

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI PAMUK ÇEŞİTLERİNDE *IN VITRO* SÜRGÜN REJENERASYONU

Gözde YALÇIN

Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN

AĞUSTOS

2013

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağlı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Gözde YALÇIN

İmzası

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Sebahattin Özcan danışmanlığında, Gözde Yalçın tarafından hazırlanan bu çalışma 27/08/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN İmza:

Üye : Prof. Dr. Mustafa YILDIZ İmza:

Üye : Prof. Dr. Semra MİRİCİ İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Farklı Pamuk Çeşitlerinde *In Vitro* Sürgün Rejenerasyonu

Gözde YALÇIN

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN

Pamuk çok çeşitli kullanım alanlarından dolayı dünya tarımı ve ticaretinde oldukça önemli bir endüstri bitkisidir. Bu çalışmada Türkiye’de yaygın olarak kullanılan GSN-12 ve STN-468 çeşitlerinde *in vitro* koşullarda sürgün rejenerasyonu amaçlanmıştır. *In vitro* koşullarda çimlenmiş 7-10 günlük bitkiciklerden izole edilen kotiledon boğum eksplantları, farklı konsantrasyonlarda TDZ, TDZ-IBA ve Kinetin içeren, %0,3 fitajel ile katılaştırılmış MS ortamlarda kültüre alınmıştır. Çalışma kapsamında kotiledon boğum eksplantları yüksek konsantrasyonlarda (2,5, 5, 10 ve 20 mg/l) kinetin ön muamelesi sonrasında farklı MS (MSO, ½MS ve ¼MS) ortamlarına aktarılmıştır. Bütün denemeler farklı LED (beyaz, kırmızı ve mavi) ışık kombinasyonları kullanılarak oluşturulmuştur. GSN-12 çeşidi için en yüksek eksplant başına sürgün sayısı (7,75 adet) 5 mg/l Kinetin ön muamelesi sonrası ¼MS besin ortamına aktarılan eksplantlarda gözlenmiştir. STN-468 çeşidinde ise en yüksek eksplant başına sürgün sayısı (6,00 adet) 10 mg/l kinetin ön muamelesi sonrası 0,05 mg/l Kinetin içeren MS ortamına aktarılan eksplantlarda elde edilmiştir. Işık denemelerinde ise GSN-12 çeşidi için 4 kırmızı:1 mavi; STN-468 çeşidi için 3 kırmızı:1 mavi ışık kombinasyonu uygun bulunmuştur. Rejenere olan sürgünler NAA ve aktif karbon içeren MS ortamlarında köklendirilmiştir. Köklendirilmiş bitkilerin iklim odasında ve oda sıcaklığında adaptasyonu başarıyla sağlanarak çiçeklenme ve meyve oluşumu sağlanmıştır.

2013, 63 sayfa

Anahtar kelimeler: *Gossypium hirsutum* L., kotiledon boğum, sürgün rejenerasyonu

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

In Vitro Shoot Regeneration in Different Cotton Cultivars

Gözde YALÇIN

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Sebahattin ÖZCAN

Cotton is an important industrial crop world's agriculture and trade because of its usage in various area. This study was designed to obtain *in vitro* shoot regeneration from commercial GSN-12 and STN-468 cotton cultivars in Turkey. The cotyledon nodes explants were isolated from 7-10 days old *in vitro* grown plantlets followed by cultured on MS medium supplemented with different concentrations TDZ, TDZ-IBA and Kinetin solidified with 0.30 % phytagel. Cotyledonary node explants were also pretreated with high concentrations (2,5, 5, 10 and 20 mg/l) of kinetin followed by transfer to different MS (MSO, ½MS and ¼MS) media. All experiments were run under different LED (White, Red and Blue) light combinations. Maximum numbers of 7,75 shoots per explants from GSN-12 were observed at 5 mg/l Kinetin pre-treatment followed by cultured on ¼MS media. Whereas, maximum number of 6,00 shoots per explants from STN-468 were obtained at 10 mg/l Kinetin pre-treatment followed by cultured on the MS media supplemented with 0.05 mg/l Kinetin. Combination of 4:1 (red:blue) LED lights was found suitable for GSN-12 and 3:1 (red:blue) LED combination for STN-468. Regenerated shoots were rooted on MS medium supplemented with NAA and active charcoal. Rooted plants were successfully acclimatised in growth room at room temperature where they gave flowering and fruit.

2013, 63 pages

Keywords: *Gossypium hirsutum* L., cotyledon node, shoot regeneration

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasında bana her türlü desteği sağlayan danışman hocam Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN'a, yol gösteren ve bilgisini hiç esirgemeyen Doç. Dr. Muhammad AASIM'a, laboratuvar uygulamaları süresince tecrübe ve görüşlerinden yararlandığım Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR'a, en zor zamanlarımda beni anlayıp sorunlarımı çözmek adına gösterdiği çaba için Prof. Dr. Aykut ÖZKUL'a,

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi TARBIYOTEK ve Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Kamil Özdağ Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Laboratuvarı çalışma grubuna,

En büyük manevi destekçilerim dostlarıma,

Materyal araştırmalarında yardımlarını unutamayacağım Gülşen YALÇIN' a,

Bugün aramızda olan ve olmayan; bir küçük sözle dahi olsa her zaman yanımda olup, beni destekleyen bütün aileme; maceralarımın en büyük destekçileri annem Ayşe YALÇIN ve babam Sefa YALÇIN'a, neşe kaynağım, kardeşim Gökçe YALÇIN'a

sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ONAY SAYFASI.....	ii
TEŞEKKÜR	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	6
2.1. Somatik Embriyogenesis Çalışmaları	6
2.2. Çoklu Sürgün Eldesinin Teşviki Üzerine Çalışmalar	10
3. GEREKÇE VE AMAÇ	16
4. MATERYAL VE YÖNTEM	17
4.1. Materyal	17
4.1.1. Deneme yeri.....	17
4.1.2. Bitki materyali	17
4.1.3. Büyüme ortamları ve büyütme koşulları	18
4.1.4. Bitki büyüme düzenleyicilerin hazırlanması ve muhafazası	20
4.2. Yöntem.....	21
4.2.1. Tohumlardan hav tabakasının uzaklaştırılması	21
4.2.2. Yüzey sterilizasyonu.....	21
4.2.3. Eksplant izolasyonu	21
4.2.4. Rejenere Olan Sürgünlerin Köklendirilmesi	22
4.2.5. İstatiksel Değerlendirme.....	22
5. ARAŞTIRMA BULGULARI	23
5.1. GSN-12 Çeşidinde <i>In Vitro</i> Sürgün Rejenerasyonu	23
5.1.1. TDZ ve farklı LED ışık uygulamasının etkisi	23
5.1.2. Farklı TDZ-IBA ve kırmızı:mavi (4:1) LED ışık uygulamasının etkisi.....	25
5.1.3. GSN-12 çeşidinde farklı TDZ-IBA ve beyaz LED ışık uygulamasının etkisi	28
5.1.4. Kinetin ön muamelesinin etkisi	29
5.1.5. Yüksek oranda kinetin ön muamelelerinin etkisi	31
5.1.6. Yüksek oranda kinetin ön muamelesi ve LED ışığın etkisi.....	33

5.2.	STN-468 Çeşidinde <i>In Vitro</i> Sürgün Rejenerasyonu.....	37
5.2.1.	TDZ ve farklı LED ışık uygulamasının etkisi	37
5.2.2.	STN-468 çeşidinde farklı TDZ-IBA ve beyaz LED ışık uygulamasının etkisi 40	
5.2.3.	STN-468 çeşidinde yüksek oranda kinetin ön muamelelerinin etkisi	42
5.2.4.	STN-468 çeşidinde yüksek oranda kinetin ön muamelesi ve LED ışığın etkisi 43	
5.3.	<i>In vitro</i> Köklendirme	48
5.3.1.	Farklı IBA oranlarının kök oluşumuna etkisi	48
5.3.2.	Farklı NAA Konsentrasiyonlarının Kök Oluşumuna Etkisi.....	48
5.3.3.	NAA VE Aktif Karbon Kullanımının Kök Oluşumuna Etkisi.....	49
5.4.	<i>In vitro</i> Koşullarda Elde Edilen Sürgünlerin Dış Şartlara Adaptasyonu	49
6.	TARTIŞMA VE SONUÇ	52
6.1.	Tartışma	52
6.1.1.	<i>In vitro</i> sterilizasyon	52
6.1.2.	TDZ etkisi.....	52
6.1.3.	Kinetin	53
6.1.4.	Kinetin Ön muamelesi	53
6.1.5.	Ön muamele sonrası ortam	54
6.1.6.	LED ışık kaynağı	54
6.1.7.	Köklendirme	55
6.2.	Sonuç	56
	KAYNAKLAR.....	58
	EKLER	62
	EK1:Kullanılan kimyasallara ait özellik tablosu	62
	ÖZGEÇMİŞ.....	63

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. <i>Gossypium hirsutum</i> L.bitkisi.....	2
Şekil 4.1. Farklı LED ışık uygulamaları.....	18
Şekil 5.1. Farklı TDZ konsantrasyonlarında GSN-12 çeşidine ait kotiledon boğum eksplantlarında kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyon.....	23
Şekil 5.2. Farklı TDZ-IBA kombinasyonlarında GSN-12 çeşidine ait kotiledon boğum eksplantlarında sürgün rejenerasyonu.....	26
Şekil 5.3. GSN-12 çeşinde kinetin ile ön muamele uygulanmış kotiledon boğum eksplantında sürgün rejenerasyonu.....	30
Şekil 5.4. GSN-12 çeşidine ait kotiledon boğum eksplantlarda farklı dozlarda kinetin ön muamelesi, farklı ortam dozları ve farklı ışık kombinasyonlarında 8 hafta sonra sürgün rejenerasyonu.....	34
Şekil 5.5. Farklı TDZ konsantrasyonları ve LED ışık kombinasyonlarının STN-468 çeşidinin kotiledon boğum eksplantında sürgün rejenerasyonu.	38
Şekil 5.6.. STN-468 çeşidine ait kotiledon boğum eksplantlarda farklı dozlarda kinetin ön muamelesi, farklı ortam dozları ve farklı ışık kombinasyonlarında 8 hafta sonra elde edilen sürgünler	45
Şekil 5.7. Farklı NAA ortamlarında kök oluşumu sağlanmış bitkiler.....	49
Şekil 5.8.Köklendirmesi sağlanan bitkilerde adaptasyon çalışmaları.....	50
Şekil 5.9. Adaptasyon aşamasında saksılara aktarılmış bitkiler.....	50
Şekil 5.10. Saksılara aktarılan bitkilerde tarak oluşumu.....	51

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Türkiye'nin dünya pamuk üretimi içerisindeki yeri.....	3
Çizelge 1.2. Genetiği Değiştirilmiş Bitkilerin Toplam Global Alan İçerisindeki Payı.....	4
Çizelge 4.1. Murashige ve Skoog ortamında bulunan maddeler ve konsantrasyonları.....	19
Çizelge 4.2. Kullanılan büyüme düzenleyici, stok konsantrasyonu ve saklama koşulları.....	20
Çizelge 4.3. Araştırmada kullanılan besin ortamları.....	22
Çizelge 5.1. GSN-12 çeşidinde farklı dozlarda TDZ konsantrasyonları ve LED ışık kombinasyonlarının sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi.....	24
Çizelge 5.2. GSN-12 çeşidine ait eksplantlarda farklı dozlarda TDZ konsantrasyonları ve LED ışık kombinasyonlarının sürgün rejenerasyonuna etkisi.....	24
Çizelge 5.3. GSN-12 çeşidinde farklı TDZ-IBA kombinasyonları ile 4:1 (kırmızı:mavi) LED ışığın sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi.....	26
Çizelge 5.4. GSN-12 çeşidinde farklı TDZ ve IBA kombinasyonları ile 4:1 (kırmızı:mavi) LED ışığın sürgün rejenerasyonuna etkisi.....	27
Çizelge 5.5. GSN-12 çeşidinde farklı TDZ-IBA konsantrasyonları ve beyaz LED ışığın sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi.....	28
Çizelge 5.6. GSN-12 çeşidine ait eksplantlarda farklı dozlarda TDZ konsantrasyonları ve beyaz LED ışığın sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi.....	29
Çizelge 5.7. GSN-12 çeşidinde farklı Kinetin konsantrasyonlarının sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi.....	30
Çizelge 5.8. GSN-12 çeşidinde farklı Kinetin konsantrasyonlarının sürgün rejenerasyonuna etkisi.....	31
Çizelge 5.9. GSN-12 çeşidinde farklı dozlarda Kinetin ön muamelesinin sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi.....	32
Çizelge 5.10. GSN-12 çeşidine ait eksplantlarda yüksek oranlarda Kinetin ön muamelesi ve MS ortamı dozlarının eksplant başına sürgün sayısı üzerine etkisi.....	32
Çizelge 5.11. GSN-12 çeşidine ait eksplantlarda farklı kinetin ön muamelesi ve farklı ışık kombinasyonlarının eksplant başına sürgün sayısına ait varyans analizi.....	35
Çizelge 5.12. GSN-12 çeşidine ait eksplantlarda farklı dozlarda Kinetin ön muamelesi, MS ortamı dozları ve ışık kombinasyonlarının eksplant başına sürgün sayısı üzerine etkisine ait varyans analizi.....	36
Çizelge 5.13. Farklı TDZ konsantrasyonları ve ışık kombinasyonlarında STN-468 çeşidinde sürgün rejenerasyonu ait varyans analizi.....	38
Çizelge 5.14. Farklı TDZ konsantrasyonları ve LED Işık kombinasyonlarının STN-468 çeşidinde sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi.....	39
Çizelge 5.15. STN-468 çeşidinde farklı TDZ-IBA konsantrasyonları ve beyaz LED ışığın sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi.....	40
Çizelge 5.16. STN-468 çeşidinde farklı TDZ-IBA konsantrasyonları ve beyaz LED ışığın sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi.....	41
Çizelge 5.17. STN-468 çeşidinde farklı Kinetin konsantrasyonlarının sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi.....	42
Çizelge 5.18. STN-468 çeşidine ait eksplantlarda yüksek oranlarda Kinetin ön muamelesi ve MS ortamı dozlarının eksplant başına sürgün sayısı üzerine etkisi.....	43
Çizelge 5.19. STN-468 çeşidinde Farklı ön muamele, MS ortamı ve ışık kombinasyonlarının sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi.....	46
Çizelge 5.20. STN-468 çeşidine ait eksplantlarda farklı dozlarda Kinetin ön muamelesi ve MS ortamı dozları ve ışık kombinasyonlarının eksplant başına sürgün sayısı üzerine etkisine ait varyans analizi.....	47

