarda toplanan taraklar, c; toplanan tarakların dış kabuklarından ayıklanması

Seradan toplanan farklı boylardaki taraklar forsepe ve bistüri ile en uygun biçimde mikrosporlarından ayrılmış, sert bir cisimle ezilerek üzerlerine 1-2 damla asetokarmin boyası damlatılarak 10 dakika bekletilmiş çakmak ile ısıtılarak boyanın mikrosporlara nüfus etmesi sağlanmıştır. Daha sonra mikroskop altında incelenerek mikrosporların çekirdeklerinin bölünüp bölünmediği gözlemlenmiştir.(Şekil 3.3)

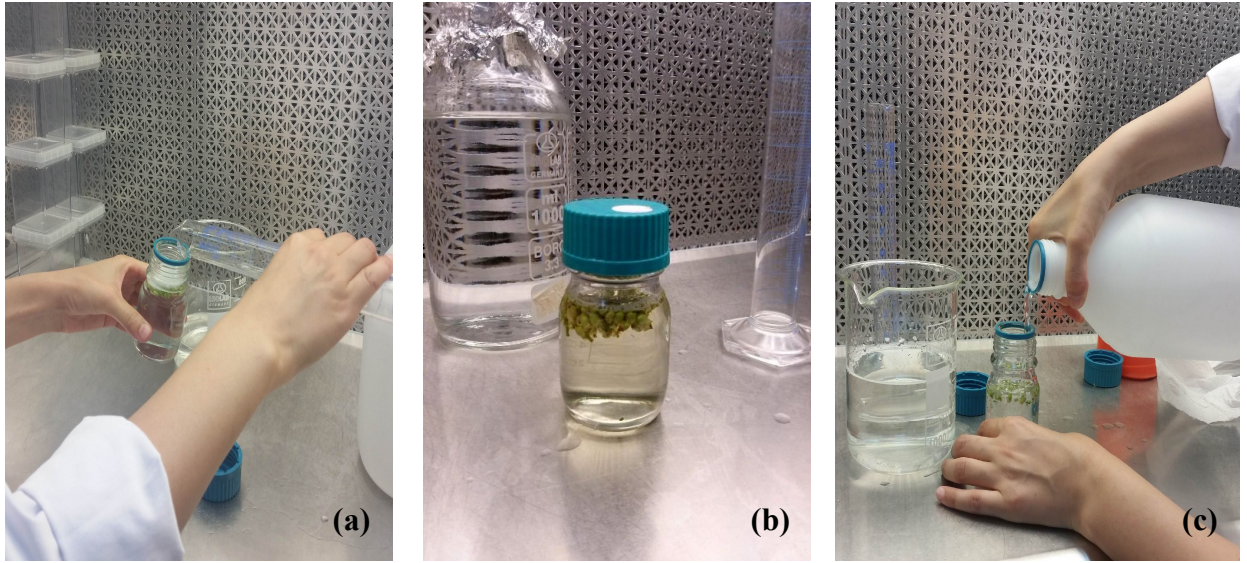


Şekil 3.3 Taraklardan ayrılan anterlerin mikroskopta incelenmesi, a;Ezilen mikrosporlara asetokarmin boyası damlatılarak bekletilmesi, b;10 dakika bekletilen boyanın nüfus etmesi için ısıtılması, c; 2 mm boyundaki taraktan alınan mikrosporların mikroskopta bölünmemiş olan tek çekirdeklerinin incelenmesi, d; 4 mm boyundaki taraktan alınan mikrosporların mikroskopta bölünmüş olan çekirdeklerinin incelenmesi

3.2.5. Yüzey sterilizasyon aşaması

Serada bulunan *G.hirsutum L.* ait Stoneville 453 ve *G. Barbadense L.*'ye ait Aşkabat 100 kumpas ile ölçülüp 2 mm, 3mm, 4mm ve 5 mm boyunda taraklar alınarak ÜSKİM de bulunan Bitki Doku Kültürü Labaratuvarına getirilmiştir.

Farklı boylardaki taraklar brakte yapraklarından uzaklaştırılmıştır. NAOH ile dezenfekte edilmiş steril kabin içerisinde hazırlanan % 20'lik sodyum hipoklorit çözeltisi, 1000 ml solüsyonun içerisine 2-3 damla Tween-20 damlatılarak hazır hale getirilmiştir. Hazırlanan bu solüsyon 250 ml cam şişeler(Şekil 3.4) içerisinde bulunan tarakların üzerine boşaltılmıştır. Taraklar 15 dakika boyunca bu solüsyon içinde çalkalanmıştır. Daha sonra otoklav edilmiş steril saf su ile 3-4 kez durulanmıştır.

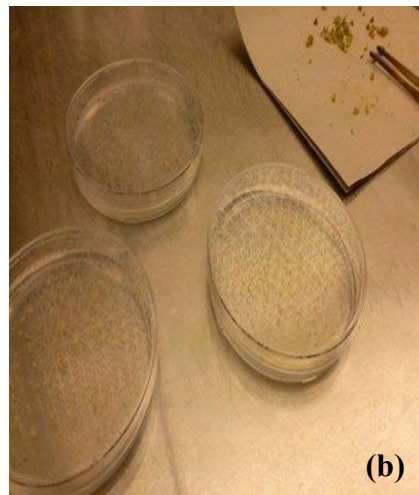


Şekil 3.4 Yüze sterilizasyonu, (a); %20'lik hazırlanan NaOH'ın tarakların üzerine boşaltılması, (b); 15 dakika boyunca ters yüz edilerek çalkalanan taraklar, (c); tarakların 3-4 defa steril saf su ile durulanması.

3.2.6. Mikrosporların besiyerine ekim aşaması

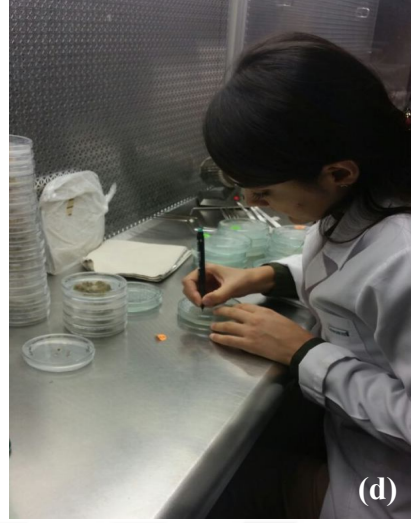
Yüze sterilizasyonu gerçekleştirilen taraklar, bir gün öncesinden hazırlanan besi ortamına, her tarak boyundan 3 tekerrür olacak şekilde, her petriye 5 adet taraktan forsep ve bistürü yardımıyla ayıklanan mikrosporlar ekilmiştir.

Mikrosporların ekim aşamasında mikrospor dışında herhangi bir bitki materyalinin gelmemesine özen gösterilmiştir. Petrilerin etrafları herhangi bir enfeksiyona karşı steril streç film ile kapatılarak dış ortamdaki atmosfere karşı ilişkisi kesilmiştir.(Şekil 3.5)





(c)



(d)

Şekil 3.5 Anterlerin ekim aşaması, (a); anterlerin çok dikkatli bir şekilde taraktan ayrılması, (b); anterlerin besi ortamına ekim aşaması, (c); ekimden sonra petrilerin streç film ile kapatılması, (d); petrilerin üzerine gerekli bilgilerin yazılması

Pescitelli ve ark. (1990)'da yaptıkları çalışmada pens ve bistüri yardımıyla anterlerden kesilerek alınan mikrosporların ezilerek alınan mikrospora göre 3 kat daha fazla embriyoya benzer yapı elde edilebileceğini ortaya koymuşlardır. Böylece bu çalışma da yapmış olduğumuz çalışmayı destekler niteliktedir.

3.2.7. Anterlerin gelişimi için şok uygulamaları

Pesticelli ve ark. (1990)'a göre şok uygulaması yapılan mikrosporların şok uygulaması yapılmayanlara göre 2 kat daha fazla embriyo elde edilmesini belirttiğinden çalışmamızda şok uygulaması yapılmıştır. Ekimi yapılan anterlere ilk önce +4 °C'de 1 saat boyunca buzdolabında soğuk şoku uygulanmıştır. Daha sonra +40 °C'de 1 saat boyunca etüv de sıcak şoku uygulanarak anter gelişimine ve kallus oluşumunun arttırılmasına teşvik edilmiştir. Sıcaklık şokunun ardından 25 °C'deki iklim odasında 10 gün boyunca karanlık şoku uygulanmıştır.

3.2.8. Oluşan kallus sayısı ve kallusların renklerinin gözlenmesi

a) Kallus sayısı

Petrilerde şok uygulamalarının ardından 1 aylık süre sonunda oluşan kallusların öncelikle cetvel yardımıyla büyüklükleri ölçülmüştür. Aynı boyda olan kallus yapılarının daha

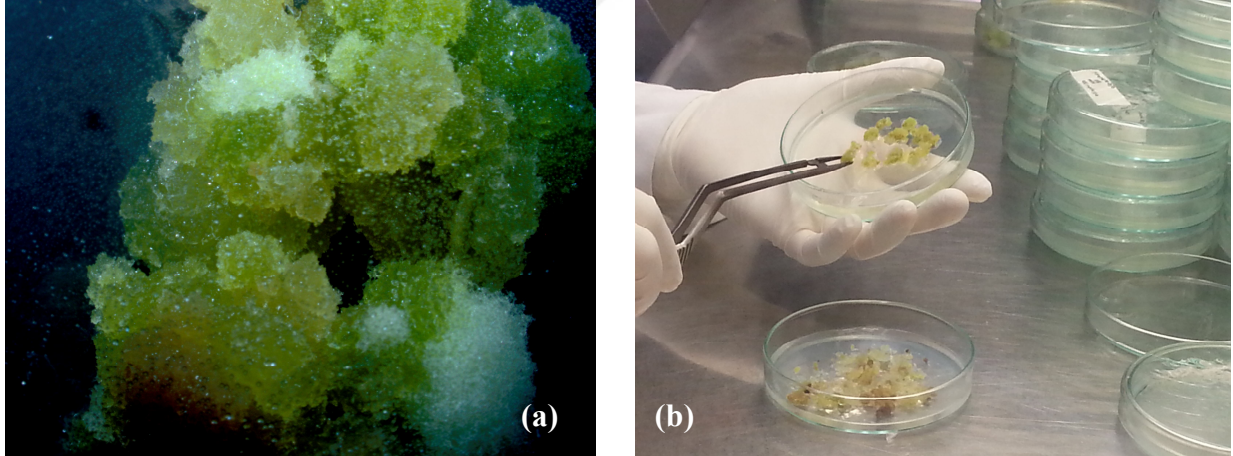
sonra kök yapılarıda dikkate alınarak, önceden hazırlanmış olan alt kültür besisi ortamına uygun biçimde ve aynı sayıda aktarımları yapılmıştır.

b)Kallus renginin gözlenmesi

Kalluslar 3. haftaya doğru oluşmaya başlayınca Stoneville 453 ve Aşkabat 100 genotiplerinde kallus rengi gözlemi yapılmış ve yeşil renkten sarımtırak renge doğru gruplandırılmıştır. İlerleyen haftalarda ise Stoneville 453 genotipinin kallusları sarı renk alırken, Aşkabat 100 genotipinden oluşan kalluslar yeşil renge dönüştüğü gözlenmiştir. Kallusların yeşil renk almasının Aşkabat 100 'ün genetik yapısından kaynaklandığı düşünülmektedir.

3.2.9. Kallus çoğaltma (alt kültür) aşaması

Besi ortamına aktarımı yapıldıktan sonra hafta da bir defa binoküler mikroskop altında gelişimi gözlenen anterlerin 3 hafta sonra kallus oluşturduğu gözlenmiştir. 6.hafta da yeterli büyüklüğe gelen kalluslar daha önceden hazırlanmış olan farklı konsantrasyonlarda hormon içeren besisi ortamında alt kültür çoğaltma aşamasına alınmıştır.(Şekil 3.6)



Şekil 3.6 Alt kültür aşamasında kalluslar (a); alt kültür aşamasına gelen kallusun binoküler mikroskop altında görüntüsü. (b); kallsuların alt kültür aşaması olarak farklı besii yerine aktarılması

Çizelge 3.5 Kallusların alt kültüre alındığı MS besi ortamlarının hormon konsantrasyonları

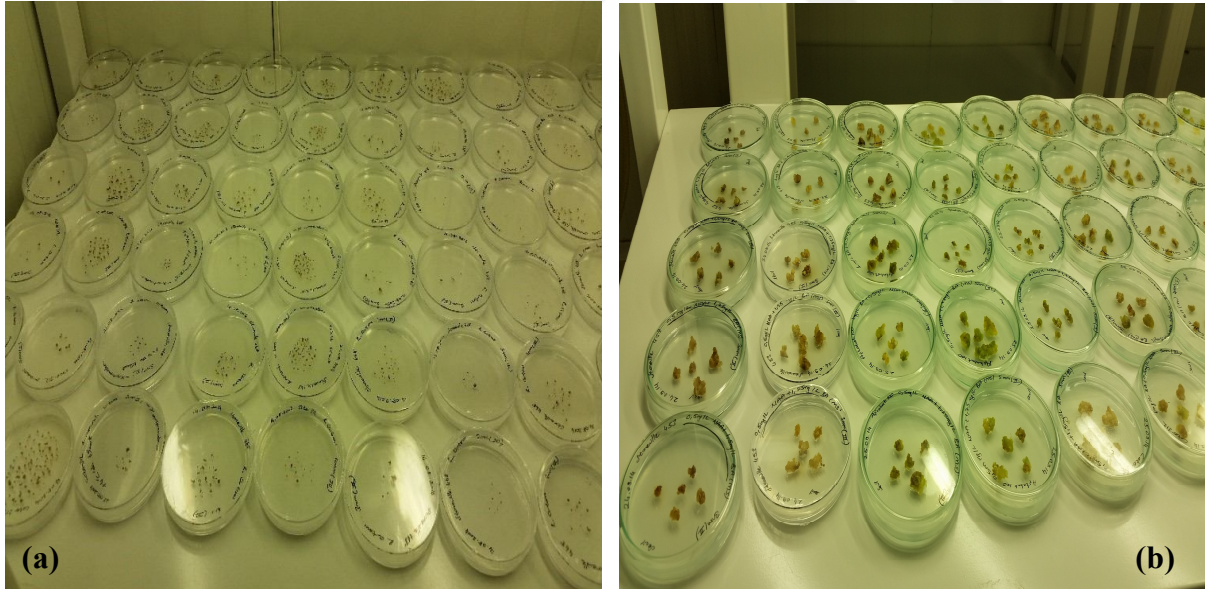
Ortam Numarası	Bitki Büyüme Düzenleyicileri		
1 numaralı MS ortamı	1 mg/l NAA	0.1 mg/l Kinetin	1 mg/l 2,4-D
2 numaralı MS ortamı	1 mg/l NAA	0.2 mg/l Kinetin	1 mg/l 2,4-D
3 numaralı MS ortamı	1 mg/l NAA	0.5 mg/l BA	0.5 mg/l TDZ
4 numaralı MS ortamı	0.5 mg/l NAA	0.5 mg/l BA	0.5 mg/l TDZ

Çizelge 3.6 Kallusların alt kültüre alındığı NRM besi ortamlarının hormon konsantrasyonları

Ortam Numarası	Bitki Büyüme Düzenleyicileri		
1 numaralı NRM ortamı	1 mg/l NAA	0.1 mg/l Kinetin	1 mg/l 2,4-D
2 numaralı NRM ortamı	1 mg/l NAA	0.2 mg/l Kinetin	1 mg/l 2,4-D
3 numaralı NRM ortamı	1 mg/l NAA	0.5 mg/l BA	0.5 mg/l TDZ
4 numaralı NRM ortamı	0.5 mg/l NAA	0.5 mg/l BA	0.5 mg/l TDZ

3.2.10. Rejenerasyon aşaması

Alt kültürde çoğaltılan kalluslar, Çizelge 3.4'de gösterilen farklı büyüme düzenleyicisi kombinasyonlarını içeren farklı MS ortamında kültüre alınarak, iklim odasında, 8 saat karanlık 16 saat aydınlık olacak şekilde 2000-2200 lux arasında değişen aydınlatma koşullarında 25 °C'de muhafaza edilmiştir.(Şekil 3.7)



Şekil 3.7 Karanlık evresinden sonra aydınlık ortama alınan petriyelerin iklim odasından görünümü; (a); anterlerin besi ortamına ilk aktarımı, (b); 6 hafta sonra alt kültür aşamasına gelen kalluslar.

3.2.11. Analiz

Genetik stoktan seçilerek ekimi yapılmış olan 2 genotipten, uygun taraklanma dönemi ve uygun besi ortamı için 3 tekerrürlü olarak kallus sayısı ve kallus rengi belirlenmiştir. Çalışmanın sonuçları SAS (V9.0)'da Tesadüf Parselleri Deneme Deseninde Varyans Analizine tabi tutulmuş ve ortalamalar arasındaki farklılıklar interaksiyonların fazla olmasından dolayı Tukey testine göre istatistiksel olarak analiz edilmiştir.



3. BULGULAR ve TARTIŞMA

3.3. Taraktan Elde Edilen Kallus İnteraksiyonu

Besi ortamlarında ilk olarak 10 gün boyunca karanlıkta kültüre alınan anterlerin süreç sonunda binoküler mikroskop altında gelişmeleri gözlenmiştir. Anterlerin gözlemler sırasında, başlangıçta saydam ve açık krem renkli olduğu gözlenmiştir. Kültür süresi ilerledikçe ve kallus oluşumu gözlendikçe Stoneville 453 genotipinden aktarım yapılan anterlerden sarımsı gevşek yapılı kalluslar gözlenmiştir Bu gözlem Baluch (1979)'un ve Türkoğlu (2004)'un gözlemleri benzerlik göstermiştir. Aşkabat 100 genotipinden aktarım yapılacak olan anterlerden ise oluşan kallusların açık sarımsı renkten yeşil renge dönüştüğü gözlenmiştir.

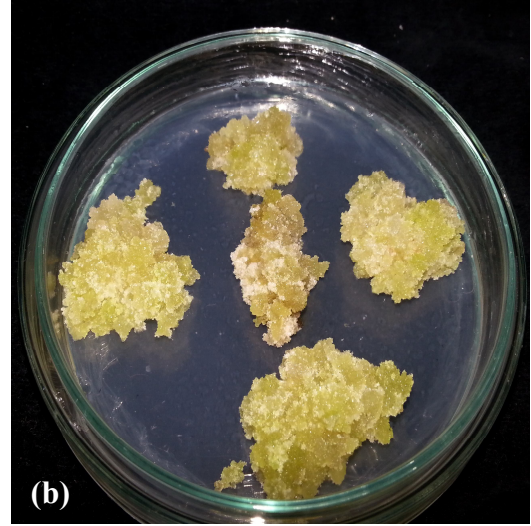
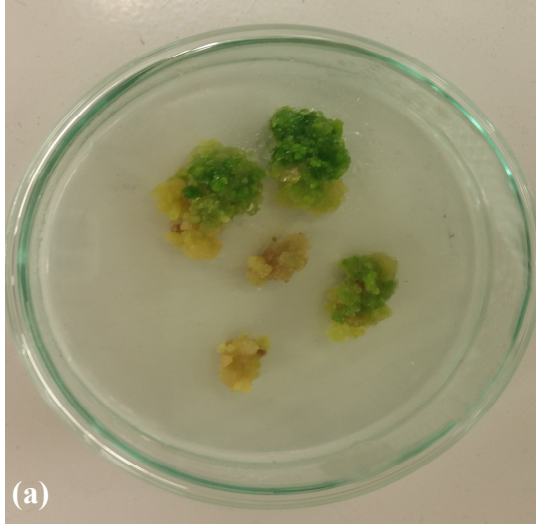
3.3.1. Genotip interaksiyonu

Stoneville 453 genotipi için; kalluslar oluşmaya başladıktan sonra aynı petri içerisinde bulunma süresi arttıkça yani alt kültür aşamasına geçilmediği sürece sarı renge dönüşen kallusların gün geçtikçe kahverengileşmeye kadar gittiği gözlenmiştir (Şekil 4.1). Bu gözlemimiz Zhang ve ark. (1996)'nın bulgularını destekler niteliktedir. Aşkabat 100 genotipinin açık sarımsı olarak kallus oluşturmaya başladıktan sonra yeşilimsi renge dönmesi genotiplerin genetik yapısından kaynaklandığı sonucuna varılmıştır.