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

2,4-D	2,4-Diklorofenoksi Asetik Asit
2-iP	2- izopentenil adenin
AgNO ₃	Gümüş nitrat
B	Monokromatik mavi LED
B5MS	B5 vitamini içeren MS besin ortamı
BA	Benzilaminopürin
BAP	6-Benzilaminopürin
cv.	Kültüvar, çeşit
DP50	Delta pine 50 çeşidi
GA ₃	Giberellik Asit
ha	Hektar
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
H ₂ SO ₄	Sülfürik asit
HCl	Hidroklorik asit
HgCl ₂	Civa klorür
IAA	Indol-3-Asetik Asit
IBA	Indol Butirik Asit
kg, g, mg, µg	Kilogram, Gram, Miligram, Mikrogram
KO	Kare Ortalaması
LED	Light Emitting Diode (Işık Yayan Diyot)
l, ml, µl	Litre, Mililitre, Mikrolitre
LS	Linsmaier ve Skoog Temel Besin Ortamı
m, cm, mm	Metre, Santimetre, Milimetre
M, mM, µM	Molar, Milimolar, Mikromolar
MgCl ₂	Magnezyum klorür
MS	Murashige ve Skoog Temel Besin Ortamı
MSO	Temel Murashige ve Skoog Temel Besin Ortamı
NAA	α- Naftalin Asetik Asit
NaOCl	Sodyum Hipoklorit
NaOH	Sodyum Hidroksit
P ve N tipi yarı iletkenler	Akım taşıyıcı boşlukları pozitif (P) ve negatif (N) yüklü malzemeler
R	Monokromatik kırmızı LED
RAPD	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
SDS	Sodyum dodesil sülfat
STN	Stoneville
TDZ	Thidiazuron
T _H	Maksimum ışık yoğunluğunda kalış süresi
VK	Varyasyon Kaynakları
WPM	Woody Besin Ortamı
µmol	Mikromol

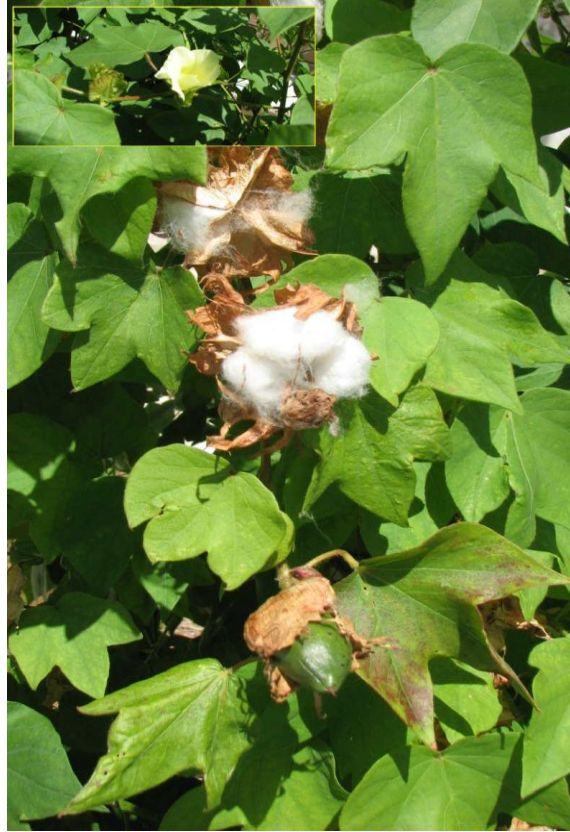
1. GİRİŞ

Pamuk farklı kullanım alanları nedeniyle sosyal ve ekonomik açılardan önemli bir üründür. Asıl olarak lif elde etmek amacıyla üretimi yapılan pamuk bitkisi tekstil sektörünün de ham maddesidir [1]. Lif dışında bitkisel yağ üretiminde de kullanılan pamuğun ayrıca çiğitinden un elde edilerek insanlar için bir protein kaynağı ve küspesinden de hayvan yemi olarak yararlanılmaktadır [1]. Bunun dışında, pamuk tohumunun özellikle kabuğu selüloz sanayinde, iç kısmı ise gosipol içeriği nedeniyle tıbbi ilaç olarak kullanılabilir. Ayrıca, pamuğun sapları selüloz sanayi ve sunta imalatında değerlendirilmektedir [2]. Pamuk tohumlarının en önemli kullanımı ise, insan ve hayvan beslenme (gıda) alanıdır [3]. Pamuk tohumu, dünyada protein kaynağı olarak soya fasulyesinden sonra ikinci sırada; yağ üretiminde ise, beşinci sırada yer almaktadır. Ancak, pamuk tohumunun gerek protein ve gerekse yağ kaynağı olarak insan ve hayvan beslenmesinde kullanımını tohumun içerdiği gosipol maddesi sınırlandırmaktadır. Diğer taraftan, gosipol ve ilgili bileşikler savunma mekanizmasının bir parçası olup bitkiyi böceklerle ve muhtemelen bazı hastalıklara karşı da korumaktadırlar. Bu bileşiğin aynı zamanda, antikanserojen, antifungal ve antitümör aktivitesinin yanında tıbbi etkileri ve kısırlaştırıcı etkileri de vardır [2, 4, 5].

Morfolojik özellikleri incelendiğinde: Tür ve varyetesine göre 60-120 cm, ağaç halinde olanlar ise 5-6 m boylanabilir. Pamuk 30-100 cm derine, 50-80 cm yanlarına uzanan kazık köke sahiptir. Toprak yüzeyinin 8-10 cm altında ilk yan kökler meydana gelir ve yatay olarak büyürler. Yan köklerin sayıları 3-4 tanedir, her biri tekrar dallanarak etrafa yayılır. Epidermis hücrelerinin dışa doğru uzaması ile sayısız emici tüyler meydana gelir. Genel olarak kök toprakta dik olarak ya da bir süre sonra zigzag çizerek devam eder [6]. Uygun koşullarda kök uzunluğu 1.5 m ye kadar ulaşabilir. Afrika'da, çok yıllık ağaç şeklinde olan pamuk çeşitleri de vardır. Pamuk gövdeleri dik, dallanmış ve çok tüylüdür. Yapraklar uzun saplı, parçalı ve tabanı kalp şeklindedir. Çiçekler saplı ve yaprakların koltuğunda tek tek bulunur. Dış çanak yaprakları üç parçalı, taç yaprakları ise beş serbest parçalıdır. Koza adı verilen meyve, olgunlukta açılan veya kapalı kalan, 3-5 gözlü bir kapsüldür. Her gözde siyahımsı renkli, oval şekilli ve üzeri uzun, sık ve beyaz renkli tüylerle örtülü 5-10 tohum bulunur. Pamuk tohumu, etrafındaki bu tüy veya liflerle beraber 'kütlü' adını alır [6].

Pamuk, alüvyonlu ve kuvvetli toprakları sever. Derin sürülmüş ve iyi gübrenmiş topraklara ekilir. Ekim; sıcak bölgelerde şubat, soğuk bölgelerde mart-nisan aylarında yapılır, ağustos ve eylülde ise hasat edilir [6].

Türkiye’de, tarımı yapılan pamukların hepsi, *Gossypium hirsutum* L. türüne ait çeşitlerdir. *Gossypium hirsutum* L., ebegümeçigiller (*Malvaceae*) familyasından anavatanı Hindistan olan kültürü yapılan bir bitki türüdür. Genellikle geniş bir dallanma gösteren, tüylü bir gövdeye sahip 1-2 m uzunluğundaki çalı formundaki bitkilerdir. Yüksek sap uzunluğu ile kalp şeklinde, zayıf 3-5 lobdan oluşan bir yaprak morfolojisine sahiptir [7]. Gövdesinde aynı zamanda 5-15 mm uzunluğunda uca doğru konikleşen yan yapraklar da bulunmaktadır (Şekil 1.1.).



Şekil 2.1. *Gossypium hirsutum* L bitkisi [8].

Türkiye’de yetiştirilen pamukların tamamı orta lifli pamuklar olup birçok çeşidi kullanılmaktadır. Yaygın olanları; Stoneville 453, Carolina Quin, Çukurova 1518, Sayar 314, Nazilli 84, Nazilli 87, Maraş/Erşan 92 ve Ege 7913 çeşitleridir [9]. Bu çeşitlerin yanı sıra yakın dönemde melezlemeler ve çeşitli ıslah yöntemleriyle yeni elde edilen çeşitler de mevcuttur. Çalışmamız kapsamındaki GSN-12 ve Stoneville 468’de bunlardan ikisidir.

Pamuk bitkisi (*Gossypium hirsutum*), yaygın ve zorunlu kullanım alanıyla insanlık açısından, yarattığı katma değer ve istihdam olanaklarıyla da üretici ülkeler açısından büyük ekonomik öneme sahiptir. Pamuğun önemini artıran bir diğer husus da, iklim koşulları bakımından dünya pamuk üretim alanının çok sınırlı olmasıdır. Bu sebeple; dünya üretiminin yaklaşık %80’i, Türkiye’nin de içinde olduğu sekiz ülke tarafından gerçekleştirilmektedir [10, 11]. Türkiye’nin toplam üretim içerisindeki payı ise yaklaşık %3,5 ile %4,5 arasında değişmektedir [12, 13].

Çizelge 2.1. Türkiye’nin dünya pamuk üretimi içerisindeki yeri (2013) [14, 15]

Ülkeler	Ekiliş (000 ha)	Verim (kg/ha)	Üretim (000 ton)	Tüketim (000 ton)	İthalat (000 ton)
Hindistan	12.000	490	5.879	5.117	218
Çin	5.100	1.452	7.403	7.838	2.163
ABD	3.400	897	3.048	762	1
Pakistan	3.000	689	2.068	2.613	675
Özbekistan	1.300	754	980	327	-
Brezilya	1.080	1.418	1.524	914	16
Avustralya	470	2.107	980	28	5
Türkiye	330	1.484	490	1.328	871
Yunanistan	270	940	207	35	2
Meksika	130	1.424	185	414	185
Mısır	130	754	98	152	136
Suriye	120	1.252	150	120	-
Dünya	34.044	615	25.652	24.044	8.600

Günümüzde, Türkiye; pamuk ekim alanı yönünden Dünya’da sekizinci (Çizelge 1.1); birim alandan elde edilen lif pamuk verimi yönünden ikinci; pamuk üretim miktarı yönünden sekizinci; pamuk tüketimi yönünden dördüncü; pamuk ithalat yönünden beşinci ülke konumundadır. Bu bakımdan dünya pamuk üretiminin; ihtiyacı karşılayabilir düzeyde kalması için verimin artırılması üzerine çeşitli çalışmalar yürütülmektedir. Kuraklığa, çeşitli hastalıklara ve zararlılara dayanıklı çeşitlerin eldesi için klasik ıslah yöntemlerinin yanı sıra *in vitro* çoğaltım teknikleri kullanılarak yürütülen gen aktarımı çalışmaları da oldukça önem kazanmaktadır. Dünya’da 34 milyon hektar pamuk ekim alanının %50’sinde (17 milyon hektar) genetik olarak değiştirilmiş (transgenik) pamuk ekilmektedir (Çizelge 1.2.). Dünyanın en büyük pamuk ihracatçısı ABD dünya genetik olarak değiştirilmiş pamuk ekiminde en büyük paya sahiptir [16].

Çizelge 1.2. Genetiği Değiştirilmiş Bitkilerin Toplam Dünya Ekim Alanları İçerisindeki Payları (2012) [17]

Ürünler	Toplam Ekim Alanı (000 ha)	Genetik Olarak Değiştirilmiş Ekim Alanı (000 ha)	Genetik Olarak Değiştirilmiş Alan Payı(%)
Soya	90.000	67.500	75,0
Pamuk	34.044	17.000	50,0
Kanola	31.000	62.000	20,0
Mısır	158.000	19.140	33,0
Toplam	313.044	165.640	52.91

Böceklere dayanıklı Bt pamuk 2012 yılında dünya’da ekimi yapılan genetik olarak değiştirilmiş bitkiler arasında üçüncü sıradadır, yabancı ot ilaçlarına toleranslı pamuk ise %1 ekim alanına sahiptir [17].

Pamuk bitkisinde doku kültürü yöntemleriyle çoklu sürgün eldesi oldukça zordur. Bu noktada birçok çeşit üzerinde rejenerasyon protokollerinin geliştirilmesi için çalışmalar yürütülmektedir. Farklı büyüme düzenleyicileri ve vitaminlerle büyümenin teşviki sağlanmaya çalışılırken kültür koşullarında yapılan değişik uygulamalarda oldukça başarılı sonuçlar vermektedir. LED (ışık yayan diyot) ışıkların kullanımı da bunlardan biridir.

LED; yapay ışık kaynaklarından en son bulunanıdır. P ve N tipi yarı iletken katmanlar (Led çipi), yansıtıcı yüzey ve iletken alanlar bir LED'in yapısını oluşturur [18]. LED'in hangi renkte ışık yayması isteniyorsa galyum, arsenit, alüminyum, fosfat, indiyum, nitrit gibi kimyasallardan belirli ölçülerde yarı iletken malzemeye ilave edilir [18]. Işıklandırmada verim maksimum ışık yoğunluğunda kalış süresiyle(T_H) ilişkilidir. LED ışıklarda kesikli ışık olmasına rağmen tübüler floresan lambalara göre maksimum ışık yoğunluğunda kalış süresi daha yüksektir [19]. Bu nedenle LED'in bitki büyüme ve gelişmesi için olumlu sonuçlar oluşturacağı düşünülerek *in vitro* çalışmalarda LED ışık kullanımı artmaktadır [20, 21].

2. KURAMSAL TEMELLER

Pamuk bitkisinde *in vitro* çoğaltım üzerine 1980'lerden bu yana çalışılmaktadır. *Gossypium hirsutum* L. özellikle mevcut hatların geliştirilmesi için gen manipülasyonları ve somoklonal varyasyonları görünür kılması nedeniyle oldukça rağbet gören bir bitki olmuştur.