Kallus sayısı genotipler arasındaki farkın istatistiki olarak önemli ($P < 0.05$) olduğu bulunmuştur. Bu farklılığın nedeni Aşkabat 100 (*G. barbadense* L.) genotipinin anter kültürüne, Stoneville 453 (*G. hirsutum* L.)'e göre daha olumlu tepki vermesinden ve tür farklılığından kaynaklandığı sonucuna varılmıştır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 Genotiplerin oluşturdukları renk ve kallus sayısı farkı

Genotip	Renk	Kallus Sayısı (Adet)
Aşkabat 100	2.00 a	0.94 a
Stoneville 453	1.00 b	0.16 b



Şekil 4.1 Genotiplerin oluşturdukları kallus renklerinde ki farklılıklar; (a); Aşkabat 100 genotipi, (b); Stoneville 453 genotipi

3.3.2. Besi ortamı interaksyonu

Çizelge 4.2 ve 4.3'e bakıldığında besi ortamı farklılığı Aşkabat 100 ve Stoneville 453 genotiplerinde renk üzerinde önemli bir etki yapmamıştır. Fakat MS besi ortamının her iki çeşit için de kallus sayısını önemli derecede artırdığı gözlenmiştir. Benzer sonuçlar Zang ve ark. (1996) tarafından da bildirilmiştir.

Çizelge 4.2 Aşkabat 100 genotipindeki besi ortamı interaksyonları

Besi Ortamı	Renk	Kallus Sayısı (Adet)
MS	1.5	0.711 a
NRM	1.5	0.395 b

Çizelge 4.3 Stoneville 453 genotipindeki besi ortamı interaksyonları

Besi Ortamı	Renk	Kallus Sayısı (Adet)
MS	1.5	0.523 a
NRM	1.5	0.149 b

3.3.3. Hormon konsantrasyonlarının interaksyonları

Çizelge 4.4 ve 4.5 incelendiğinde her iki genotip içinde MS ortamına eklenen farklı hormon konsantrasyonları kallus renginde bir değişikliğe sebep olmamıştır. Ancak 1mg/l NAA + 1mg/l 2,4-D + 1mg/l Kinetin uygulaması, 1mg/l NAA + 1mg/l BA, 2mg/l NAA +

1mg/l BA, 2mg/l NAA + 1mg/l 2,4-D + 1mg/l Kinetin uygulamalarının istatistiki olarak önemli ($P < 0.01$) derece de fazla kallus oluşturmuştur.

Benzer hormon konsantrasyonları ile yapılan çalışmalarda Kinetin ve 2,4-D oksin türevlerinden olan hormon konsantrasyonlarının bizim çalışmamızla benzer sonuçlar verdiği görülmüştür (Hassawi, 2004; Zhang ve ark., 1996).

Çalışmamız Türkoğlu ve ark. (2004) ve Çağlar ve ark. (2004), tarafından yapılan çalışmalarla azda olsa benzerlik gösterirken; Rashid ve Reinert (1980), Last ve Brettel (1990)'ın yapmış oldukları çalışmalar ile farklılık göstermektedir. Bu farklılıkların nedeni ise kullanılan genotiplerden veya hormon konsantrasyonlarından kaynaklanabildiği düşünülmektedir.

Aşkabat 100 genotipinde kallus sayısı 0.421 - 0.798 arasında değişmiştir. En fazla kallus sayısı 1mg/l NAA + 1mg/l 2,4-D + 1mg/l Kinetin hormon uygulanmasından elde edilmiştir.

Stoneville 453 genotipinde de Aşkabat 100 genotipinde olduğu gibi 1mg/l NAA + 1mg/l 2,4-D + 1mg/l Kinetin hormon konsantrasyonlarını içeren besi ortamında gelişen kallus sayısında miktar bakımından fazlaştığı gözlenmiştir.

Çizelge 4.4 Aşkabat 100 genotipindeki hormon konsantrasyonlarının interaksiyonları

Hormon Konsantrasyonları	Renk	Kallus Sayısı (Adet)
1mg/l NAA + 1mg/l BA	1.50	0.421 b
1mg/l NAA + 1mg/l 2,4-D + 1mg/l Kinetin	1.50	0.798 a
2mg/l NAA + 1mg/l BA	1.50	0.566 b
2mg/l NAA + 1mg/l 2,4-D + 1mg/l Kinetin	1.50	0.434 b

Çizelge 4.5 Stoneville 453 genotipindeki hormon konsantrasyonlarının interaksiyonları

Hormon Konsantrasyonları	Renk	Kallus Sayısı (Adet)
1mg/l NAA + 1mg/l BA	1.50	0.204 b
1mg/l NAA + 1mg/l 2,4-D + 1mg/l Kinetin	1.50	0.386 a
2mg/l NAA + 1mg/l BA	1.50	0.307 b
2mg/l NAA + 1mg/l 2,4-D + 1mg/l Kinetin	1.50	0.243 b

3.3.4. Şok uygulamasının interaksyonu

Her iki genotip de farklı derece sıcaklık şok uygulamalarının kallus rengin de bir değişikliğe neden olmadığı gözlenmiştir.

Çizelge 4.6. ve 4.7. de görüldüğü gibi +4 °C soğuk şok uygulamasının kallus oluşumu üzerine önemli derece de etkisi olurken +40 °C sıcaklık şok uygulamasının tek başına etkisi önemsiz olmuştur. +4 °C ve +40 °C sıcaklıkların birlikte 1 er saat aralıklarla uygulanması kallus oluşumu için daha etkili olduğu gözlenmiştir. Benze bulgular Sunderland ve Roberts (1979) tarafından da bulunmuş ve soğuk şoku uygulaması anterlerin sonraki aşamaları için olumlu yönde seyrettiğini ifade etmişlerdir. Immura ve Harada (1980), ise soğuk şoku uygulamalarının polende embriyogenesi arttırdığını belirlemişlerdir. Altındal (2005) 1 hafta +4 °C soğuk ve karanlık ortamda daha sonra ise iklim odasında 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık olacak şekilde 2000-2200 lux arasında değişen aydınlatma koşullarında 22 °C’de tutularak bu uygulamanın kallus oluşum miktarını fazlalaştırdığını saptamıştır. Kaçar ve ark.(2014) karanlık uygulamasının kallus gelişimi üzerine olumlu etkilediği ancak +4 °C ve +25 °C’nin arasında bekletmenin kalluslar üzerinde önemli bir etkinin olmadığını bildirmişler ve yaptıkları çalışmada kallus oluştuğu ancak embriyonit oluşmadığı gözlemişlerdir. Bizim belirlemiş olduğumuz sonuçlar ile Kaçar ve ark. (2014)’nin çalışmasıyla kısmen benzerlik göstermektedir.

Çizelge 4.6. Aşkabat 100 genotipindeki şok uygulaması interaksyonları

Şok Uygulaması	Renk	Kallus Sayısı (Adet)
+4 °C	1.50	0.729 a
+40 °C	1.50	0.125 b
+4 ° ve + 40 °C birlikte	1.50	0.807 a

Çizelge 4.7. Stoneville 453 genotipindeki şok uygulaması interaksyonları

Şok Uygulaması	Renk	Kallus Sayısı (Adet)
+4 °C	1.50	0.426 a
+40 °C	1.50	0.053 b
+4 ° ve + 40 °C birlikte	1.50	0.589 a

3.3.5. Tarak boylarının interaksyonu

Farklı boylarda alınarak uygulamaya alınan tarakların kallus rengine bir etkisi olmadığı gözlenmiştir.

En fazla kallus sayısı her iki genotipte önemli derecede 5 mm'lik tarak boylarından elde edilmiştir. Tarak büyüklüğü arttıkça kalus oluşturma gücünün de arttığı belirlenmiştir. Ancak 5 mm'lik tarak boylarında çekirdek bölünmesi gerçekleşmiş olduğundan dolayı haploid bitkilerin elde edilmesinde kullanılmak üzere daha küçük boyutlarda tarakların kullanılmasının uygun olduğu söylenebilir (Çizelge 4.8 ve 4.9). Diğer bir deyişle, haploid bitkiler çekirdek bölünmesi gerçekleşmemiş anterlerin mikrosporlarından oluşan kalluslardan meydana gelen embriyolardan elde edildiği zaman daha sağlıklı sonuçlara varılacaktır. Türkoğlu (2004)'nin yapmış olduğu çalışmada 5-8 mm boyundaki taraklardan yararlanarak kallus oluşturmuş ve haploid bitki elde etmeyi başarmıştır. Ancak anterlerin besi ortamına aktarılmadan önce çekirdek bölünmesinin olup olmadığına bakmamıştır. Bu çalışmanın tarak boyu alım aşaması yapmış olduğumuz çalışmaya ters düşmektedir. Yapmış olduğumuz çalışmaya göre tarak büyüklüğünün 2 mm, 3 mm, 4 mm'den alınması gerekmektedir. En iyi sonuç için ise 3 mm'lik boyundaki tarakların kullanılmasıyla elde edilmiştir.

Çizelge 4.8 Aşkabat 100 genotipindeki tarak boyu interaksyonları

Tarak Boyu	Renk	Kallus Sayısı (Adet)
2 mm	1.50	0.444 b
3 mm	1.50	0.472 b
4 mm	1.50	0.437 b
5 mm	1.50	0.861 a

Çizelge 4.9 Stoneville 453 genotipindeki tarak boyu interaksyonları

Tarak Boyu	Renk	Kallus Sayısı (Adet)
2 mm	1.50	0.256 b
3 mm	1.50	0.278 b
4 mm	1.50	0.345 b
5 mm	1.50	0.446 a

3.3.6. İnteraksiyonların kallus sayısına etkisi

Yapılan varyans analizi sonucunda genotip*besi ortamı*hormon konsantrasyonu, genotip*besi ortamı*hormon konsantrasyonu*şok uygulaması, genotip*besi ortamı*hormon konsantrasyonu*tarak boyu, genotip*besi ortamı*hormon konsantrasyonu*şok uygulaması*tarak boyu interaksyonları önemsiz çıkarken, besi ortamı*hormon

konsantrasyonu, genotip*besi ortamı*şok uygulaması, genotip*hormon konsantrasyonu*şok uygulaması, besi ortamı*hormon konsantrasyonu*şok uygulaması, besi ortamı*şok uygulaması*tarak boyu, besi ortamı*hormon konsantrasyonu*tarak boyu, besin ortamı*hormon konsantrasyonu*şok uygulaması*tarak boyu interaksiyonları önemli ($P < 0.05$) diğerlerinin ise çok önemli ($P < 0.01$) olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.10).

Çizelge.4.10 Uygulanan interaksiyonların kallus sayısına etkisi (BS; Besi ortamı, HK; Hormon konsantrasyonu, ŞU; Şok uygulaması, TB; Tarak boyu, *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$)

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik Derecesi	Kareler toplamı	Karelerin Ortalaması	F Değeri
Tekerrür	2	22.52	11.26	26.86**
Genotip	1	87.89	87.89	209.65**
BS	1	14.376	14.37	34.29**
HK	3	12.54	4.18	9.98**
ŞU	2	53.54	26.77	63.86**
TB	3	18.22	6.07	14.49**
Genotip*BS	1	6.46	6.46	15.41**
Genotip*HK	3	7.68	2.56	6.11**
Genotip*ŞU	2	23.69	11.84	28.26**
Genotip*TB	3	23.42	7.80	18.62**
BS*HK	3	4.50	1.50	3.58*
BS*ŞU	2	6.42	3.21	7.66**
BS*TB	3	6.79	2.26	5.40**
HK*ŞU	6	23.63	3.93	9.40**
HK*TB	9	20.75	2.30	5.50**
ŞU*TB	6	13.95	2.32	5.55**
Genotip*BS*HK	3	1.89	0.63	1.51
Genotip*BS*ŞU	2	3.71	1.85	4.43*
Genotip*BS*TB	3	5.79	1.93	4.61**
Genotip*HK*ŞU	6	5.37	0.89	2.14*
Genotip*HK*TB	9	11.19	1.24	2.97**
Genotip*ŞU*TB	6	15.30	2.55	6.08**
BS*HK*ŞU	6	7.09	1.18	2.82*
BS*ŞU*TB	6	5.88	0.98	2.34*
BS*HK*TB	9	8.84	0.98	2.35*
HK*ŞU*TB	18	30.42	1.69	4.03**
Genotip*BS*HK*ŞU	6	2.57	0.42	1.03
Genotip*BS*HK*TB	9	5.48	0.60	1.45
Genotip*HK*ŞU*TB	18	20.85	1.15	2.76**
Genotip*BS*ŞU*TB	6	2.42	0.40	0.96
BS*HK*ŞU*TB	18	12.48	0.69	1.66*
Genotip*BS*HK*ŞU*TB	18	6.39	0.35	0.85
Hata	382	160.14	0.41	
Genel	575	652.33		

Çizelge 4.11 de Aşkabat 100 genotipinde MS besisi ortamının 1 mg/l NAA + 1 mg/l BA hormon konsantrasyonuna bakacak olursak; 4 °C şok uygulamasında 3 mm ve 4 mm tarak boyunda, 40 °C şok uygulamasında 4 mm tarak boyunda, 4 °C ve 40 °C'nin birlikte uygulandığı 5 mm tarak boyunda en fazla kallus sayısının olduğu görülmektedir. Aşkabat 100 genotipinde MS besisi ortamının 2 mg/l NAA + 1 mg/l BA hormon konsantrasyonuna bakacak olursak; 4 °C şok uygulamasında 5 mm tarak boyunda, 40 °C şok uygulamasında 3mm ve 4 mm, 4 °C ve 40 °C'nin şok uygulamasının birlikte uygulandığı 3 mm tarak boyunda en fazla kallus sayısının olduğu görülmektedir. Aşkabat 100 genotipinde MS besisi ortamının 1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l Kinetin + 1 mg/l NAA hormon konsantrasyonunda 4 °C şok uygulamasında 5 mm, 40 °C şok uygulamasında 3 mm, 4 °C ve 40 °C'nin şok uygulamasının birlikte uygulandığı 2 mm tarak boyunda en fazla kallus sayısının olduğu görülmektedir. Aşkabat 100 genotipinde MS besisi ortamının 1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l Kinetin + 2 mg/l NAA hormon konsantrasyonunda 4 °C şok uygulamasında 2 mm ve 5 mm, 40 °C şok uygulamasında 2 mm ve 4 mm, 4 °C ve 40 °C'nin şok uygulamasının birlikte uygulandığı 5 mm tarak boyunda en fazla kallus sayısının olduğu görülmektedir.

Aşkabat 100 genotipinde NRM besisi ortamının 1 mg/l NAA + 1 mg/l BA hormon konsantrasyonunda 4 °C şok uygulamasında 5 mm, 4 °C ve 40 °C şok uygulamasının birlikte uygulandığı 2 mm tarak boyunda en fazla kallus sayısının olduğu görülürken 40 °C'nin tek başına uygulandığı şok uygulanmasında hiç kallus oluşmadığı görülmektedir. Aşkabat 100 genotipinde NRM besisi ortamının 2 mg/l NAA + 1 mg/l BA hormon konsantrasyonunda 4 °C şok uygulamasında 4 mm ve 5 mm, 40°C şok uygulamasında 5 mm, 4 °C ve 40 °C şok uygulamasının birlikte uygulandığı 4 mm tarak boyunda en fazla kallus sayısının olduğu görülmektedir. Aşkabat 100 genotipinde NRM besisi ortamının 1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l Kinetin + 1 mg/l NAA hormon konsantrasyonunda 4 °C şok uygulamasında 5 mm, 40 °C şok uygulamasında 5 mm, 4 °C ve 40 °C şok uygulamasının birlikte uygulandığı 5 mm tarak boyunda en fazla kallus sayısının olduğu görülmektedir.

Stoneville 453 genotipinde MS besisi ortamının 1 mg/l NAA + 1 mg/l BA hormon konsantrasyonunda 4 °C şok uygulamasında 2mm, , 40 °C şok uygulamasında 4 mm, 4 °C ve 40 °C şok uygulamasının birlikte uygulandığı 2 mm tarak boyunda en fazla kallus sayısının olduğu görülmektedir. Stoneville 453 genotipinde MS besisi ortamının 2 mg/l NAA + 1 mg/l BA hormon konsantrasyonunda 4 °C şok uygulamasında 4 mm ve 5 mm, 4 °C ve 40 °C'nin şok uygulamasının birlikte uygulandığı 4mm tarak boyunda en fazla kallus sayısının olduğu

görülürken 40 °C'nin tek başına uygulandığı şok uygulamasında kallus oluşmadığı sonucuna varılmıştır. Stoneville 453 genotipinde MS besisi ortamının 1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l Kinetin + 1 mg/l NAA hormon konsantrasyonunda 4 °C şok uygulamasında 4 mm, 4 °C ve 40 °C'nin şok uygulamasının birlikte uygulandığı 2 mm tarak boyunda en fazla kallus sayısının oluştuğu görülürken 40 °C'nin tek başına uygulandığı şok uygulamasında kallus oluşmadığı sonucuna varılmıştır. 1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l Kinetin + 2 mg/l NAA hormon konsantrasyonunda 4 °C şok uygulamasında 4 mm, 4° C ve 40 °C'nin şok uygulamasının birlikte uygulandığı 2 mm tarak boyunda en fazla kallus sayısının oluştuğu görülürken 40 °C'nin tek başına uygulandığı şok uygulamasında kallus oluşmadığı sonucuna varılmıştır.

Stoneville 453 genotipinde NRM besisi ortamının 1 mg/l NAA + 1 mg/l BA hormon konsantrasyonunda 4 °C şok uygulamasında 3 mm, 40° C şok uygulamasında 3 mm, 4 °C ve 40 °C'nin şok uygulamasının birlikte uygulandığı 3mm tarak boyunda en fazla kallus sayısının oluştuğu görülmüştür. Stoneville 453 genotipinde NRM besisi ortamının 2 mg/l NAA + 1 mg/l BA hormon konsantrasyonunda 4 °C şok uygulamasında 3mm, 40 °C şok uygulamasında kallus oluşmazken 4 °C ve 40 °C şok uygulamasının birlikte uygulandığı şok uygulanmasında da kallus oluşmamıştır. Stoneville 453 genotipinde NRM besisi ortamının 1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l Kinetin + 1 mg/l NAA hormon konsantrasyonunda 4 °C ve 40 °C şok uygulamasının ayrı ayrı uygulandığı uygulamada kallus oluşmazken, 4 °C ve 40 °C şok uygulamasının birlikte uygulandığı 5 mm tarak boyunda kallus oluştuğu görülmektedir. Stoneville 453 genotipinde NRM besisi ortamının 1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l Kinetin + 2 mg/l NAA hormon konsantrasyonunda 4 °C ve 40 °C şok uygulamasının birlikte uygulandığı 5 mm tarak boyunda kallus oluştuğu görülmektedir.