2.1. Somatik Embriyogenesis Çalışmaları

Pamukta kallus oluşum basamakları ilk kez Shenk ve Hildebrand (1972) tarafından bildirilmiştir [22]. Beasley ve Ting (1973) ise ovul kültürlerinde kallus oluşumu saptamıştır. Ancak kallus oluşumunun ovul gelişimi için etkileyici bir faktör olarak bulunmaması üzerine bu alan takip edilmemiştir [23]. Davis ve ark. (1974) *G. hirsutum* L.' de kallus ve hücre süspansiyonlarını tanımlamışlardır [24]. Daha sonra Sandstedt (1975) ve Price ve ark. (1977) *Gossypium*' un 6 çeşidinde kallus üzerine çalışmalar yürütmüştür. Bütün bu çalışmalarda hipokotil eksplantları kullanılmıştır [25, 26].

G. hirsutum bitki rejenerasyonu ilk kez Davidonis ve Hamilton (1983) tarafından bildirilmiştir. Pro-embryoidlerin modifiye LS ortamında 2 yıl sonunda kendiliğinden geliştiği gözlenmiştir. Kültür hiçbir hormon eklenmeden devam ederken kallus oluşturmuş embriyoidler tespit edilmiştir. 1 mg/l NAA ve 0,5 mg/l Kinetin içeren ortamda eksplantlar kültüre devam ettirilmiş, 3 yıllık kültür periyodu sonrasında tanecikli ve açık bej, hızlı büyüyen, yeşil ve gri olmak üzere 3 tip kallus oluşumu gözlenmiştir. Gri kallusların en yüksek embriyonik potansiyele sahip olduğu ortaya konmuştur [27].

Trolinder ve Goodin (1985); Coker 312 pamuk çeşidinde olgunlaşmış ve olgunlaşmamış dokularda somatik embriyogenesisi teşvik eden ortamı tespit etmek üzere çalışmalar yürütmüştür. 3 günlük bitki fidelerinden alınan eksplantların 0,1 mg/l 2,4 D ve 0,5 mg/l Kinetin muamelesi sonucunda %100 somatik embriyogenesis elde edildiği tespit edilmiştir. Ayrıca sürgün ucu eksplantlarında da 0,5 mg/l NAA ve 0,5 mg/l kinetin içeren ortamlarda ,100 somatik embriyogenesis sonucuna ulaşıldığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada kök dokularının 2 mg/l NAA ve 0,1 mg/l kinetin içeren ortamda, yaprak eksplantlarının ise 0,1

mg/l 2,4 D ve 1 mg/l IAA yada 1mg/l NAA ve 0,5 mg/l IAA içeren ortamlarda etkili sonuç verdiği belirtilmiştir [28].

Kumar ve ark. (1998); *Gossypium hirsutum* cv Coker 310 cinsi ile diğer cinslerin çaprazlanması ile elde edilen hibritlerde; rejenerasyonu somatik embriyogenesis vasıtasıyla incelenmiştir. ‘MCU 5’, ‘MCU 7’, ‘Khandwa 2’, ‘Bikaneri Nerma’, ‘F 846’ gibi Hindistan’ın inatçı çeşitleri ile oluşturulan hibrit tohumlar sterilizasyon sonrası 0,1 mg/l 2,4-D ve 0.5 mg/l Kinetin içeren MS ortamına alınmış 5-6 hafta sonra normal MS ortamına aktarılmıştır. 7-8 haftalık period sonrası %0,15 aktif karbon içeren ortamlara aktarılmış, 1-2 hafta sonra ise 0,1 mg/l kinetin içeren kültür ortamlarına aktarılmıştır. Bu protokol vasıtasıyla tüm hibritlerde somatik embriyogenesisle rejenerasyon görülmüştür. Coker 310 çeşidine göre daha kompakt ve yeşil kallus oluşumları gözlenmiştir. En yüksek embriyo/eksplant oranı MCU 5 x Coker 310 hibridinde 14,28 olarak belirtilmiştir [29].

Chamandoosti (2009); *Gossypium hirsutum* L. bitkisinde organogenesis ve fenolik içeriğin saptanması üzerine çalışmalar yürütmüştür. Kotiledon ve meristemetik sürgün ucu eksplantlarında fenolik salınımının en düşük olmasının yanı sıra 27,12 µM 2,4-D ve 8,87 µM BA içeren ortamlarda da fenolik salınımının daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Meristematik sürgün ucu eksplantları ise 0,492 µM IBA ve 0,929 µM kinetin içeren ortamda hiç fenolik salınımı göstermemiştir. Diğer taraftan çalışmada fenolik salınımının kültür ortamına düşük düzeyde inhibitör etki gösterdiği de saptanmıştır [30].

Khan ve ark. (2010) yüksek lif özelliğine sahip Narasimha (NM) çeşidinde *Agrobacterium* aracılığıyla gen transferi için somatik embriyogenesis üzerinde çalışmalar yürütmüş, kinetin, 2,4-D, zeatin ve farklı vitaminler içeren ortamlar ile denemeler kurmuştur. 2,4-D ve kinetin içeren ortamlarda kotiledon ve hipokotil eksplantlarıyla embriyonik kalluslar elde edildiği bildirilmiştir. Somatik embriyogenesisin hormonsuz MS ortamında gerçekleştiği ancak embriyoların globüler evrede yeterince iyi gelişmediği gözlenmiştir. En yüksek embriyo gelişiminin ise B5 vitamini içeren MS ortamında (B5MS) 0,1 mg/l zeatin içeren ortamda gerçekleştiği bildirilmiştir [31].

Memon ve ark. (2010); *Gossypium hirsutum* L. bitkisi Reshmi, Rehmani and TH-3/83 genotiplerinde 4 oksin hormonunun (2,4-D, IAA, IBA ve Kinetin), iki farklı konsantrasyonu (3 mg/l and 4 mg/l) kullanılarak kallus oluşumunun teşviki üzerine çalışmalar yapmıştır. Olgunlaşmamış ovuller ve anterler üzerinde yürütülen çalışmada ovullerin anterlere göre daha yüksek oranda rejenerer kalluslar ürettiği tespit edilirken; en yüksek kallus yüzdesinin Reshmi genotipinde olgunlaşmamış ovullerde 3 mg/l konsantrasyonunda elde edildiği belirtilmiştir. Rehmani genotipi ise olgunlaşmamış anter eksplantlarıyla 3 mg/l konsantrasyonunda Reshmiden sonra en yüksek kallus yüzdesine (%88) sahiptir. Çalışmanın sonunda 2,4-D konsantrasyonundaki artışın kallus yüzdesinde düşüşe neden olduğu da belirtilmiştir [32].

Ghaemi ve ark. (2011); *G. Hirsutum* bitkisi Coker 312 çeşidi; Hashem abad, Kerman, Termez ve Sepid çeşitleriyle kallus oluşumu ve somatik embriyogenesis üzerine karşılaştırılmış; bitkiciklerden izole edilen hipokotil eksplantları; 0.5 mg/l zeatin; 1 mg/l zeatin; 0.5 mg/l 2,4-D ve 0.1 mg/l kinetin; 1 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l kinetin ve 0.5 mg/l zeatin; 2 mg/l α -NAA, 1 mg/l kinetin ve 0.75 mg/l $MgCl_2$ kombinasyonlarını içeren B5MS ortamında kültüre alınmıştır. Embriyonik kallusların çoğalması için optimum ortam; 1 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l kinetin ve 0.5 mg/l zeatin içeren B5MS ortamıdır. Somatik embriyoların gelişmesi için ise hiçbir hormon içermeyen, 40 g/l sukroz içeren B5MS ortamı uygun bulunmuştur. 0.5 mg/l zeatin; 1 mg/l zeatin; 0.5 mg/l 2,4-D ve 0.1 mg/l kinetin ortamları Coker 312 çeşidinde %100 kallus oluşumu sağlamıştır, en düşük kallus oluşumu (46,66) ise Hashem abad eksplantlarında .5 mg/l 2,4-D ve 0.1 mg/l kinetin içeren ortamda görülmüştür. Embriyogenez oranları ise Termez (%2.22-%24.40), Hashem abad (%1.85-%9.73) ve Sepid (%9.06-%22.28) çeşitlerinde Coker 312 'ye (%66.66-%94.33) göre oldukça düşüktür. Kerman genotipinde ise hiç embriyogenez görülmemiştir [33].

Kamal (2011); Sahel, Sepid, No.200, Khordad ve Barbadense-5595 çeşitlerinde olgunlaşmamış embriyo, hipokotil ve kök eksplantlarında kallusun teşviki için 2,4-D ve BAP kombinasyonları ile çalışmıştır. En yüksek kallus oluşumunun (%81) No.200 çeşidinde olgunlaşmamış embriyo eksplantında, en yüksek kallus oluşumunun ise %25,8 ile Sepid çeşidinde kök eksplantında görüldüğü belirtilmiştir. Olgunlaşmamış embriyo eksplantlarında, hipokotil ve kök eksplantlarına göre kallus oluşumu daha yüksektir. Olgunlaşmamış embriyolarda en yüksek kallus oluşum yüzdesi (%85,6) 0,5 mg/l 2,4-D ve

2 mg/l BAP içeren MS ortamda gözlenmiştir. Sitokinin içermeyen 0,5 mg/l 2,4-D içeren MS ortamı hipokotil ve kök eksplantları için en yüksek kallus yüzdesini (%51,6-%38,3) sağlamıştır. Çalışmada yüksek konsantrasyonda kinetin olgunlaşmamış embriyolarda kallus oluşumunu teşvik ederken; hipokotil ve kök eksplantlarında olumsuz etkiye bulunduğu belirtilmiştir [34].

Gawel (2012); embriyogenesisin teşviki için *G. Hirsutum* bitkisi Acala SJ-5, Coker 312, Paymaster 303, T1, T25 ve T169 çeşitlerinden alınan petioller; 3 modifiye MS ortamında kültüre alınmıştır. Tüm çeşitlerde kallus oluşumu gözlenirken; embriyogenesis sadece T25 ve Coker 312 çeşitlerinde görülmüştür. Eksplantlar 4.0 mg /l NAA and 1.0 mg /l Kinetin içeren modifiye MS ortamında kültüre alınmış; bütün genotiplerde embriyogenesis segregasyonu görüldüğü bildirilmiştir. En yüksek embriyonik kültürler ve embriyo/embriyonik kültür oranı T25 ve Coker 312 hatlarında gözlenmiştir. Farklı kombinasyonlarda BA, NAA, 2,4-D ve kinetin içeren ortamlardan BA ve 2,4-D kombinasyonu ile Kinetin ve 2,4-D kombinasyonu embriyogenesis için etkisiz bulunmuştur. Embriyogenesis Kinetin ve NAA kombinasyonu ile BA ve NAA kombinasyonlarında gözlenirken; embriyonik kalluslar sitokinin içermeyen NAA ortamlarında gözlenmiştir. Optimum büyüme düzenleyici kombinasyonu ise 1.0-3.0 mg/l NAA ve 0.1 -1.0 mg /l 2iP içeren ortam olarak tespit edilmiştir. T25 ve Coker 312 çeşitlerinde elde edilen kalluslar ikiye bölünüp bir parçası sıvı ortama diğeri ise yarı katı ortama alınmıştır. Bu çalışma sonucunda sıvı ortamda 227.3 embriyo /kültür oranı elde edilirken yarı katı ortamda 134.6 embriyo/kültür oranı elde edilerek; sıvı ortamların daha olumlu sonuçlar verdiği ortaya çıkarılmıştır [35].

Kumari ve Meenakshi (2012); *Gossypium hirsutum* L. bitkisi Coker 310, MCU 12 ve KC3 çeşitlerinde üç farklı konsantrasyonda (0.1, 0.5, 1.0 mg/l), farklı büyüme düzenleyicilerin (2,4-D and Kinetin, 2,4-D and BAP, 2,4-D and TDZ and 2,4-D and Zeatin) kallus oluşumunu teşviki üzerine çalışmalar yürütmüş; 0.1 mg/l 2,4-D ve 0.5 mg/l kinetin içeren MS ortamında %100 kallus rejenerasyonu elde edilmiştir. 4, 7, 10, 14, 21 ve 28 günlük kotiledon ve hipokotil eksplantlarında en yüksek kallus yüzdesi 7 günlük eksplantlarda tespit edilmiştir. Ayrıca %0.4 fitajel ve %0.8 agar içeren ortamlar kallus rejenerasyonu yönünden incelenmiş; %0,4 fitajel içeren ortamlarda daha olumlu sonuçlar alındığı bildirilmiştir [36]

Trolinder ve Goodin (1985); öncelikle katı MS ortamında globüler embriyolar elde edilmiş daha sonra sıvı MS' e aktararak embriyoların gelişmesini sağlamıştır. Çalışmada 10^{-7} M'lık absisik asit, giberellik asit ve kinetin ilavesinin globüler embriyo çoğalmasını arttırırken normal gelişmeyi baskıladığı da ortaya konmuştur. Glutaminin ise hem globüler embriyo gelişimini hem de normal gelişmeyi teşvik edildiği tespit edilmiştir. Ayrıca ışığın önemi vurgulanarak karanlığın kararma üzerindeki etkisi incelenmiş, en yüksek çoğalmanın 18 saat karanlık 6 saat aydınlık fotoperiyod altında elde edildiği belirtilmiştir [28].

Finer ve Mullen (1990); pamukta gen transformasyonu çalışmaları için *Gossypium hirsutum* L. bitkisi Coker 310 çeşidinde embriyonik süspansiyon kültürü çalışmaları yürütmüş; çalışmada 0,5 mg/l picloram ve 5 mg/l 2,4 D içeren ortam muamelesi ile embriyo çoğalması teşvik edilmiştir [37].