Çizelge 4.11. Uygulanan interaksiyonların kallus sayısı ve renk üzerine etkisi (BS; Besi ortamı, HK; Hormon konsantrasyonu, ŞU; Şok uygulaması, KS; Kallus sayısı)

Genotip	BS	HK	ŞU	TB	KS	Renk
Aşkabat 100	MS	1 mg/l NAA + 1 mg/l BA	4 °C	2 mm	0.66	100.00
				3 mm	133.33	100.00
				4 mm	133.33	100.00
				5 mm	100.00	100.00
			40 °C	2 mm	0.33	100.00
				3 mm	0.33	100.00
				4 mm	100.00	100.00
				5 mm	0.00	100.00
			4 °C + 40 °C	2 mm	166.66	100.00
				3 mm	166.66	100.00
				4 mm	133.33	100.00
				5 mm	200.00	100.00
		2 mg/l NAA + 1 mg/l BA	4 °C	2 mm	133.33	100.00
				3 mm	233.33	100.00
				4 mm	233.33	100.00
				5 mm	400.00	100.00
			40 °C	2 mm	0.33	100.00
				3 mm	0.66	100.00
				4 mm	0.66	100.00
				5 mm	0.33	100.00
			4 °C + 40 °C	2 mm	233.33	100.00
				3 mm	266.66	100.00
				4 mm	200.00	100.00
				5 mm	233.33	100.00
		1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l Kinetin + 1 mg/l NAA	4 °C	2 mm	100.00	100.00
				3 mm	100.00	100.00
				4 mm	100.00	100.00
				5 mm	133.33	100.00
			40 °C	2 mm	0.33	100.00
				3 mm	100.00	100.00
				4 mm	0.33	100.00
				5 mm	0.33	100.00
			4 °C + 40 °C	2 mm	166.66	100.00
				3 mm	100.00	100.00
				4 mm	0.66	100.00
				5 mm	333.33	100.00
		1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l Kinetin + 2 mg/l NAA	4 °C	2 mm	100.00	100.00
				3 mm	0.66	100.00
				4 mm	0.33	100.00
				5 mm	100.00	100.00
			40 °C	2 mm	0.33	100.00
				3 mm	0.00	100.00
				4 mm	0.33	100.00
				5 mm	0.00	100.00
			4 °C + 40 °C	2 mm	200.00	100.00
				3 mm	133.33	100.00
				4 mm	100.00	100.00
				5 mm	300.00	100.00

Çizelge 4.11.'in devamı (BS; Besi ortamı, HK; Hormon konsantrasyonu, ŞU; Şok uygulaması, KS; Kallus sayısı)

Genotip	BS	HK	ŞU	TB	KS	Renk
Aşkabat 100	NRM	1 mg/l NAA + 1 mg/l BA	4 °C	2 mm	0.66	100.00
				3 mm	0.66	100.00
				4 mm	0.66	100.00
				5 mm	133.33	100.00
			40 °C	2 mm	0.00	100.00
				3 mm	0.00	100.00
				4 mm	0.00	100.00
				5 mm	0.00	100.00
			4 °C + 40 °C	2 mm	0.33	100.00
				3 mm	0.00	100.00
				4 mm	0.00	100.00
				5 mm	0.00	100.00
		2 mg/l NAA + 1 mg/l BA	4 °C	2 mm	100.00	100.00
				3 mm	133.33	100.00
				4 mm	300.00	100.00
				5 mm	300.00	100.00
			40 °C	2 mm	0.00	100.00
				3 mm	0.00	100.00
				4 mm	0.00	100.00
				5 mm	0.33	100.00
			4 °C + 40 °C	2 mm	0.66	100.00
				3 mm	0.33	100.00
				4 mm	100.00	100.00
				5 mm	0.33	100.00
		1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l Kinetin + 1 mg/l NAA	4 °C	2 mm	133.33	100.00
				3 mm	0.00	100.00
				4 mm	0.00	100.00
				5 mm	200.00	100.00
			40 °C	2 mm	0.00	100.00
				3 mm	0.00	100.00
				4 mm	0.00	100.00
				5 mm	0.33	100.00
			4 °C + 40 °C	2 mm	0.00	100.00
				3 mm	0.66	100.00
				4 mm	0.00	100.00
				5 mm	666.66	100.00
		1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l Kinetin + 2 mg/l NAA	4 °C	2 mm	133.33	100.00
				3 mm	0.00	100.00
				4 mm	0.00	100.00
				5 mm	200.00	100.00
			40 °C	2 mm	0.00	100.00
				3 mm	0.00	100.00
				4 mm	0.00	100.00
				5 mm	0.33	100.00
			4 °C + 40 °C	2 mm	0.00	100.00
				3 mm	0.00	100.00
				4 mm	0.00	100.00
				5 mm	333.33	100.00

Çizelge 4.11.'in devamı (BS; Besi ortamı, HK; Hormon konsantrasyonu, ŞU; Şok uygulaması, KS; Kallus sayısı)

Genotip	BS	HK	ŞU	TB	KS	Renk	
Stoneville 453	MS	1 mg/l NAA + 1 mg/l BA	4 °C	2 mm	0.66	200.00	
				3 mm	0.33	200.00	
				4 mm	0.00	200.00	
				5 mm	0.33	200.00	
			40 °C	2 mm	0.00	200.00	
				3 mm	0.00	200.00	
				4 mm	0.33	200.00	
			4 °C + 40 °C	5 mm	0.00	200.00	
				2 mm	0.66	200.00	
				3 mm	0.00	200.00	
			2 mg/l NAA + 1 mg/l BA	4 °C	4 mm	0.33	200.00
					5 mm	100.00	200.00
		2 mm			0.00	200.00	
		3 mm			0.00	200.00	
		40 °C		4 mm	0.00	200.00	
				5 mm	0.00	200.00	
				2 mm	0.00	200.00	
		4 °C + 40 °C		3 mm	0.66	200.00	
				4 mm	100.00	200.00	
				5 mm	0.00	200.00	
		1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l Kinetin + 1 mg/l NAA		4 °C	2 mm	0.00	200.00
					3 mm	0.00	200.00
			4 mm		0.33	200.00	
			5 mm		0.00	200.00	
			40 °C	2 mm	0.00	200.00	
				3 mm	0.00	200.00	
				4 mm	0.00	200.00	
			4 °C + 40 °C	5 mm	0.00	200.00	
				2 mm	0.66	200.00	
				3 mm	0.00	200.00	
			1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l Kinetin + 2 mg/l NAA	4 °C	4 mm	0.33	200.00
					5 mm	0.00	200.00
		2 mm			0.00	200.00	
		3 mm			0.00	200.00	
		40 °C		4 mm	0.00	200.00	
				5 mm	0.00	200.00	
				2 mm	0.00	200.00	
		4 °C + 40 °C		3 mm	0.66	200.00	
				4 mm	0.33	200.00	
				5 mm	0.00	200.00	

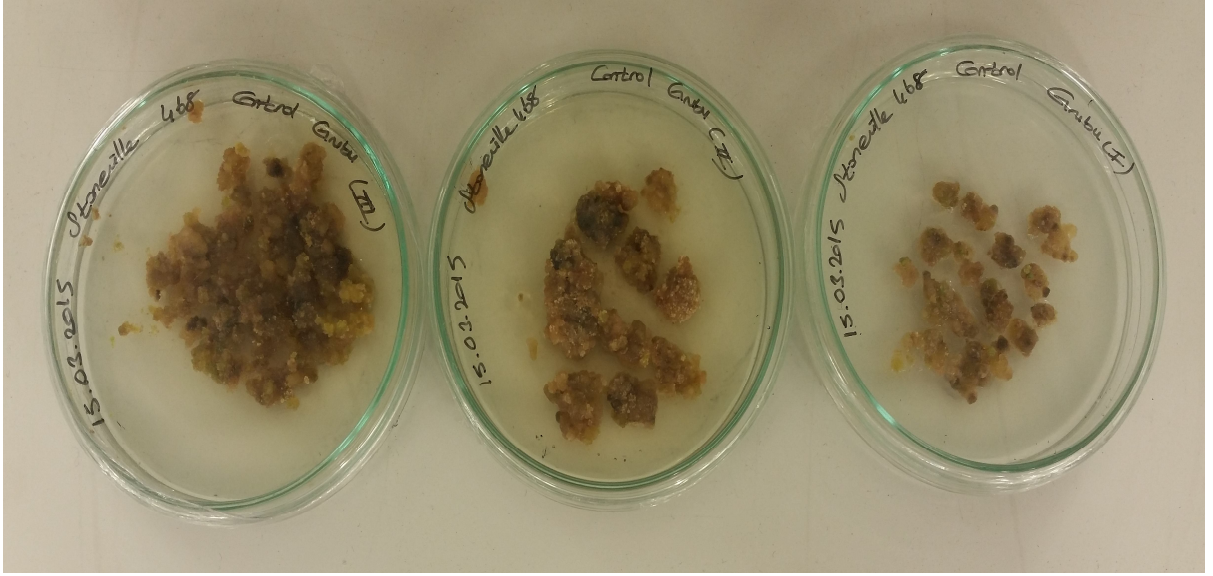
Çizelge 4.11.'in devamı (BS; Besi ortamı, HK; Hormon konsantrasyonu, ŞU; Şok uygulaması, KS; Kallus sayısı)

Genotip	BS	HK	ŞU	TB	KS	Renk
Stoneville 453	NRM	1 mg/l NAA + 1 mg/l BA	4 °C	2 mm	0.00	200.00
				3 mm	0.66	200.00
				4 mm	0.00	200.00
				5 mm	0.00	200.00
			40 °C	2 mm	0.00	200.00
				3 mm	0.33	200.00
				4 mm	0.00	200.00
				5 mm	0.00	200.00
			4 °C + 40 °C	2 mm	0.00	200.00
				3 mm	0.33	200.00
				4 mm	0.00	200.00
				5 mm	0.00	200.00
		2 mg/l NAA + 1 mg/l BA	4 °C	2 mm	0.00	200.00
				3 mm	166.66	200.00
				4 mm	0.00	200.00
				5 mm	0.00	200.00
			40 °C	2 mm	0.00	200.00
				3 mm	0.00	200.00
				4 mm	0.00	200.00
				5 mm	0.00	200.00
			4 °C + 40 °C	2 mm	0.00	200.00
				3 mm	0.00	200.00
				4 mm	0.00	200.00
				5 mm	0.00	200.00
		1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l Kinetin + 1 mg/l NAA	4 °C	2 mm	0.00	200.00
				3 mm	0.00	200.00
				4 mm	0.00	200.00
				5 mm	0.00	200.00
			40 °C	2 mm	0.00	200.00
				3 mm	0.00	200.00
				4 mm	0.00	200.00
				5 mm	0.00	200.00
			4 °C + 40 °C	2 mm	0.00	200.00
				3 mm	0.66	200.00
				4 mm	0.00	200.00
				5 mm	100.00	200.00
		1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l Kinetin + 2 mg/l NAA	4 °C	2 mm	0.00	200.00
				3 mm	0.00	200.00
				4 mm	0.00	200.00
				5 mm	0.00	200.00
			40 °C	2 mm	0.00	200.00
				3 mm	0.00	200.00
				4 mm	0.00	200.00
				5 mm	0.00	200.00
			4 °C + 40 °C	2 mm	0.00	200.00
				3 mm	0.00	200.00
				4 mm	0.00	200.00
				5 mm	0.66	200.00

3.4. Kallusların Alt Kültür İnteraksiyonları

3.4.1. Alt kültürde genotip interaksiyonu

Stoneville 453 ve Aşkabat 100 genotipleri ilk kallus oluşumundan alt kültüre aktarıldıktan sonra da renklerini korumuşlardır. Ancak kallusları alt kültüre alım süreleri geciktiği zaman kallusların kahverengimsi bir renk aldığı ve ilerleyen zamanlarda koyu kahve renge dönüştüğü gözlenmiştir. Kahverengiye dönen kalluslar alt kültüre alındıktan sonra belli aralıklarla eski renklerine döndükleri de gözlenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 Alt kültüre alım süreleri geciken kalluslarda oluşan kahverengimsi yapılar

Çizelge 4.12 incelendiğinde kallus sayısı Aşkabat 100 genotipinde Stoneville 453 genotipine göre yüksek olduğu bulunmuştur. Hatipoğlu ve ark.(1994), yaptıkları anter kültürü çalışmasında rejenerasyon oranının genotiplere bağlı olarak büyük ölçüde değiştiğini saptamışlardır. Böylece alt kültür ortamına aldıktan sonra genotiplere göre oluşan kallus farklılıkları da daha önce yapılan bu çalışmayı destekler niteliktedir.

Çizelge 4.12 Genotiplerin oluşturdukları alt kültür aşamasında renk ve kallus sayısı farkı

Genotip	Renk	Kallus Sayısı(Adet)
Aşkabat 100	2.00 a	6.83 a
Stoneville 453	1.00 b	3.72 b

3.4.2. Alt kültürde besi ortamı interaksyonu

Çizelge 4.13 ve 4.14 besi ortamı farklılığı alt kültürlerde renk üzerine herhangi bir etki yapmamıştır. Genotipler oluşturdukları kallus renklerini muhafaza etmişlerdir. MS ortamı her iki çeşitte de kallus sayısında önemli derecede bir artış olduğu gözlenmiştir. NRM besi ortamı MS besi ortamına göre daha tuzlu; bileşim ve konsantrasyon olarak da farklı olduğu için pamukta anter kültüründe kallus oluşumu üzerine pek etkisinin olmadığı gözlenmiştir.

Çizelge 4.13 Aşkabat 100 genotipindeki alt kültür besi ortamı interaksyonları

Besi Ortamı	Renk	Kallus Sayısı (Adet)
MS	1.50	10.02 a
NRM	1.50	0.53 b

Çizelge 4.14 Stoneville 453 genotipindeki alt kültür besi ortamı interaksyonları

Besi Ortamı	Renk	Kallus Sayısı (Adet)
MS	1.50	5.29 a
NRM	1.50	0.01 b

3.4.3. Alt kültürde hormon konsantrasyonları interaksyonu

Çizelge 4.15 ve 4.16 incelendiğinde her iki genotip içinde MS ortamına eklenen farklı hormon konsantrasyonları kallus renginde bir değişikliğe sebep olmamıştır. Ancak 1mg/l NAA + 0,5mg/l BA + 0,5 mg/l TDZ hormon konsantrasyonları uygulaması 1mg/l NAA + 0,1mg/l Kinetin + 1mg/l 2,4-D, 1mg/l NAA + 0,2mg/l Kinetin + 1mg/l 2,4-D, 0,5mg/l NAA + 0,5 mg/l BA + 0,5mg/l TDZ uygulamalarına göre daha fazla kallus oluşturmuştur. Memon ve ark. (2010) tarafından benzer hormon konsantrasyonları ile yapılan çalışmalarda 2,4-D ve kinetin hormonlarının farklı formda konsantrasyonlarını kullanmalarına rağmen kallus elde edememişleridir. Elde ettiğimiz bulgu Memon ve ark. (2010) sonuçlarıyla paralellik göstermektedir.

Aşkabat 100 genotipinde kallus sayısı 2.50 ile 6.83 arasında değişirken en fazla kallus sayısı 1mg/l NAA + 0,5mg/l BA + 0,5 mg/l TDZ hormon konsantrasyonlarının uygulanması sonucunda elde edilmiştir. Stoneville 453 genotipinde ise; kallus sayısı 1.74 – 4.58 arasında değişirken en fazla kallus sayısını Aşkabat 100 genotipinde olduğu gibi 1mg/l NAA + 0,5mg/l BA + 0,5 mg/l TDZ hormon konsantrasyonundan elde edilmiştir.

Çizelge 4.15 Aşkabat 100 genotipindeki alt kültür hormon konsantrasyonlarının interaksiyonları

Hormon Konsantrasyonları	Renk	Kallus Sayısı (Adet)
1 mg/l NAA + 0,1 mg/l Kinetin + 1 mg/l 2,4-D	1.50	2.50 b
1 mg/l NAA + 0,2 mg/l Kinetin + 1 mg/l 2,4-D	1.50	5.08 a
1 mg/l NAA + 0,5 mg/l BA + 0,5 mg/l TDZ	1.50	6.83 a
0,5 mg/l NAA + 0,5 mg/l BA + 0,5 mg/l TDZ	1.50	6.69 a

Çizelge 4.16 Stoneville 453 genotipindeki alt kültür hormon konsantrasyonlarının interaksiyonları

Hormon Konsantrasyonları	Renk	Kallus Sayısı (Adet)
1 mg/l NAA + 0,1 mg/l Kinetin + 1 mg/l 2,4-D	1.50	1.74 b
1 mg/l NAA + 0,2 mg/l Kinetin + 1 mg/l 2,4-D	1.50	3.25 a
1 mg/l NAA + 0,5 mg/l BA + 0,5 mg/l TDZ	1.50	4.58 a
0,5 mg/l NAA + 0,5 mg/l BA + 0,5 mg/l TDZ	1.50	4.23 a

3.4.4. Alt kültürde tarak boylarının interaksiyonu

Çizelge 4.17 ve 4.18’de görüldüğü üzere farklı mm boylardan alınarak uygulanan tarakların kallus rengine bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Aşkabat 100 ve Stoneville 453 genotiplerinde en fazla kallus sayısı önemli derecede 3 mm’lik tarak boylarından elde edilmiştir. Bu yüzden tarak büyüklüğünün 2 mm, 3 mm, 4 mm’den alınması gerekmektedir. En iyi sonuç için ise 3 mm’lik boyundaki tarakların kullanılması gerektiği söylenebilir.

Çizelge 4.17 Aşkabat 100 genotipindeki alt kültür tarak boyu interaksiyonları

Tarak Boyu	Renk	Kallus Sayısı (Adet)
2 mm	1.50	3.33 b
3 mm	1.50	12.73 a
4 mm	1.50	4.19 b
5 mm	1.50	0.85 c

Çizelge 4.18 Stoneville 453 genotipindeki alt kültür tarak boyu interaksyonları

Tarak Boyu	Renk	Kallus Sayısı (Adet)
2 mm	1.50	2.47 b
3 mm	1.50	6.83 a
4 mm	1.50	3.12 b
5 mm	1.50	0.01 c

3.4.5. Alt kültürde interaksyonların kallus sayısına etkisi

Çizelge 4.19’da alt kültür için yapılan analiz sonucunda tekerrürler arasındaki fark önemsiz çıkarken, genotip, besi ortamı hormon konsantrasyonu, tarak boyu ve interaksyonlar arasındaki fark istatistiki olarak çok önemli ($P < 0.01$) bulunmuştur.

Çizelge 4.20’de Aşkabat 100 genotipinde MS besi ortamında 1mg/l NAA + 0.1mg/l Kinetin + 1mg/l 2,4-D, 1mg/l NAA + 0.2mg/l Kinetin + 1mg/l 2,4-D, 1 mg/l NAA + 0.5 mg/l BA + 0.5 mg/l TDZ ve 0.5 mg/l NAA + 0.5 mg/l BA + 0.5 mg/l TDZ hormon konsantrasyonlarında 3 mm tarak boyunda en yüksek kallus sayısının elde edildiği sonucuna varılmıştır. Aşkabat 100 genotipinde NRM besi ortamında 1mg/l NAA + 0.1mg/l Kinetin + 1mg/l 2,4-D hormon konsantrasyonu 2 mm, 1mg/l NAA + 0.2mg/l Kinetin + 1mg/l 2,4-D hormon konsantrasyonunun ise 3 mm tarak boyunda en fazla kallus oluşturduğu sonucuna varılmıştır. 1 mg/l NAA + 0.5 mg/l BA + 0.5 mg/l TDZ ve 0.5 mg/l NAA + 0.5 mg/l BA + 0.5 mg/l TDZ hormon konsantrasyonlarının ise Aşkabat 100 genotipi, MS besi ortamında kallus oluşumuna yanıt vermediği sonucuna varılmıştır. Stoneville 453 genotipinde MS besi ortamına bakacak olursak; 1mg/l NAA + 0.1mg/l Kinetin + 1mg/l 2,4-D hormon konsantrasyonunun 4 mm, 1mg/l NAA + 0.2mg/l Kinetin + 1mg/l 2,4-D ve 0.5 mg/l NAA + 0.5 mg/l BA + 0.5 mg/l TDZ hormon konsantrasyonunun 3 mm, 1 mg/l NAA + 0.5 mg/l BA + 0.5 mg/l TDZ hormon konsantrasyonunun 2 mm tarak boyunda en fazla kallus oluşturduğu görülmektedir. Stoneville 453 genotipinin NRM besi ortamına baktığımızda ise; 1mg/l NAA + 0.1mg/l Kinetin + 1mg/l 2,4-D hormon konsantrasyonu 2 mm tarak boyunda en fazla kallus sayısını oluştururken, 1mg/l NAA + 0.2mg/l Kinetin + 1mg/l 2,4-D, 1 mg/l NAA + 0.5 mg/l BA + 0.5 mg/l TDZ ve 0.5 mg/l NAA + 0.5 mg/l BA + 0.5 mg/l TDZ 3 mm tarak boyunda en fazla kallus sayısını oluşturmuştur.