2.2. Çoklu Sürgün Eldesinin Teşviki Üzerine Çalışmalar

Agrawal ve ark. (1997) Anjali-LRK 516 pamuk çeşidinde kotiledon boğum eksplantları kullanarak çoklu sürgün eldesi üzerine çalışmalar yürütmüştür. 35 günlük fidelerden alınan eksplantlar 2,5 mg/l BAP ve 2,5 mg/l Kinetin içeren MS ortamına aktarılarak maximum sayıda sürgün sayısı (4,7 sürgün/eksplant) elde edilmiştir. Çalışmada ayrıca cam şişelerde yetiştirilen bitkilerin cam tüplerde yetiştirilenlere göre daha fazla sürgün içerdiği tespit edilmiştir (8,3 sürgün/eksplant). Çoklu sürgünlerin uzaması için fitohormon içermeyen sıvı ya da agarlı MS ortamı kullanılmış; köklendirme için ise 0,05 mg/l ya da 0,1 mg/l NAA içeren yarı katı MS besin ortamı kullanıldığı belirtilmiştir. Son aşamada ise seralara aktarılan bitkilerde %95 yaşam oranı tespit edilmiştir [38].

Tuli ve ark. (1997) pamuk bitkisinde Hindistan yerel çeşitlerini de içeren 10 farklı çeşitte (*Gossypium hirsutum* cv., *G. hirsutum* cv. PKV081, *G. hirsutum* cv. RS810, *G. hirsutum* cv. Pusa 37, *G. hirsutum* cv. Pusa 26, *G. hirsutum* cv. Stoneville, *G. hirsutum* cv. F-1084, *G. hirsutum* cv. CA-1193, *G. arboreum* cv. Shyamly, *G. arboreum* cv. Lohit) çalışma yürütmüştür. 0,5 cm hipokotil ve kotiledon bölgeyi içeren eksplantlar 22,2 µM BA içeren MS ortamında ilk haftada tüm eksplantlarda ortalama 1 sürgün elde edilirken; en yüksek sürgün sayısı *G. Hirsutum* cv. Khandwa-2 çeşidinde 4.4 sürgün/ eksplant olarak tespit edilmiştir. 4 haftalık periyod sonrasında ise en yüksek sürgün sayısı *G. hirsutum* cv.

PKV081 çeşidinde 7,1 sürgün/eksplant olarak tespit edilmiştir. Daha sonra eksplantlar 2,7 µM NAA içeren MS ortamlarında köklendirmeye alınmıştır. Köklendirme ve aklimatizasyon aşamalarında çeşitler arasında önemli farklılıklar tespit edilmemiştir [39].

Hemphill ve ark. (1998); Stoneville 7A ve Paymaster HS26 çeşitlerinde kallus fazını içermeyen hızlı çoklu sürgün eldesi üzerine bir prosedür geliştirmeye çalışmış, farklı konsantrasyonlarda BA içeren ortamlarda eksplantları kültüre almıştır. Sürgün ucu meristemleri, birincil ve ikincil yaprak boğumları, kotiledon boğumlar eksplant olarak seçilmiş ve en iyi sonuçlar 0,3 µM BA içeren ortamlarda görülmüştür. Köklendirme için ise 1 µM IBA içeren ortamların kullanıldığı ancak köklendirme ve daha sonra aklimatizasyon aşamasında %25 canlılık oranı görüldüğü belirtilmiştir [40].

Ouma ve ar.(2004); Delta pine 50 (DP50) and Stoneville 474 (STN474) çeşitlerinde hipokotil eksplantları kullanarak, sürgün rejenerasyonu için TDZ, NAA ve AgNO₃' in farklı kombinasyonları üzerinde çalışmıştır. Adventif sürgün eldesi için en iyi sonuçların DP50 çeşidinde 0.175 mg/l TDZ, 0.01 mg/l NAA ve 5.1 mg/l AgNO₃ içeren ortamlarda, STN474 çeşidinde ise 0.08 mg/l TDZ, 0.01 mg/l NAA ve 10.2 mg/l AgNO₃ içeren ortamlarda elde edildiği bildirilmiştir [41].

Özyiğit ve ark. (2007); Nazilli 84S çeşidinde kök, hipokotil, kotiledon ve yaprak eksplantlarıyla çalışarak eksplant yaşı ve fenolik miktarının rejenerasyon üzerine etkisini incelemiştir. 0,1 mg/l kinetin içeren MS ortamında kültüre alınan eksplantlarda 7, 14, 21 ve 28 günlük bitkiciklerden alınan eksplantlarda rejenerasyon yüzdeleri incelenmiş; en yüksek rejenerasyon oranı (%75,00) 7 günlük eksplantlarda görülmüştür. Aynı çalışmada hipokotil ve kotiledon eksplantlarda en yüksek fenolik miktarı 21. günde; yaprak ve kök eksplantlarında ise 28. günde tespit edilmiştir. Bütün eksplant tiplerinde en düşük fenolik miktarı ise 7. günde görülmüştür. Bu sonuç ise en uygun eksplant kaynağının 7 günlük bitkicikler olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada köklendirme için ise 1 mg/l IBA içeren WPM ortamı kullanılmıştır [42].

Divya ve ark. (2008); pamuk bitkisinde hipokotil eksplantlarından sürgün rejenerasyonu üzerine çalışmalar yürütmüş; optimal sürgün rejenerasyonu Nitsch ve Nitsch vitaminleri

içeren MS ortamında elde edilmiştir. 2 mg dm⁻³ TDZ ve 0.05 mg dm⁻³ NAA kombinasyonu içeren ortam; %76 sürgün rejenerasyonu ve 10,6 eksplant başına sürgün sayısı ile sürgün rejenerasyonu için en uygun ortam olarak bildirilmiştir. BAP ve kinetin kombinasyonlarının ilgili hormonların tek tek kullanımına göre daha iyi sonuçlar verdiği, etilen inhibitörü AgNO₃ ve aktif karbonun da olumlu sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. Köklendirme için ise 1 mg dm⁻³ IBA ve aktif karbon içeren ½ MS ortamında en iyi sonuçlar alınmıştır [43].

Özyiğit (2009); *Gossypium hirsutum* L. var. Nazilli 84S bitkisinde 3 farklı boğum eksplantı kullanarak sürgün rejenerasyonu üzerine çalışmalar yürütmüştür. *In vitro* koşullarda büyümüş 35 günlük bitkilerden elde edilen kotiledon boğumlar, hipokotillerle beraber birinci ve ikinci yaprak boğumları, sürgün ve epikotil eksplantları 0.1 mg/l kinetin içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Genç bitkilerle karşılaştırıldığında sonuçlarda bir değişiklik olmazken; en yüksek sürgün gelişimi (%74,2) kotiledon boğumlarda, ardından da %60,7 ve %41,6 yüzdeleri ile birinci yaprak boğumları ve ikinci yaprak boğumlarında gözlenmiştir. Bütün sürgünlerde 1 mg/l IBA içeren WPM ortamında köklendirme sağlandığı bildirilmiştir [44].

Rashid ve ark. (2009); transgenik pamuk bitkilerinin *in vitro* koşullarda köklendirilmesi için uygun bir prosedür geliştirilmesi üzerine çalışmış; seleksiyon sonrası en başarılı köklendirme 1.0 mg/ml IBA ve %2 sukroz içeren MS ortamında sağlanmıştır. Bu ortamla kararmış ve ölü görünümlü kök bölümlerine sahip sürgünler dahil %98 oranında köklendirme sağlanmıştır [45].

Pushpa ve Raveendran (2010); Coker310, MCU-5, SVPR-2 çeşitlerinde sürgün ucu eksplantları kullanarak organogenesis çalışmaları yürütmüş, transgenik pamuk eldesinin organogenesis ile eldesi yönünde bir strateji geliştirmiştir. En iyi sürgün gelişiminin 0,1 mg/l kinetin içeren MS ortamında görülmüştür (Coker 310 56.0, MCU-5 53.3, SVPR-2 44.7). En iyi kök gelişimi ise 0.1 mg/l GA₃ + 1.0 mg/l IAA içeren MS ortamında görülmüştür. Bu ortamda kök etkinliği Coker 310 için %76.6, MCU5 için %60, SVPR2 için %40 olarak belirtilmiştir [46].

Li ve ark. (2010); pamuk bitkisinde LED ışıkların bitki büyümesi ve morfojenezi üzerine etkisini incelemiştir. Sürgün ucu eksplantları 0.1 mg/l BA ve 0.5 mg/l NAA içeren MS ortamında kültüre alınmış 45 gün boyunca $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fotosentetik foton akısına sahip 6 farklı ışık (fluorasan lamba (F), monokromatik mavi LED (B), 3 mavi ve 1 kırmızı LED karışımı (B:R = 3:1, 1:1, 1:3) ve monokromatik kırmızı LED (R)) altında 12 saat fotoperiyoda bırakılmıştır. Yaş ağırlık, kuru ağırlık, kök uzunluğu ve ikinci boğumlar arası uzunluğu 3 mavi ve 1 kırmızı ışık karışımında en iyi sonucu verirken; florasan lamba altında en düşük sonuçları verdiği belirtilmiştir. Klorofil miktarı, yaprak kalınlığı, palizat doku kalınlığı, yaprak ve stoma çapının monokromatik mavi LED altında; kök gelişimi, şeker, nişasta ve çözülmüş şeker içeriği bakımından ise kırmızı LED ışıkların en yüksek sonuçları verdiği gözlenmiştir. Ancak çalışma sonucunda 1 kırmızı ve 1 mavi LED karışımının bitki gelişimi için en uygun olduğu saptanmıştır [20].

Farahani ve ark. (2010); Bakhtegan, Zeta-2 çeşitleri ve bu çeşitlerin hibriti olan Bakhtegan×Zeta-2 çeşidi ile yürüttüğü çalışmada çeşitli büyüme düzenleyicilerin sürgün rejenerasyonu üzerindeki etkisini incelemiştir. En yüksek sürgün sayısı (7,66 sürgün/eksplant) hibrit çeşide ait apikal sürgün meristemiyle 0.1 mg/l zeatin ve aktif karbon (2 g/l) içeren ortamda sağlanmıştır. En yüksek sürgün uzunluğu (2,75 cm) ise zeatin içeren ortamda Zeta-2 çeşidinde elde edilmiştir. En yüksek sürgün sayısı (4,5) ve yaprak sayısı (3,5) ise Zeta-2 ve Bakhtegan çeşitlerinde 5. alt kültürleme sonrasında görülmüştür [47].

Laud ve ark. (2010); Diploid pamuk *G. arboreum* bitkisi PA255 çeşidinde farklı büyüme düzenleyiciler ve eksplant tiplerinin rejenerasyona etkisi üzerine çalışmıştır. 10 mg/l thiamine, 100 mg/l inositol içeren MS ortamı farklı konsantrasyonlarda BA, kinetin ve NAA içeren ortamlara alınmıştır. En yüksek rejenerasyon %89.4 ve %82.3 ile 2.5 mg/l BAP ve 1 mg/l kinetin kombinasyonunda hem sürgün ucu hem kotiledon eksplantlarında görülmüştür. En düşük rejenerasyon oranı ise; %55,1 ve %51,1 ile 1.5 mg/l BAP, 0,5 mg/l kinetin ve 1 mg/l NAA içeren ortamda sırasıyla sürgün ucu ve kotiledon eksplantlarında tespit edilmiştir [48].

Yang ve ark. (2010); *Gossypium bickii* Prokhanov bitkisinde kotiledon boğumları kullanarak organogenesis ile rejenerasyon çalışmaları yürütmüştür. 4 mg/l BAP (N6-

benzyladinine) ve 0.1 mg/l TDZ içeren B5MS ortamında kültüre alınan eksplantlar daha sonra 2 mg/l BAP içeren ortamlarda altkültürülenmiştir. Elde edilen çoklu sürgünlerin uzaması için 0,05 mg/l GA₃ içeren ortamlara aktarılan eksplantlar yeterli sürgün boyu elde edildiğinde köklendirme ½ modifiye MS ortamına alınmıştır. Köklendirilen bitkiciklerin bazıları seralara alınırken bazıları ana bitkilerle genetik homojenitenin araştırılması için RAPD analizine alınmış rejenere bitkilerin ana bitkilerle aynı kromozom sayısına ve karaktere sahip olduğu tespit edilmiştir [49].

Chowdhury ve ark. (2011); *Gossypium herbaceum* L. bitkisi kotiledon eksplantlarını kullanarak *in vitro* bitki rejenerasyonu üzerinde çalışmıştır. Sitokinin konsantrasyonu artışının kallus oluşum yüzdesi, sürgün oluşturan kallus yüzdesi ve sürgün/kallus oranında artışa neden olduğu tespit edilmiştir. 3 farklı sitokinin arasında en iyi performansın BA ile elde edildiği belirtilirken; en yüksek kallus yüzdesi (6,55) ve en yüksek sürgün oluşturan kallus yüzdesi (%5.87) 1,0 mg/l BA içeren MS ortamında elde edilmiştir. En yüksek kallus başına sürgün sayısı ise 3,02 ile 1mg/l kinetin içeren ortamda görülmüştür. Köklendirme ise en yüksek %41,23 ile 2,0 mg/l NAA içeren MS ortamında görülmüştür. Aynı ortamda enyüksek kök sayısı 3,61, en yüksek kök uzunluğu ise 3,62 cm olarak tespit edilmiştir [50].

Sangannavar ve ark. (2011); *Gossypium arboreum* ve *G. Barbadense* türü pamuk bitkilerinde yaralamanın, yatay ve dikey kesikler vermenin gen aktarımı ve rejenerasyon üzerine etkisini incelemiş; sürgün ucu meristem bölgesinde dikey yaralamanın gen aktarımı için daha olumlu sonuçlar verdiğini vurgulamıştır. Ayrıca DLSa-17 ve SBYF-425 genotipleri için en yüksek sürgün rejenerasyonu sırasıyla %96 ve %92 ile kontrol grubunda, hiçbir büyüme düzenleyici içermeyen MS ortamında gözlenmiştir. Çalışmanın sonucunda sürgün ucu meristemlerinin hem organogenesis hem de gen aktarımı için en başarılı sonuçlar verdiği bildirilmiştir [51].

Obembe ve ark. (2011); *G. hirsutum* (hybrid H8 and Khandwa-2) ve *G. arboretum* (BD-1, BD-6, Sarvottam and Jawahar Tapti BD) bitkilerinin kotiledon boğum eksplantlarında direkt çoklu sürgün eldesi ve rejenerasyonu üzerine çalışmalar yürütmüş; farklı konsantrasyonlarda BAP eklenmiş MS ortamları denenmiştir. Ortalama eksplant başına sürgün sayısı 5.5'tir. En yüksek eksplant başına sürgün sayısı (9) 3.0 mg/l BAP içeren

ortamlardaki *G. Hirsutum* çeşitlerinde gözlenmiştir. Sürgünler 0,5 mg/l GA₃ içeren ortamda geliştirilirken; köklendirme hormon içermeyen MS ortamında sağlanmıştır [52].