Çizelge 4.19 Uygulanan interaksyonların alt kültürde kallus sayısına

Kaynak	Serbestlik Derecesi	Kareler toplamı	Karelerin Ortalaması	F Değeri
Tekerrür	2	10.51	5.25	0.16
Genotip	1	465.63	465.63	14.59**
BS	1	4322.50	4322.50	135.45**
HK	3	583.72	194.57	6.10**
TB	3	3842.93	1280.97	40.14**
Genotip*BS	1	471.88	471.88	14.79**
Genotip*HK	3	819.30	273.10	8.56**
Genotip*TB	3	876.93	292.31	9.16**
BS*HK	3	965.18	321.72	10.08**
BS*TB	3	3346.30	1115.43	34.95**
HK*TB	9	1423.46	158.16	4.96**
Genotip*BS*HK	3	920.89	306.96	9.62**
Genotip*BS*TB	3	974.26	324.75	10.18**
Genotip*HK*TB	9	1606.54	178.50	5.59**
BS*HK*TB	9	1435.42	159.49	5.00**
Genotip*BS*HK*TB	9	1726.04	191.78	6.01**
Hata	126	4020.82	31.91	
Genel	191	27812.36		

Çizelge 4.20 Uygulanan interaksyonların alt kültürde kallus sayısı ve renk üzerine etkisi etkisi (BS; Besi ortamı, HK; Hormon konsantrasyonu, TB; Tarak boyu, KS; Kallus sayısı, *; P < 0.05, **; P < 0.01)

Genotip	BS	HK	TB	KS	Renk
Aşkabat 100	MS	1mg/l NAA + 0.1mg/l Kinetin + 1mg/l 2,4-D	2 mm	30.00	100.00
			3 mm	90.00	100.00
			4 mm	36.66	100.00
			5 mm	0.66	100.00
		1mg/l NAA + 0.2mg/l Kinetin + 1mg/l 2,4-D	2 mm	36.66	100.00
			3 mm	190.00	100.00
			4 mm	113.33	100.00
			5 mm	13.33	100.00
		1 mg/l NAA + 0.5 mg/l BA + 0.5 mg/l TDZ	2 mm	43.33	100.00
			3 mm	743.33	100.00
			4 mm	126.66	100.00
		0.5 mg/l NAA + 0.5 mg/l BA + 0.5 mg/l TDZ	5 mm	30.00	100.00
			2 mm	103.33	100.00
			3 mm	376.66	100.00
			4 mm	136.66	100.00
		NRM	1mg/l NAA + 0.1mg/l Kinetin + 1mg/l 2,4-D	5 mm	26.66
	2 mm			43.33	100.00
	3 mm			20.00	100.00
	4 mm			0.33	100.00
	1mg/l NAA + 0.2mg/l Kinetin + 1mg/l 2,4-D		5 mm	0.00	100.00
			2 mm	0.33	100.00
			3 mm	13.33	100.00
			4 mm	0.00	100.00
	1 mg/l NAA + 0.5 mg/l BA + 0.5 mg/l TDZ		5 mm	0.00	100.00
			2 mm	0.00	100.00
			3 mm	0.00	100.00
	0.5 mg/l NAA + 0.5 mg/l BA + 0.5 mg/l TDZ		4 mm	0.00	100.00
		5 mm	0.00	100.00	
2 mm		0.00	100.00		
3 mm		0.00	100.00		
0.5 mg/l NAA + 0.5 mg/l BA + 0.5 mg/l TDZ	4 mm	0.00	100.00		
	5 mm	0.00	100.00		
	2 mm	0.00	100.00		
	3 mm	0.00	100.00		

Çizelge 4.20.'nin devamı

Genotip	BS	HK	TB	KS	Renk
Stoneville 453	MS	1mg/l NAA + 0.1mg/l Kinetin + 1mg/l 2,4-D	2 mm	0.00	200.00
			3 mm	40.00	200.00
			4 mm	56.66	200.00
			5 mm	26.66	200.00
		1mg/l NAA + 0.2mg/l Kinetin + 1mg/l 2,4-D	2 mm	153.33	200.00
			3 mm	193.33	200.00
			4 mm	66.66	200.00
			5 mm	20.00	200.00
		1 mg/l NAA + 0.5 mg/l BA + 0.5 mg/l TDZ	2 mm	63.33	200.00
			3 mm	60.00	200.00
			4 mm	0.66	200.00
			5 mm	0.66	200.00
		0.5 mg/l NAA + 0.5 mg/l BA + 0.5 mg/l TDZ	2 mm	20.00	200.00
			3 mm	260.00	200.00
			4 mm	123.33	200.00
			5 mm	0.66	200.00
	NRM	1mg/l NAA + 0.1mg/l Kinetin + 1mg/l 2,4-D	2 mm	36.66	200.00
			3 mm	10.00	200.00
			4 mm	0.00	200.00
			5 mm	0.00	200.00
		1mg/l NAA + 0.2mg/l Kinetin + 1mg/l 2,4-D	2 mm	0.00	200.00
			3 mm	10.00	200.00
			4 mm	0.00	200.00
			5 mm	0.00	200.00
		1 mg/l NAA + 0.5 mg/l BA + 0.5 mg/l TDZ	2 mm	0.00	200.00
			3 mm	13.33	200.00
			4 mm	0.00	200.00
			5 mm	0.00	200.00
0.5 mg/l NAA + 0.5 mg/l BA + 0.5 mg/l TDZ	2 mm	0.00	200.00		
	3 mm	16.66	200.00		
	4 mm	0.00	200.00		
	5 mm	0.00	200.00		

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Elde edilen verilere bakıldığında kallus oluşumlarının genotipe, besi ortamına, tarak boyuna, uygulanan şok özelliğine göre önemli derecede farklılık gösterdiği görülmüştür. Yapılan varyans analizinde % 99 güven sınırları içinde elde edilen bulgular, genotip*besi ortamı*hormon konsantrasyonu*şok uygulaması*tarak boyu interaksyonlarında kullanılan parametrik ifadelerin kallus oluşumunun etkisinde farklılık gösterdiği sonucuna varılmıştır.

Sonuçlar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında çekirdek bölünmesi gerçekleşmeden alınan Aşkabat 100 genotipinde 2 mm ve 3 mm tarak boylarından yapılan ekimde en iyi kallus gelişimin gözlemlendiği ve alt kültür aşamasında ise en iyi kallus oluşumunun devamını sağlayan 2 mm boyundaki tarak olduğu sonucuna varılmıştır.

Besi ortamında ise daha önce anter kültürü çalışmalarında kullanılan MS besi ortamı NRM besi ortamına göre çok fazla başarı gösterdiği görülmüştür. Çalışmamız haploid bitki üretimin temelini oluşturduğu için kullanılan genotipler aynı türe ait olduğu zaman besi ortamlarının, hormon konsantrasyonlarının, şok uygulamalarının ve en önemlisi olan tarak boylarının haploid bitki üretimi açısından etkili olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abak, K., 1983. Biberde (*Capsicum annuum* L.) Anter kültürü yoluyla haploid bitki elde etme üzerinde araştırma. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yıllığı. Cilt: 33, 155-163.
- Acar, H., 1997. Arpada doku kültürü ve bitki ıslahında yararlanma olanakları. Seminer, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Ankara.
- Afele, J. C., Kannenberg, L. W., 1990. Genetics studies of corn (*Zea mays* L.) anther culture response. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, Canada. 80:459-464.
- Altındal, N., 2005. Çavdarda (*Secale cereale* L.) Anter kültüründe ploidi, ön işlem ve besi ortamı içeriğinin etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta. 70s.
- Andrews, J., 1985. Peppers the domesticated capsicum. University of Texas Pres, Box 7819 Austin, Texas 78713.
- Anonim, 2013. Aydın Ticaret Borsası Pamuk Raporu. <http://aydinticaretborsasi.org.tr/files/document/pdf/pamuk-raporu.pdf>
- Anonim, 2015. T.C. Gümrük ve Ticaret Bakanlığı Kooperatifçilik Genel Müdürlüğü . <http://docplayer.biz.tr/3534837-T-c-gumruk-ve-ticaret-bakanligi-kooperatifcilik-genel-mudurlugu-2014-yili-pamuk-raporu.html>
- Anonim, 2016. ICAC Türkiye Ülke Raporu. <http://koop.gtb.gov.tr/data/56e95b3a1a79f5b210d9176f/2015%20Pamuk%20Raporu.pdf>
- Ata, A., 2011. Biberlerde (*Capsicum annuum* L.) anter kültüründe mevsim etkisi ve mikrospor gelişimi. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, 89s.
- Baba, B., 1992. *Hordeum vulgare* L. (Arpa) üzerine anter kültürünün uygulanabilirliği. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir. Danışman. Prof. Dr. Günnehir Oğuz. 39s.
- Bajaj, Y.P.S., 1990. *In vitro* production of haploids and their use in cellgenetics and plant breeding. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Haploids in Crop Improvement I. 372–380.
- Ball, S.T., Zhou, H.P., Konzak, C.F., 1993. Influence of 2,4-D, IAA, and duration of callus induction in anther cultures of spring wheat. *Plant Science*, 90: 195-200.
- Baluch, Z.A.M., 1979. *In vitro* anther culture of *gossypium* species. The Pakistan Cottons, Pakistan Central Cotton Committee, Karachi, January, 161- 162.
- Başer, İ., Korkut, K.Z., Turhan, H., Bilgin, O., 1999. Anter kültüründen yararlanarak kışlık ekmeklik buğday çeşit ve popülasyonlarında haploid bitkilerin elde edilme olanakları. Türkiye 3. Tarla Bitkileri Kongresi, Cilt (I), 29-34, Adana.