Mushke ve ark. (2012); *G. Hirsutum* bitkisi MCU-11 çeşidini farklı BA, NAA ve Kinetin kombinasyonlarında kültüre almış; en iyi sonuçları 1,5 mg/l BA ve 0,1 mg/l NAA içeren MS ortamında elde etmiştir. Bu ortamda %98 rejenerasyon potansiyeline sahip eksplanların sürgün/eksplant oranı 6,86 olarak tespit edilirken, sürgün uzunluğu 3,22 cm olarak ölçülmüştür. Sonrasında çoklu sürgün kapasitesine ulaşan eksplantlar B5 vitamini içeren MS'in yarım dozunda (½ B5MS) kültüre alınarak köklendirilmesi sağlanmıştır. Köklenen bitkicikler 1 kum ve 1 toprak karışımı içeren saksılara alınarak aklimatizasyonu sağlanmış ve çalışma sonucunda bitkiciklerin %90 canlılık oranına sahip olduğu belirtilmiştir [53].

Pathi ve Tuteja (2013); *Gossypium hirsutum* L. cv Narashima bitkisinde embriyo ucu eksplantları farklı büyüme düzenleyicilerle kültüre alınmış; 2 mg/l BAP ve 2 mg/l kinetin içeren MS ortamında en yüksek çoklu sürgün sayısı elde edilmiştir. Ortamlara GA₃ eklenmesi ile elde edilen sürgünlerin gelişmesi sağlandı. Daha sonra aklimatize edilen bitkiler saksılara aktarılmıştır. Geliştirilen prosedürün en önemli noktası aynı zamanda hem rejenerasyon süresini kısaltması hem de çoklu sürgün sayısını artırmasıdır [54].

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Pamuk bitkisinde doku kültürü yöntemleriyle çoklu sürgün eldesi oldukça zordur. Bu noktada farklı çeşitler üzerinde rejenerasyon protokollerinin geliştirilmesi için çalışmalar yürütülmektedir. Birçok çeşit düşük rejenerasyon kapasitesine sahip olmasına rağmen, bazı rejenerasyon protokolleri geliştirilebilmiştir. Ancak ülkemizde yaygın olarak üretilen çeşitlerde bir doktora çalışması haricinde başarılı rejenerasyon prosedürlerinin geliştirildiği çalışmalara rastlanılmamıştır.

Özellikle Hindistan ve İran yerel çeşitleriyle yürütülen çalışmalarda daha çok somatik embriyogenesisin teşviki üzerine çalışılmış; bu nedenle oksin kullanımı temel alınmıştır. Ancak direkt çoklu sürgün rejenerasyonu için daha çok kinetin ve TDZ gibi sitokininlerin kullanıldığı tespit edilmiş; bu noktada yüksek konsantrasyonlarda ön muamele uygulamalarının olumlu sonuçlar getireceği düşünülmüştür. Ayrıca bitki büyüme ve gelişmesinde ışığın önemi incelenerek; özellikle farklı renklerde LED ışık kombinasyonlarının pamuk bitkisinde bitki büyümesi ve sürgün gelişimi üzerinde olumlu sonuçlar oluşturabileceği tespit edilmiştir. Bitki doku kültürü çalışmalarında henüz çok yeni olan LED ışık kullanımının *in vitro* kültürü zor olan bir çok bitki ve çeşit için de temel oluşturacağı düşünülmektedir.

Bu çalışma kapsamında; ülkemizde yaygın olarak üretilen pamuk çeşitleri için güvenilir ve tekrarlanabilir bir rejenerasyon protokolü geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Farklı büyüme hormonları ve vitaminlerle büyümenin teşviki sağlanmaya çalışılırken; kültür koşullarında yapılan değişik uygulamalarla da başarılı sonuçlar alınacağı düşünülmektedir. LED ışıkların kullanımı da bunlardan biridir.

Bu çalışma ile farklı pamuk çeşitlerinde sürgün rejenerasyonu optimize edilerek; *Agrobacterium tumefaciens* ile gen aktarım yöntemi geliştirilmesi yönünde hazırlık yapılması amaçlanmaktadır. Pamuk bitkisinde sürgün rejenerasyonunda olduğu gibi, gen aktarım frekansı da son derece düşüktür. Farklı çeşitlerde transgenik bitkiler elde edilmesi ve bu bitkilerin çoklu sürgünlerinin geliştirilmesi noktasında çalışma biyoteknolojik yönden büyük önem taşımaktadır.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. Materyal

4.1.1. Deneme yeri

Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Biyoteknoloji ve Moleküler Genetik Laboratuvarı ve Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Kamil Özdağ Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Laboratuvarlarında yürütülmüştür.

4.1.2. Bitki materyali

Çalışmada ülkemizde Güney ve Ege bölgelerimizde yaygın olarak üretilen GSN-12 ve Stoneville 468 çeşitleri kullanılmıştır. STN-468 çeşidine ait tohumlar MayAgro Tohumculuk A.Ş. firmasından, GSN-12 çeşidine ait tohumlar ise Nazilli Pamuk Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir.

GSN -12 pamuk çeşidi, GW. 8751 (Stoneville 453 X Nazilli 87 F3) melezidir. 1996 yılında başlayan ıslah çalışmaları 2003'de tamamlanmıştır. GSN-12 hat adıyla 2005 yılında tescil denemelerine alınan bu çeşit 2007 yılında GSN-12 adıyla tescil ettirilmiştir. GSN-12 pamuk çeşidi çok verimli ve orta geçidir. Çırcır randımanı yüksek, lif özellikleri yönüyle iyi durumdadır. GSN-12 çeşidi uzun boylu, bitki formu koniktir. Gövde kalın ve çok sağlam olup, bitki tüylüdür [55]. Odun dalı verimli 3-4 adet olup, meyve dalları ana gövdeye 45 derece açılı, verimli ve 12-15 arasındadır. Yapraklar palmiye şeklinde, orta büyüklükte (büyük) ve tüylüdür. Kozaları orta - büyük, boyuna kesiti genellikle eliptik, uçtaki çıkıntı orta ve koza dış yüzeyi gözeneklidir. Tohumlar orta irilikte, hav yoğunluğu orta, hav rengi gridir. GSN-12 çeşidi uzun boylu, gövde kalın - kuvvetli, yapraklar ve gövde orta tüylü, verimli, orta geçici olup, makinalı hasada uygun ve lif kalite özellikleri çok iyi bir çeşittir. Çeşidi önemli kılan bir diğer özelliği ise az su istemesidir. Çeşidin çırcır randımanı (%) 41-42, 100 tohum ağırlığı (g) 10.7-11.1, lif uzunluğu (mm) 28.7-30.0, lif inceliği (micronaire) 4.4-4.5, lif mukavemeti (g/tex) 32.0-33.0'dır [55].

Stoneville 468 MayAgro Tohumculuk A.Ş. firmasının çoğalttığı bir çeşittir. Adaptasyon kabiliyeti çok yüksek olup, verim potansiyeli çok iyidir. Orta erkenci bir çeşittir. Hasat döneminde meydana gelebilecek fırtına ve yağmurdan dolayı lüleler dökme yapmaz. Yaprakları çok tüylü olup, emicilere karşı (Thrips ve Empoasca) dayanıklılık sağlar. Kozaların %70-75'i beş çenetlidir. Bakım ve iklimsel faktörlerden dolayı meydana gelebilecek kötü koşullara karşı emsalsiz bir üstünlüğü vardır. Kozası orta büyüklüktedir. Hem makine ile, hem de el ile hasada uygundur. Çeşitin çırçır randımanı (%) 42-43, 100 tohum ağırlığı (g) 10.6, lif uzunluğu (mm) 30.0, lif inceliği (micronaire) 4.2, lif mukavemeti (g/tex) 34.7'dir [55].

4.1.3. Büyüme ortamları ve büyütme koşulları

Çalışmalarda MS (Murashige ve Skoog, 1962) mineral tuz ve vitaminleri (Çizelge 4.1) kullanılmıştır. Besi ortamı hazırlamak için %3 sukroz (Duchefa) ve %0.3'lük fitajel (Sigma-Aldrich) ile katılaştırılan temel besin ortamı (MS) kullanılmıştır. Ortamın hazırlanmasında distile saf su kullanılmıştır. Yapılan çalışmalara göre besin ortamlarına farklı dozlarda bitki büyüme düzenleyicileri olarak sitokinin (TDZ ve kinetin) ve oksin (IBA ve NAA) ilave edilmiştir. Ayrıca köklendirme aşamasında kararmanın giderilmesi için adsorban olarak aktif karbon da ilave edilmiştir. Hazırlanan ortamların pH'ı 1N NaOH ya da 1N HCl kullanılarak 5,8'e ayarlandıktan sonra 1,2 atmosfer basınç altında ve 121°C'de 20 dakika tutularak sterilizasyon sağlanmıştır. Tüm kültürler farklı renkte ve kombinasyonda LED ışığı (Şekil 4.1) altında 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyodunda 24±1°C sıcaklıkta tutulmuşlardır.



Şekil 4.1. Farklı LED ışık uygulamaları (a) 4 kırmızı:1 mavi (b) 3 kırmızı:1 mavi ve (c) 2 kırmızı:1 mavi ışık kombinasyonu

Çizelge 4.1. Murashige ve Skoog ortamında bulunan maddeler ve konsantrasyonları [56]

Ortamda Bulunan Maddeler	Konsantrasyonu (mg/l)	
<i>Makro Elementler</i>	NH_4NO_3	1650,000
	KNO_3	1900,000
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440,000
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370,000
	KH_2PO_4	170,000
<i>Mikro Elementler</i>	KI	0,830
	H_3BO_3	6,200
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,300
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,600
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,250
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,850
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,250
<i>Vitaminler</i>	Myo-Inositol	100,000
	Nicotinic Acid	0,500
	Pyrotinic Acid	0,500
	Thiamine-HCl	0,100
	Glycine	2,000

4.1.4. Bitki büyüme düzenleyicilerin hazırlanması ve muhafazası

Bitki büyüme düzenleyicileri, uygun çözücülerle çözüldükten sonra 1 mg/l oranında stok solusyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan stok solusyonları +4°C' veya -20°C sıcaklıkta saklanmıştır (Çizelge 4.2). Büyüme düzenleyicilerinden TDZ ve NAA otoklavda steril edilmeden, kinetin ve IBA otoklavda steril edildikten sonra kullanılmıştır. Adsorban özelliğinde aktif karbon ise otoklav öncesi ve pH ölçümü sonrası ilave edilmiştir.

Çizelge 4.2. Kullanılan büyüme düzenleyici, stok konsantrasyonu ve saklama koşulları

Bitki büyüme düzenleyicileri	Çözücü	Stok konsantrasyonu (mg/ml)	Sterilizasyon şekli	Saklama koşulları (°C)
Oksinler				
IBA	1N NaOH	1/1	Filtre	- 20
NAA	1N NaOH	1/1	Otoklav	4
Sitokininler				
TDZ	DMSO	1/1	Otoklav	4
Kinetin	1N NaOH	1/1	Filtre	- 20
Adsorban				
Aktif karbon	-	-	Otoklav	Oda koşulları

4.2. Yöntem

4.2.1. Tohumlardan hav tabakasının uzaklaştırılması

STN-468 tohumlarının etrafı hav ile kaplı olduğu için yüzey sterilizasyonu öncesi havın uzaklaştırılması gerekmektedir. Bunun için behere alınan tohumlar; üzerine 4-5 damla %100 sülfürik asit (10 kg tohum / 1 litre H₂SO₄) damlatılarak hızlı ve yoğun bir şekilde karıştırılmış, havın uzaklaştırılması sağlanmıştır. Ancak tohuma zarar verilmemesi için havı alınan tohumlar hemen çeşme suyuyla yıkanmıştır.

4.2.2. Yüzey sterilizasyonu

İki farklı pamuk çeşidine ait tohumların sterilizasyonu Bakhsh (2010) tarafından geliştirilmiş sterilizasyon prosedürü modifiye edilerek sağlanmıştır [57]. Buna göre tohumlar öncelikle 1000 ml'lik behere konulup, üzerine 600-700 ml çeşme suyu eklenerek 25-30 dk beklenmiştir. Suyun yüzeyine toplanan tohumlar çimlenme ihtimalinin düşük olduğu düşünülerek alınmış; kalan tohumlar daha önceden otoklav sterilizasyonu ile sterilize edilen beherlere aktarılmıştır. Tohumları içeren behere öncelikle 200 ml %1'lik H₂O₂ (Sigma-Aldrich) eklenerek 10 dk muamele edilmiştir. Steril saf su ile 5 dk durulanan tohumlara; %0,2'lik SDS (Sodyum dodesil sülfat)(Sigma-Aldrich) ve %0,2'lik HgCl₂ içeren 200 ml solüsyon eklenerek, 10 dk muamele edilmiştir. Son olarak steril saf su ile 3 kez 5'er dk durulanan tohumlar; steril magentalar içerisinde %3 sukroz ve %0,3 fitajel içeren MS ortamlarına aktararak, 24+1°C'de 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyotta kültüre alınmıştır.

4.2.3. Eksplant izolasyonu

Sterilizasyon sonrası 7-10 günlük çimlenmiş bitkiciklerden, *in vitro* koşullar altında kotiledon boğum eksplantları; sürgün bölgelerine hasar vermemeye dikkat edilerek izole edilmiş, farklı konsantrasyonlarda hormonlar içeren ortamlarda kültüre alınmıştır (Çizelge 4.3). Bütün doku kültürü çalışmaları steril kabin içerisinde aseptik koşullarda yapılmıştır.

Çizelge 4.3. Araştırmada kullanılan besin ortamları

Amaç	Besin Ortamı	Büyüme Düzenleyici	Adsorban
Muamele	MS	TDZ (0,05 mg/l-0,10 mg/l) IBA (0,10 mg/l)	-
Ön Muamele	MS	Kinetin (2,5 mg/l)	-
Muamele	MS	TDZ (0,05 mg/l-0,10 mg/l 0,20 mg/l)	-
Muamele	MS	Kinetin (0,05 mg/l-0,10 mg/l- 0,20 mg/l-0,40 mg/l 0,80 mg/l)	-
Ön muamele	MS	Kinetin (5 mg/l-10 mg/l 20 mg/l)	-
Muamele	MS	-	-
Muamele	½MS	-	-
Muamele	¼MS	-	-
Köklendirme	MS	IBA (0,25 mg/l-0,50 mg/l 1,00 mg/l)	-
Köklendirme	MS	NAA (0,25 mg/l-0,50 mg/l 1,00 mg/l)	-
Köklendirme	MS	NAA (1,00 mg/l)	Aktif Karbon (1 g/l)

4.2.4. Rejenere Olan Sürgünlerin Köklendirilmesi

Farklı ön muamele uygulamaları ve muamelelerle çoklu sürgün eldesi sağlanan eksplantlar köklendirme işlemi için oksinlerin (IBA ve NAA) farklı konsantrasyonlarında tekrar kültüre alınmıştır (Çizelge 4.3). Fenolik salınımının özellikle kök bölgesinde oluşturduğu kararmanın giderilmesi için ise adsorban olarak 1,00 g/l aktif karbon da eklenmiştir.

4.2.5. İstatiksel Değerlendirme

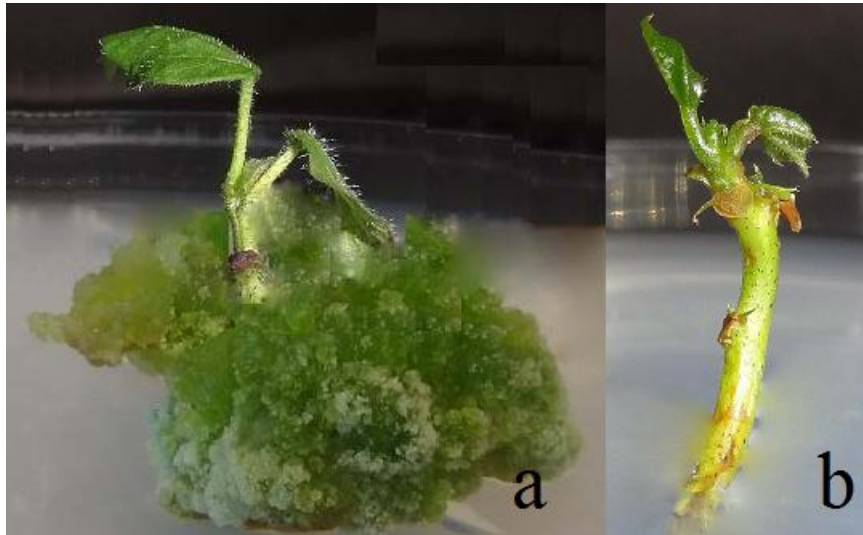
Denemeler, tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuş olup her muamele, içerisinde 3 adet eksplantın bulunduğu 3 tekerrürlü Magenta GA7 kutuları veya petrilere oluşturulmuştur. Elde edilen veriler “SPSS 17 for Windows” programı yardımıyla varyans analizine tabi tutulmuş muamele ortamlarını karşılaştırmak amacıyla M-STAT C bilgisayar programında Duncan testi kullanılmıştır. Yüzde değerler, istatistik analizinden önce arcsin değerlerine çevrilmiştir [58].

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. GSN-12 Çeşidinde *In Vitro* Sürgün Rejenerasyonu

5.1.1. TDZ ve farklı LED ışık uygulamasının etkisi

GSN-12 pamuk çeşidine ait *in vitro* koşullarda çimlenen 7-8 günlük bitkiciklerden elde edilmiş kotiledon boğum eksplantları 0,05-0,40 mg/l TDZ içeren, fitajel ile katılaştırılmış MS ortamına aktarılmış olup, 4:1 ve 3:1 oranlarında kırmızı:mavi ışık kombinasyonlarında kültüre alınarak gözleme tabi tutulmuştur. 2-3 hafta içinde tüm eksplantlarda kallus ve sürgün rejenerasyonu gözlenmiştir. Sekiz hafta sonra (Şekil 5.1.) kallus oluşum oranı, sürgün rejenerasyon oranı ve eksplant başına sürgün sayısı sonuçları kaydedilmiş olup, farklı TDZ konsantrasyonları ve ışık kombinasyonları için varyans analizi yapılmıştır (Çizelge 5.1.).



Şekil 5.1. Farklı TDZ konsantrasyonlarında GSN-12 çeşidine ait kotiledon boğum eksplantlarında kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonu (a) kallus ve sürgün oluşumu (b) köklendirme için alınan sürgün

Çizelge 5.1. GSN-12 çeşidinde farklı dozlarda TDZ konsantrasyonları ve LED ışık kombinasyonlarının sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi

VK	SD	Kallus Oluşumu (%)		Sürgün Rejenerasyonu (%)		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)	
		KO	F	KO	F	KO	F
TDZ- Işık	9	1750,00	102,04**	916,67	305,56**	1,05	1,87*
Hata	20	17,15	-	3,00	-	0,56	-
Genel Toplam	29	-	-	-	-	-	-

**p<0,01 düzeyinde önemli

*p<0,05 düzeyinde önemli

Çizelge 5.1. incelendiğinde farklı oranlarda TDZ içeren ortamlarda kotiledon boğum eksplantlarında kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyon yüzdesinin p<0,01 düzeyinde, eksplant başına sürgün sayısının ise p<0,05 düzeyinde önemli olduğu tespit edilmiştir. Bu farklılıkların önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 5.2.'de verilmiştir.

Çizelge 5.2. GSN-12 çeşidine ait eksplantlarda farklı dozlarda TDZ konsantrasyonları ve LED ışık kombinasyonlarının sürgün rejenerasyonuna etkisi

Işık	TDZ (mg/l)	Kallus oluşumu (%)	Sürgün Rejenerasyonu (%)	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	Petri başına toplam sürgün sayısı (adet)
4 kırmızı: 1 mavi LED ışıkları	0,05	75,00 ^{a**}	100,00 ^{a**}	1,88 ^{ab*}	5,75
	0,10	37,50 ^c	100,00 ^a	2,25 ^{ab}	6,75
	0,20	50,00 ^b	100,00 ^a	2,00 ^{ab}	6,33
	0,30	37,50 ^c	100,00 ^a	2,38 ^{ab}	7,25
	0,40	25,00 ^d	100,00 ^a	1,34 ^b	4,50
3 kırmızı: 1 mavi LED ışıkları	0,05	0,00 ^e	100,00 ^a	2,00 ^{ab}	6,00
	0,10	50,00 ^b	75,00 ^b	1,33 ^b	4,00
	0,20	50,00 ^b	75,00 ^b	1,00 ^b	3,00
	0,30	75,00 ^a	50,00 ^c	3,00 ^a	8,00
	0,40	75,00 ^a	100,00 ^a	2,25 ^{ab}	6,50

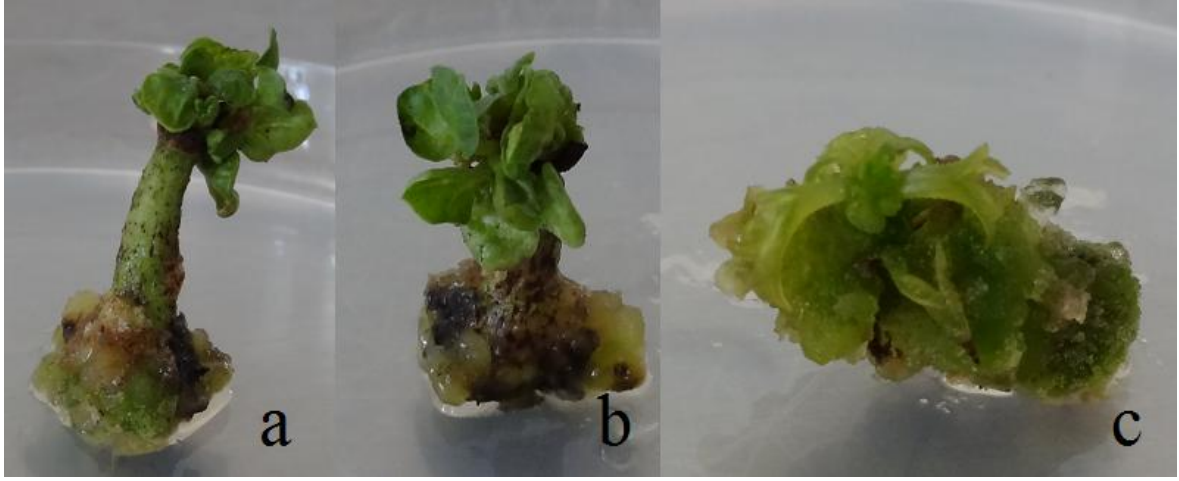
**Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında fark p<0,01 düzeyinde önemlidir.

*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında fark p<0,05 düzeyinde önemlidir.

Denemede kullanılan 0,05-0,40 mg/l TDZ içeren MS ortamlarında kotiledon boğum eksplantlarda kallus oluşum oranı %0,00-75,00 olarak kaydedilmiştir (Çizelge 5.2.). 4 kırmızı:1 mavi ışık altında tutulan eksplantlarda en yüksek kallus oluşum oranı (%75,00) 0,05 mg/l TDZ içeren ortamda gözlenirken; 0,40 mg/l TDZ içeren ortamda kallus oluşumu gözlenmemiştir. 3 kırmızı:1 mavi ışık altında bırakılan eksplantlarda ise en yüksek kallus oluşum oranı (%75,00) 0,30 mg/l ve 0,40 mg/l TDZ içeren ortamda gözlenirken; 0,05 mg/l TDZ içeren ortamda kallus oluşumu gözlenmemiştir. Sürgün rejenerasyon oranı ise 4 kırmızı:1 mavi ışık altında bütün eksplantlarda %100,00 iken; 3 kırmızı:1 mavi ışık altında bırakılan eksplantlarda en yüksek (%100,00) 0,05 mg/l ve 0,40 mg/l TDZ içeren ortamlarda, en düşük (%50,00) 0,30 mg/l TDZ içeren ortamlarda gözlenmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı ise; 1,00-3,00 adet olarak tespit edilmiştir. En yüksek (3,00) 0,30 mg/l TDZ içeren ortamda, 3 kırmızı:1 mavi ışık altında bırakılan eksplantlarda, en düşük (1,00) 0,20 mg/l TDZ içeren ortamda, 3 kırmızı:1 mavi ışık altında bırakılan eksplantlarda gözlenmiştir (Çizelge 5.2.). Petri başına toplam sürgün sayısı ise 3,00-8,00 adet olarak tespit edilmiştir. Her iki ışık kombinasyonu için de 0,30 mg/l TDZ içeren ortamda en yüksek petri başına toplam sürgün sayısı elde edilmiştir. 4 kırmızı:1 mavi ışık kombinasyonunun sürgün rejenerasyon oranını, 3 kırmızı:1 mavi ışık kombinasyonunun ise kallus oluşum yüzdesini arttırdığı tespit edilmiştir. Meydana gelen tüm sürgünler oksin (IBA ve NAA) içeren ortamlarda köklendirildikten sonra adaptasyona alınmıştır.

5.1.2. Farklı TDZ-IBA ve kırmızı:mavi (4:1) LED ışık uygulamasının etkisi

In vitro koşullarda çimlenen GSN-12 çeşidine ait 7-8 günlük bitkiciklerden elde edilen kotiledon boğum eksplantları fitajel ile katılaştırılan 0,05-0,10 mg/l TDZ ve 0,10 mg/l IBA içeren MS ortamında ve 4 kırmızı:1 mavi LED ışık altında kültüre alınmıştır. Gözleme alınan eksplantlarda iki hafta içinde kallus ve sürgün rejenerasyonu gözlenmiştir. Dört hafta sonra, eksplantlar üzerinde (Şekil 5.2a) kallus oluşumu ile belirgin şekilde sürgün oluşumu gözlenirken, sekiz hafta sonra bazı eksplantlarda yoğun kararırma gözlenmiştir (Şekil 5.2b). 12 hafta sonra (Şekil 5.2c), kallus oluşum oranı, sürgün rejenerasyon oranı ve eksplant başına sürgün sayısı sonuçları kaydedilmiş ve farklı TDZ-IBA kombinasyonları için varyans analizi yapılmıştır (Çizelge 5.3.).



Şekil 5.2. Farklı TDZ-IBA kombinasyonlarında GSN-12 çeşidine ait kotiledon boğum eksplantlarında sürgün rejenerasyonu (a) dört hafta (b) sekiz hafta sonra kallus ve sürgün oluşumu ile eksplantlarda kararırma ve (c) on iki hafta sonra çoklu sürgün rejenerasyonu

Çizelge 5.3. GSN-12 çeşidinde farklı TDZ-IBA kombinasyonları ile 4:1 (kırmızı:mavi) LED ışığın sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi

VK	SD	Kallus oluşumu (%)		Sürgün Rejenerasyonu (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	
		KO	F	KO	F	KO	F
TDZ-IBA	4	2502,50	3907,16**	2043,08	164,66**	2,09	9,47**
Hata	10	0,81	-	12,41	-	0,22	-
Genel Toplam	14	-	-	-	-	-	-

**p<0,01 düzeyinde önemli

Çizelge 5.3. incelendiğinde farklı oranlarda TDZ içeren ortamlarda kotiledon boğum eksplantlarında kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyon yüzdesi ile eksplant başına sürgün sayısı için $p<0,01$ düzeyinde önemli olduğu tespit edilmiştir. Bu farklılıkların önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 5.4.'de verilmiştir.