- Bürün, B., 1996. Buğdaygillerde *in vitro* kültürler. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 6(4): 18–95.
- Büyükalaca, S., Çömlekçioğlu, N., Abak, K., Ekbiç, N., Kılıç, N., 2004. Effect of silver nitrate and donor plant growing conditions on production of pepper (*Capsicum annuum* L.) haploid embryos via anther culture. *Europ. J. Hort. Sci.*, 69 (5):206-209.
- Çaglar, Ç., Aras, V., Bayram, A., 2004. Kurutmalık kırmızı biberlerde androgenesis yoluyla *in vitro* haploid embriyo uyartımı. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 17(1): 87-94.
- Çömlekçioğlu, N., Büyükalaca, S., Abak, K., 1999. Şanlıurfa ve Kahramanmaraş biber populasyonlarında anter kültürü yöntemiyle haploid bitki elde etme olanakları. Türkiye III. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, Ankara, 897-900.
- Çömlekçioğlu, N., Büyükalaca, S., Abak, K., 2001. Effect of silver nitrate on haploid embryo induction by anther culture in pepper (*Capsicum annuum* L.). XI.th. Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant, April 9-13, 2001, Antalya, Turkey, 133-136.
- Duran, R.E., 2007. Tuzlu koşullar için geliştirilebilecek buğday genotiplerinin anter kültürüne cevabı. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Isparta.
- Ellialtıoğlu, Ş., Sarı, N., Abak, K., 2000. Haploid bitki üretimi, Bitki Biyoteknolojisi – Doku Kültürü ve Uygulamaları, Cilt:I, (Ed: Babaoğlu, M., Özcan, S., Gürel, E.), Selçuk Üniversitesi Basımevi, s:137-189.
- Ellialtıoğlu, Ş., Sarı, N., Abak, K., 2002. Haploid bitki üretimi. (M. Babaoğlu, E. Gürel ve S. Özcan editörleri). Bitki Biyoteknolojisi I- Doku Kültürü ve Uygulamaları. S. Ü. Vakfı Yayınları, Konya, s:137-189.
- Ercan, N., Boyacı, F., Ayar, F., 2001. Biberde (*Capsicum annuum* L.) anter kültürü yoluyla haploid bitki eldesi üzerine farklı besin ortamlarının etkisi. GAP II. Tarım Kongresi, 24-26 Ekim, Şanlıurfa, Cilt 1,121-128.
- George, L., Narayanaswamy, S., 1973. Haploid *capsicum* through experimental androgenesis. *Protoplasma*, 78: 467–470.
- Guha, S., Mahasvari, S.C., 1964. *In vitro* production of embryos from anther of datura. *Nature*, 204 : 497.
- Hassawi, D.S., Liong, G.H., 1990. Effects of growth regulator and genotype of production of wheat and triticale polyploids from anther culture. *Plant Breed.*, 4:40-45
- Hassawi, D.S., 2004: Evaluation of Jordanian wheat and barley genotypes for anther culture response. *Food, Agriculture and Environment*, 2 (1), 193-197.
- Hatipoğlu, R., Genç, İ., Yağbasanla, T., 1994. Ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.) ıslahında anter kültüründen yararlanma olanakları üzerine araştırmalar. Tarla Bitkileri Kongresi. 25-29 Nisan, Bitki Islahı s.108-111 İzmir.

- Heiser, C.B.J.R., 1976. Peppers, in evolution of crop plants. (Edited by N. W.Simmonds, 1986). *Longman Sci.and Tech. Report*, 265-268.
- Imamura, J., Harada, H., 1980. Stimulatory effects of reduced atmospheric pressure on pollen embryogenesis. *Naturwissensehaften*, 67: 357-358.
- Kaçar, Y.A., Şimşek, Ö., Dönmez, D., Boncuk, M., Yeşiloğlu, T., Akgöl, M., 2014. W. Murcott mandarin çeşidinde anter kültürü çalışmaları. *Derim*, 31 (2):37-50
- Korkut, K.Z., Başer, İ., Turhan, H., Bilgin, O., 2003. Androgenetic plant production in local foreign bread wheat genotypes. *Turkish Journal Of Field Crops*, 8:1, 9-14.
- Kristiansen, K., Andersen, B., 1993. Effect of donor plant temperature, photoperiod and age on anther culture response of *Capsicum annuum* L. *Euphitica*, 67: 105-109.
- Kwon, T.H., Abe, T., Sasahara, T., 1993. Efficient callus incuption and plant regeneration in sesamum species. *Plant Tissue Culture Letters*, 10(3), 260- 266.
- Last, D.I., Brettel, R., 1990. Embryo yield in wheat anther culture as influenced by the choice of sugar in culture medium. *Plant Cell Rep.*, 9: 14-16.
- Memon, S., Mari, S. N., Mari, A. K., Gaddi, N. H., 2010. Induction of callus through anther and ovule culture in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *World Applied Sciences Journal*, 8: 76-79
- Novak, F.J., 1974. Induction of a haploid callus in anther cultures of *Capsicum* sp., *Z. Pflanzenzenphysiol*, 68: 97-114.
- Özgen C., 1984, Türk ekonomisi açısından hazır giyim sanayinin önemi, gelişimi, sorunlar ve beklentiler. Türkiye'de Pamuk Politikasının Tesbiti Sempozyumu - İzmir.
- Pescitelli, S.M., Johnson, C.D., Petolino, J.F., (1990). Isolated microspore culture of maize: effect of isolation technique, reduced temperature, and sucrose level. *Plant Cell Reports*, 8:628 631.
- Ranaweera, K.K.D.S., Pathirana, R., 1992. Optimization of media and conditions for callus induction from anthers of sesame cultivar MI3. *Journal of the National Science Council of Sri Lanka*, 20(2), 309-316.
- Rashid, A., Reinert, J., 1980. Selection of embryogenic pollen from cold-treated buds of *nicotiana tabacum* var. Badischer Burley and Their Development Into Embryos in Cultures. *Protoplasma*, 105: 161-167.
- Reynolds, T.L., 1997. Pollen embryo genesis. *Plant Molecular Biology*, 33:1-10. Saccardo, F., Devreux, M., 1974. *In vitro* production of plantlets from anther culture of *Capsicum annuum* L. Proc. of Eucarpia: Genet. Breeding of Capsicum. Budapest, pp. 45-49.
- Sarıer, S.Y., 2010. Mısır bitkisinde anter kültürü olanakları üzerine araştırmalar. Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 56s.

- Sunderland, N., Roberts, M., 1979. Cold-pretreatment of excised flower buds in float culture of tobacco anthers. *Annual Botany* 43:405-414.
- Taşkın, H., Büyükalaca, S., Keleş, D., Ekbiç, E., 2011. Induction of microspore-derived embryos by anther culture in selected pepper genotypes. *African Journal of Biotechnology*, 10(75): 17116-17121.
- Terzioğlu, Ş., Ellialtıoğlu, Ş., Abak, K., 2000. İnkübasyon koşullarının biber anter kültüründe embriyo oluşumu üzerine etkisi. III. Sebze Tarımı Sempozyumu, Isparta, 233-238.
- Tiainen, T., 1992. The influence of culture conditions on anther culture respons of commercial varieties of *Solanum tuberosum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 30:211-219.
- Tulecke, W., 1953. A tissue derived from the pollen of *ginkgo biloba*. *Science*, 117, 599-600.
- Turaev, A.M., 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).
- Tuncer B., Yanmaz R., 2007. Haploid bitki elde etme yollarından biri: mikrospor kültürü. *Alata Tarım Dergisi*, 6 (2): 1-8.
- Türkoğlu Ş., 2004. Pamukta (*Gossypium hirsutum* L.) *in vitro* rejenerasyon olanakları üzerinde araştırmalar. 129s.
- Vasil, I.K., Therge, T.A., 1994. Plant cell and tissue culture. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston, London, 548p
- Wang, Y.Y., Sun, C.S., Wang, C.C., Chien, N.J., 1973. The induction of polen plantlets of triticales and *capsicum annuum* from anther culture. *Sci. Sin.*, 16: 147-151.
- Zhang, B., Feng, R., Li, X., Li, F., 1996. Anther culture and plant regeneration cotton (*Gossypium klotzschianum anderss*). *Chinese Science Bulletin*, 41(2):145-148.
- Zhang, B., Feng, R., Li, X., Li, F., 1998 . Plant regeneration from anther culture cultivated and wild species of *gossypium* genus. World Cotton Research Conference-2, 6-12 Sep. Athens-Greece, p.103.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı, soyadı : Seçil Taşdemir
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 05.07.1989 Besni/Adıyaman
Medeni hali : Bekâr
Telefon :
Faks :
e-posta :seciltasdemir@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	KSÜ/Tarımsal Biyoteknoloji	2016
Lisans	OMÜ/Tarımsal Biyoteknoloji	2013
Lise	Çakırhöyük Çok Programlı Lisesi	2006

Yayınlar

Yurtiçi Bildiri

1. Dağgeçen E., Taşdemir S., Bölek Y., Tarımsal Üretimde Biyoteknoloji Uygulamaları, İç Anadolu Bölgesi 2.Tarım ve Gıda Kongresi, Nevşehir, Poster, 29.04.2015
2. Taşdemir S., Dağgeçen E., Sevgin N., Bölek Y., Pamuk Anter Kültürü Tekniğinde Sıcaklık ve Elektrik Şoku Uygulamasının Sürgün Oluşumuna Etkisi, İç Anadolu Bölgesi 2.Tarım ve Gıda Kongresi, Nevşehir, Poster, 28.04.2015
3. Korkunç M., Taşdemir S., Bölek Y., Farklı Şok Uygulamalarının Pamuk Anterlerinde Kallus Oluşumuna Etkisi, İç Anadolu Bölgesi 2.Tarım ve Gıda Kongresi, Nevşehir, Poster, 28.04.2015
4. Korkunç M., Taşdemir S., Şişman Ö.A., Parlak D., Bölek Y., Tohumun Çimlenme Biyolojisi, 5.ci Uluslararası Katılımlı Tohumculuk Kongresi, Diyarbakır, Poster, 21.10.2014

Yurtdışı Bildiri

1. Korkunc M., Tasdemir S., Sevgin N., Bolek Y., The Effect Of Different Hormone Consantration On İnduction Of Callus İn Cotton Anther, Beltwide Cotton Conferences, San Antonio, ABD, Sözlü Sunum, 07.01.2015

Yabancı Dil

İngilizce

Hobiler

Puzzle, kitap okuma, doğa bilimleri, tiyatro