Çizelge 5.4. GSN-12 çeşidinde farklı TDZ ve IBA kombinasyonları ile 4:1 (kırmızı:mavi) LED ışığın sürgün rejenerasyonuna etkisi

TDZ	IBA	Kallus oluşumu (%)	Sürgün Rejenerasyonu (%)	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	Petri başına toplam sürgün sayısı (adet)
0,00	0,00	100,00 ^{a**}	100,00 ^{a**}	1,20 ^{bc**}	3,33
0,05	0,00	33,33 ^c	33,33 ^d	0,50 ^c	1,00
0,05	0,10	83,33 ^b	83,33 ^b	1,60 ^b	5,00
0,10	0,00	100,00 ^a	58,33 ^c	2,00 ^{ab}	6,00
0,10	0,10	100,00 ^a	83,33 ^b	2,72 ^a	7,33

**Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında fark $p < 0,01$ düzeyinde önemlidir.

Denemede kullanılan 0,05-0,10 mg/l TDZ ve 0,10 mg/l IBA içeren MS ortamlarında kotiledon boğum eksplantlarında kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyon oranı %33,30-100,00 olarak kaydedilmiştir. En düşük kallus oluşum oranı (%33,33) ise 0,05 mg/l TDZ içeren ortamda gözlenmiştir. En yüksek sürgün rejenerasyon oranı (%83,33) hormon içermeyen ortamda gözlenirken; en düşük sürgün rejenerasyonu 0,05 mg/l TDZ içeren ortamda tespit edilmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı ise; 0,50-2,72 adet olarak tespit edilmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı en yüksek (2,72) 0,10 mg/l TDZ ve 0,10 mg/l IBA içeren ortamda, en düşük (0,50) 0,05 mg/l TDZ içeren ortamda gözlenmiştir. Petri başına toplam sürgün sayısı 1,00-7,33 adet olarak tespit edilmiştir. En yüksek petri başına toplam sürgün sayısı 0,10 mg/l TDZ ve 0,10 mg/l IBA içeren ortamda, en düşük ise 0,05 mg/l TDZ içeren ortamda gözlenmiştir. TDZ konsantrasyonundaki artışın kallus oluşum oranını, sürgün rejenerasyonu oranı, eksplant başına sürgün sayısını ve petri başına toplam sürgün sayısını arttırdığı tespit edilmiştir. Ortamlara IBA ilavesinin de kallus oluşumu, sürgün rejenerasyon oranı ile eksplant başına sürgün sayısında artışa neden olduğu gözlenmiştir. Genel olarak en düşük kallus oluşumu, sürgün rejenerasyon oranı ve eksplant başına sürgün sayısı 0,05 TDZ içeren ortamda elde edilmiştir (Çizelge 5.4.). Meydana gelen tüm sürgünler oksin (IBA ve NAA) içeren ortamlarda köklendirildikten sonra adaptasyona alınmıştır.

5.1.3. GSN-12 çeşidinde farklı TDZ-IBA ve beyaz LED ışık uygulamasının etkisi

Bu denemede GSN-12 çeşidine ait 13-15 günlük kotiledon boğum eksplantları kullanılmıştır. Eksplantlar fitajel ile katılaştırılmış; 0,05-0,40 mg/l TDZ ile 0,10 mg/l IBA içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Rejenerasyon elde etmek için iklim odasında beyaz LED (Light Emitting Diode) ışık altına yerleştirilen eksplantlar gözleme alınmıştır. İkinci hafta içerisinde sürgün ve kallus oluşumları başlayan eksplantlarda 9 hafta sonra elde edilen veriler kullanılarak yapılan varyans analizi sonuçları Çizelge 5.5.'de verilmiştir.

Çizelge 5.5. GSN-12 çeşidinde farklı TDZ-IBA konsantrasyonları ve beyaz LED ışığın sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi

VK	SD	Kallus oluşumu (%)		Sürgün Rejenerasyonu (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	
		KO	F	KO	F	KO	F
TDZ-IBA	4	375,00	241,62**	4687,50	781,25**	1,92	10,85**
Hata	10	1,55	-	6,00	-	0,18	-
Genel Toplam	14	-	-	-	-	-	-

**p<0,01 düzeyinde önemli

Çizelge 5.5. incelendiğinde farklı oranlarda TDZ içeren ortamlarda kotiledon boğum eksplantlarında kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyon yüzdesi ile eksplant başına sürgün sayısı için p<0,01 düzeyinde önemli olduğu tespit edilmiştir. Bu farklılıkların önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 5.6.'da verilmiştir.

Çizelge 5.6. GSN-12 çeşidine ait eksplantlarda farklı dozlarda TDZ konsantrasyonları ve beyaz LED ışığın sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi

TDZ (mg/l)	IBA (mg/l)	Kallus oluşumu (%)	Sürgün Rejenerasyonu (%)	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	Petri başına toplam sürgün sayısı (adet)
0,05	0,10	62,50 ^{b**}	100,00 ^{a**}	2,00 ^{a**}	6,00
0,10	0,10	87,50 ^a	75,00 ^b	1,50 ^a	5,00
0,20	0,10	87,50 ^a	25,00 ^e	1,50 ^a	3,00
0,30	0,10	87,50 ^a	0,00 ^d	0,00 ^b	0,00
0,40	0,10	87,50 ^a	50,00 ^c	1,50 ^a	3,33

**Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında fark $p < 0,01$ düzeyinde önemlidir.

Denemede kullanılan 0,05-0,40 mg/l TDZ ve 0,10 mg/l IBA içeren MS ortamlarında kotiledon boğum eksplantlarda kallus oluşum oranı %62,50-87,50 olarak kaydedilmiştir. Kallus oluşum oranı 0,05 mg/l TDZ+0,10 mg/l IBA içeren ortamda %62,50 olarak tespit edilirken; diğer ortamlarda %87,50 olarak gözlenmiştir. Sürgün rejenerasyon oranı ise %0,00-100,00 olarak kaydedilmiştir. En yüksek sürgün rejenerasyon oranı (% 100,00) 0,05 mg/l TDZ+0,10 mg/l IBA içeren ortamda gözlenmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı ise 0,00-2,00 adet olarak gözlenirken; en yüksek eksplant başına sürgün sayısı (2,00) 0,05 mg/l TDZ+0,10 mg/l IBA içeren ortamda tespit edilmiştir. Petri başına toplam sürgün sayısı 0,00-6,00 adet olarak tespit edilmiş; en yüksek petri başına toplam sürgün sayısı 0,05 mg/l TDZ+0,10 mg/l IBA içeren ortamda elde edilmiştir (Çizelge 5.6.). TDZ konsantrasyonundaki artışın kallus oluşum oranını arttırdığı gözlenmiştir. Meydana gelen tüm sürgünler oksin (IBA ve NAA) içeren ortamlarda köklendirildikten sonra adaptasyona alınmıştır.

5.1.4. Kinetin ön muamelesinin etkisi

G. hirsutum bitkisinin GSN-12 çeşidine ait *in vitro* koşullarda çimlenen 7-8 günlük bitkiciklerden elde edilmiş kotiledon boğum eksplantları; fitajel ile katılaştırılmış 2,5 mg/l Kinetin içeren MS ön muamele ortamında kültüre alınarak 10 gün boyunca 4 kırmızı:1 mavi LED ışık kombinasyonunda ön muamele uygulanmıştır. Daha sonra eksplantlar 0,05-0,80 mg/l Kinetin içeren ve fitajel ile katılaştırılmış MS ortamında kültüre alınarak; 4 kırmızı:1 mavi ışık kombinasyonunda gözleme tabi tutulmuştur. 2-3 hafta içinde tüm

eksplantlarda sürgün rejenerasyonu gözlenirken; kallus oluşumu üçüncü hafta sonrasında gözlenmiştir. Sekiz hafta sonra (Şekil 5.3.) kallus oluşum oranı, sürgün rejenerasyon oranı ve eksplant başına sürgün sayısı sonuçları için varyans analizi yapılmıştır (Çizelge 5.7.).



Şekil 5.3. GSN-12 çeşinde kinetin ile ön muamele uygulanmış kotiledon boğum eksplantında sürgün rejenerasyonu

Çizelge 5.7. GSN-12 çeşidinde farklı Kinetin konsantrasyonlarının sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi

VK	SD	Kallus oluşumu (%)		Sürgün Rejenerasyonu (%)		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)	
		KO	F	KO	F	KO	F
Kinetin	5	360,00	4,11 **	1640,00	18,74 **	2,15	3,52 **
Hata	12	87,50	-	87,50	-	0,61	-
Genel Toplam	17	-	-	-	-	-	-

**p<0,01 düzeyinde önemli

Çizelge 5.7. incelendiğinde farklı oranlarda TDZ içeren ortamlarda kotiledon boğum eksplantlarında kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyon yüzdesi ile eksplant başına sürgün sayısı için p<0,01 düzeyinde önemli olduğu tespit edilmiştir. Bu farklılıkların önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 5.8.'de verilmiştir.

Çizelge 5.8. GSN-12 çeşidinde farklı Kinetin konsantrasyonlarının sürgün rejenerasyonuna etkisi

Kinetin (mg/l)	Kallus Oluşumu (%)	Sürgün rejenerasyonu (%)	Eksplant başına sürgün sayısı(adet)	Petri başına toplam sürgün sayısı (adet)
0,00	20,00 ^{a**}	100,00 ^{a**}	3,00 ^{b**}	10,00
0,05	20,00 ^a	80,00 ^b	3,75 ^{ab}	11,00
0,10	0,00 ^b	40,00 ^c	4,00 ^{ab}	15,00
0,20	0,00 ^b	100,00 ^a	5,00 ^a	15,00
0,40	20,00 ^a	100,00 ^a	5,20 ^a	19,00
0,80	0,00 ^b	80,00 ^b	4,75 ^a	14,33

**Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında fark $p < 0,01$ düzeyinde önemlidir.

Denemede kullanılan 0,05-0,80 mg/l Kinetin içeren MS ortamlarında kotiledon boğum eksplantlarda kallus oluşum oranı %0,00-20,00 olarak kaydedilirken, sürgün rejenerasyon oranı ise %40,00-100,00 olarak tespit edilmiştir. En düşük sürgün rejenerasyon oranı (%40,00) 0,10 mg/l Kinetin içeren ortamda tespit edilmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı ise; 3,00-5,20 adet olarak tespit edilmiştir. En yüksek eksplant başına sürgün sayısı (5,20) 0,40 mg/l kinetin içeren ortamda, en düşük (3,00) ise ön muamele sonrası hiçbir hormon içermeyen ortama alınmış eksplantlarda gözlenmiştir (Çizelge 5.8.). Petri başına toplam sürgün sayısı ise 10,00-19,00 adet olarak elde edilmiştir. En yüksek petri başına toplam sürgün sayısı 0,40 mg/l kinetin içeren ortamda elde edilmiştir. Kinetin konsantrasyonundaki artışın eksplant başına sürgün sayısında artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen tüm sürgünler oksin (IBA ve NAA) içeren ortamlarda köklendirildikten sonra adaptasyona alınmıştır.

5.1.5. Yüksek oranda kinetin ön muamelelerinin etkisi

In vitro koşullarda çimlenen GSN-12 çeşidine ait 7-8 günlük bitkiciklerden elde edilen kotiledon boğum eksplantları 10 ve 20 mg/l Kinetin içeren, fitajel ile katılaştırılmış MS ortamında; 4 kırmızı:1 mavi LED ışık altında 10 gün kültüre alınarak ön muamele uygulanmıştır. Bu süre sonunda aynı eksplantlar fitajel ile katılaştırılmış MS, ½ MS veya ¼ MS ortamlarında; 4 kırmızı:1 mavi LED ışık altında kültüre bırakılarak gözleme

alınmıştır. Eksplantlarda iki hafta içinde sürgün rejenerasyonu gözlenmiştir. Ancak kallus oluşumu kültür süresince hiç gözlenmemiştir. Sekiz hafta sonra sürgün rejenerasyon oranı ve eksplant başına sürgün sayısı sonuçları kaydedilmiş, tüm eksplantlarda sürgün rejenerasyonu %100,00 olduğu için sadece eksplant başına sürgün sayısı için varyans analizi yapılmıştır (Çizelge 5.9.).

Çizelge 5.9. GSN-12 çeşidinde farklı dozlarda Kinetin ön muamelesinin sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi

VK	SD	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)	
		KO	F
Ön muamele- Ortam	5	1,08	2,82**
Hata	12	0,38	-
Genel Toplam	17	-	-

**p<0,01 düzeyinde önemli

Çizelge 5.9. incelendiğinde farklı oranlarda Kinetin içeren ortamlarda kotiledon boğum eksplantlarında eksplant başına sürgün sayısı için p<0,01 düzeyinde önemli olduğu tespit edilmiştir. Bu farklılıkların önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 5.10.'da verilmiştir.

Çizelge 5.10. GSN-12 çeşidine ait eksplantlarda yüksek oranlarda Kinetin ön muamelesi ve MS ortamı dozlarının eksplant başına sürgün sayısı üzerine etkisi

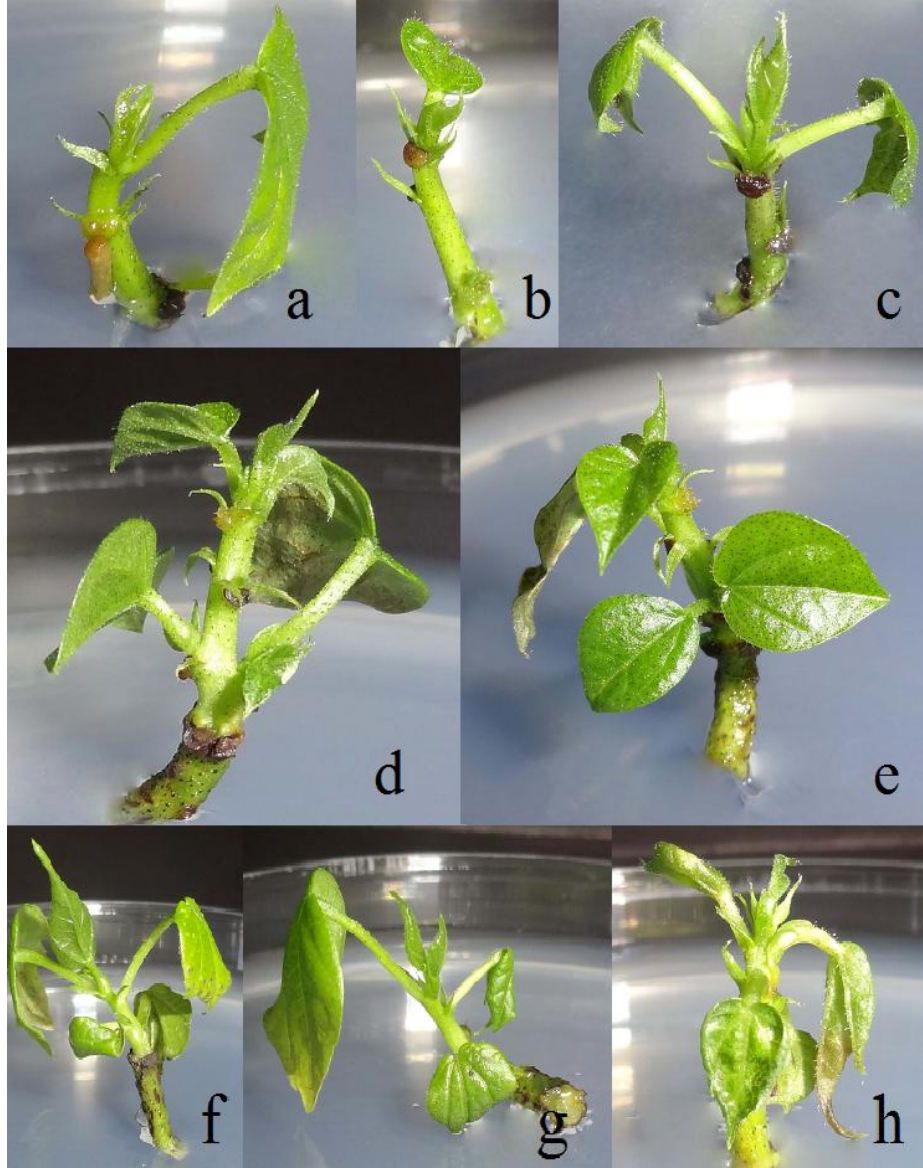
Ön Muamele Kinetin(mg/l)	Ortam	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	Petri başına toplam sürgün sayısı (adet)
10,00	¼MS	2,20 ^{b**}	7,00
	½MS	3,00 ^{ab}	10,00
	MS	3,25 ^{ab}	11,25
20,00	¼MS	2,80 ^{ab}	7,00
	½MS	4,00 ^a	14,00
	MS	3,33 ^{ab}	10,00

**Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında fark p<0,01 düzeyinde önemlidir.

Denemede 10-20 mg/l Kinetin ön muamelesi sonrası MS, ½MS, ¼MS ortamlarında kültüre alınan kotiledon eksplantlarda eksplant başına sürgün sayısı; 2,20-4,00 adet olarak tespit edilmiştir. En yüksek eksplant başına sürgün sayısı (4,00) 20 mg/l Kinetin ön muamelesi sonrası ½MS ortamına aktarılan eksplantlarda elde edilmiştir. En düşük (2,20) ise 10 mg/l Kinetin ön muamelesi sonrası ¼MS ortamına aktarılan eksplantlarda gözlenmiştir (Çizelge 5.10.). Petri başına toplam sürgün sayısı 7,00-14,00 adet olarak tespit edilmiştir. En yüksek petri başına toplam sürgün sayısı (14,00) 20 mg/l kinetin ön muamelesi sonrası ½ MS ortamı içeren petrielerde gözlenmiştir. Çizelge 5.10. incelendiğinde 20 mg/l kinetin ön muamelesinde, 10 mg/l kinetine göre daha fazla eksplant başına sürgün sayısı tespit edilmiştir. Ön muamele sonrası kültürü bakıldığında en düşük sürgün sayısı ¼ MS ortamda kaydedilmiştir. Meydana gelen tüm sürgünler oksin (IBA ve NAA) içeren ortamlarda köklendirildikten sonra adaptasyona alınmıştır.

5.1.6. Yüksek oranda kinetin ön muamelesi ve LED ışığın etkisi

GSN-12 pamuk çeşidine ait *in vitro* koşullarda çimlenen 7-8 günlük bitkiciklerden elde edilmiş kotiledon boğum eksplantları 5, 10 ve 20 mg/l Kinetin içeren fitajel ile katılaştırılmış MS ortamında ön muamele için 4 kırmızı:1 mavi LED ışık kombinasyonunda 10 gün bırakılmıştır. Daha sonra fitajel ile katılaştırılmış 4 farklı ortamda (MS, ½MS, ¼MS ve 0,05 mg/l kinetin içeren MS) kültüre alınmıştır. Ayrıca, deneme 4 kırmızı:1 mavi, 3 kırmızı:1 mavi ve 2 kırmızı:1 mavi ışık kombinasyonlarında bırakılarak, gözleme tabi tutulmuştur. 2-3 hafta içinde tüm eksplantlarda sürgün rejenerasyonu gözlenirken; hiçbir eksplantta kültür süresi boyunca kallus oluşumu gözlenmemiştir. Sekiz hafta sonra (Şekil 5.4.) sürgün rejenerasyon yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısı sonuçları incelenmiş olup, tüm eksplantlarda sürgün rejenerasyonu kaydedilmiştir. Eksplant başına sürgün sayısında ön muamele uygulaması, farklı ortam tipleri ve ışık kombinasyonları için varyans analizi yapılmıştır (Çizelge 5.11.)



Şekil 5.4. GSN-12 çeşidine ait kotiledon boğum eksplantlarda farklı dozlarda kinetin ön muamelesi, farklı ortam dozları ve farklı ışık kombinasyonlarında 8 hafta sonra sürgün rejenerasyonu (a) 5 mg/l kinetin ön muamelesi sonrası MS ortamında kültüre alınmış, 4 kırmızı:1 mavi ışık altında bırakılmış eksplant (b) 10 mg/l kinetin ön muamelesi sonrası MS ortamında kültüre alınmış, 4 kırmızı:1 mavi ışık altında bırakılmış eksplant (c) 5 mg/l kinetin ön muamelesi sonrası MS ortamında kültüre alınmış, 3 kırmızı:1 mavi ışık altında bırakılmış eksplant (d,e) 5 mg/l kinetin ön muamelesi sonrası $\frac{1}{2}$ MS ortamında kültüre alınmış, 4 kırmızı:1 mavi ışık altında bırakılmış eksplant (f) 10 mg/l kinetin ön muamelesi sonrası $\frac{1}{2}$ MS ortamında kültüre alınmış, 3 kırmızı:1 mavi ışık altında bırakılmış eksplant (g) 20 mg/l kinetin ön muamelesi sonrası $\frac{1}{2}$ MS ortamında kültüre alınmış, 4 kırmızı:1 mavi ışık altında bırakılmış eksplant (h) 10 mg/l kinetin ön muamelesi sonrası $\frac{1}{4}$ MS ortamında kültüre alınmış, 4 kırmızı:1 mavi ışık altında bırakılmış eksplant

Çizelge 5.11. GSN-12 çeşidine ait eksplantlarda farklı kinetin ön muamelesi ve farklı ışık kombinasyonlarının eksplant başına sürgün sayısına ait varyans analizi

VK	SD	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	
		KO	F
Ön muamele	2	19,17	95,30**
Ortam	3	0,61	3,05**
Işık	2	25,52	126,91**
Ön muamele-Ortam	6	2,27	11,29**
Ön muamele-Işık	4	1,05	5,21**
Ortam-Işık	6	0,89	4,42**
Ön muamele-Ortam-Işık	12	1,71	8,50**
Hata	72	0,20	-
Genel Toplam	107	-	-

**p<0,01 düzeyinde önemli

Çizelge 5.11. incelendiğinde farklı oranlarda TDZ içeren ortamlarda kotiledon boğum eksplantlarında eksplant başına sürgün sayısı için p<0,01 düzeyinde önemli olduğu tespit edilmiştir. Bu farklılıkların önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 5.12.'de verilmiştir.

Çizelge 5.12. GSN-12 çeşidine ait eksplantlarda farklı dozlarda Kinetin ön muamelesi, MS ortamı dozları ve ışık kombinasyonlarının eksplant başına sürgün sayısı üzerine etkisine ait varyans analizi

Işık	Ön muamele-Kinetin (mg/l)											
	5				10				20			
	Ortam				Ortam				Ortam			
	MS	½MS	¼MS	MS+ 0,05 mg/l Kinetin	MS	½MS	¼MS	MS+ 0,05 mg/l Kinetin	MS	½MS	¼MS	MS+ 0,05 mg/l Kinetin
4 Kırmızı: 1 Mavi LED ışıkları	5,75 ^{a**}	6,75 ^{a**}	7,75 ^{a**}	5,75 ^{a**}	6,50 ^{a**}	6,50 ^{a**}	5,75 ^{a**}	7,50 ^{a**}	4,75 ^{a**}	5,00 ^{a**}	4,00 ^{a**}	5,50 ^{a**}
3 Kırmızı: 1 Mavi LED ışıkları	4,75 ^{c**}	5,00 ^b	4,25 ^b	3,75 ^{bc}	4,50 ^b	5,75 ^b	5,25 ^b	4,75 ^c	4,33 ^{ab}	3,50 ^c	4,25 ^a	3,50 ^b
2 Kırmızı: 1 Mavi LED ışıkları	5,25 ^{b**}	5,00 ^b	4,25 ^b	4,20 ^b	4,75 ^b	5,00 ^c	4,00 ^c	6,75 ^b	4,00 ^b	4,25 ^b	4,00 ^a	3,00 ^c

**Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında fark $p < 0,01$ düzeyinde önemlidir.

Denemede eksplantlar 5,10 ve 20 mg/l Kinetin ön muamelesi sonrası MS, ½MS, ¼MS ve 0,05 mg/l Kinetin içeren MS ortamlarında kültüre alınmıştır. Sonrasında üç farklı ışık kombinasyonundada (4 kırmızı:1 mavi, 3 kırmızı:1 mavi, 2 kırmızı:1 mavi) bırakılan kotiledon boğum eksplantlarında eksplant başına sürgün sayısı; 3,00-7,75 adet olarak tespit edilmiştir. En yüksek eksplant başına sürgün sayısı (7,75) 5 mg/l Kinetin ön muamelesi sonrası ¼MS ortamına aktarılan ve 4 kırmızı:1 mavi ışık kombinasyonuna bırakılan eksplantlarda gözlenmiştir. En düşük (3,00) ise 20 mg/l Kinetin ön muamelesi sonrası 0,05 mg/l Kinetin içeren MS ortamına aktarılan ve 2 kırmızı:1 mavi ışık kombinasyonuna bırakılan eksplantlarda gözlenmiştir (Çizelge 5.12.). Genel olarak, 20 mg/l kinetin ile ön muamele görmüş eksplantlardan diğer ön muameleye göre daha az miktarda eksplant başına sürgün sayısı kaydedilmiştir. Işıkları kıyaslandığında tüm MS ortamları ve ön muamele sonucunda 4:1 kırmızı:mavi LED ışıkları diğer kombinasyona göre daha iyi olduğu tespit edilmiştir. Çizelge incelendiğinde 10 mg/l kinetin ön muamelesinin eksplant başına sürgün sayısında artışa neden olduğu tespit edilirken; en iyi sonuçların 4 kırmızı:1 mavi ışık kombinasyonunda elde edildiği görülmüştür. Meydana gelen tüm sürgünler oksin (IBA ve NAA) içeren ortamlarda köklendirildikten sonra adaptasyona alınmıştır.

5.2. STN-468 Çeşidinde *In Vitro* Sürgün Rejenerasyonu

5.2.1. TDZ ve farklı LED ışık uygulamasının etkisi

STN-468 pamuk çeşidine ait *in vitro* koşullarda çimlenen 7-8 günlük bitkiciklerden elde edilmiş kotiledon boğum eksplantları 0,05-0,40 mg/l TDZ içeren ve fitajel ile katılaştırılmış MS ortamına aktarılmış olup 4 kırmızı:1 mavi ve 3 kırmızı:1 mavi ışık kombinasyonlarında gözleme tabi tutulmuştur. 2-3 hafta içinde tüm eksplantlarda kallus ve sürgün rejenerasyonu gözlenmiştir. Sekiz hafta sonra (Şekil 5.5.) kallus oluşum oranı, sürgün rejenerasyon oranı ve eksplant başına sürgün sayısı sonuçları kaydedilmiştir. Sürgün rejenerasyon yüzdesi tüm eksplantlar için %100,00 olduğu için varyans analizine tabi tutulmamıştır. Farklı TDZ konsantrasyonları ve ışık kombinasyonlarının kallus oluşum yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısında etkisi için varyans analizi yapılmıştır (Çizelge 5.13.).



Şekil 5.5. Farklı TDZ konsantrasyonları ve LED ışık kombinasyonlarının STN-468 çeşidinin kotiledon boğum eksplantında sürgün rejenerasyonu

Çizelge 5.13. Farklı TDZ konsantrasyonları ve ışık kombinasyonlarında STN-468 çeşidinde sürgün rejenerasyonu ait varyans analizi

VK	SD	Kallus oluşumu (%)		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)	
		KO	F	KO	F
TDZ-Işık	9	541,67	171,96**	0,71	9,86**
Hata	20	3,15	-	0,07	-
Genel Toplam	29	-	-	-	-

**p<0,01 düzeyinde önemli

Çizelge 5.13. incelendiğinde farklı oranlarda TDZ içeren ortamlarda ve LED ışıklarında kotiledon boğum eksplantlarında kallus oluşum oranı ve eksplant başına sürgün sayısı p<0,01 düzeyinde önemli olduğu tespit edilmiştir. Bu farklılıkların önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 5.14.'de verilmiştir.

Çizelge 5.14. Farklı TDZ konsantrasyonları ve LED Işık kombinasyonlarının STN-468 çeşidinde sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi

Işık	TDZ (mg/l)	Kallus oluşumu (%)	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	Petri başına toplam sürgün sayısı (adet)
4 kırmızı:1mavi LED ışıkları	0,05	37,5 ^{a**}	2,48 ^{a**}	7,50
	0,10	0,00 ^d	2,50 ^a	7,00
	0,20	25,00 ^b	2,50 ^a	7,33
	0,30	0,00 ^d	1,67 ^{bc}	5,00
	0,40	0,00 ^d	1,33 ^c	4,00
3 kırmızı:1mavi LED ışıkları	0,05	0,00 ^d	1,50 ^{bc}	5,00
	0,10	0,00 ^d	1,50 ^{bc}	5,00
	0,20	0,00 ^d	1,67 ^{bc}	5,33
	0,30	12,50 ^c	2,00 ^b	6,00
	0,40	0,00 ^d	1,33 ^c	4,50

**Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında fark $p < 0,01$ düzeyinde önemlidir.

Denemede kullanılan 0,05-0,40 mg/l TDZ içeren MS ortamlarında kotiledon boğum eksplantlarda kallus oluşum oranı %0,00-37,50 olarak kaydedilmiştir (Çizelge 5.14.). 4 kırmızı:1 mavi ışık altında tutulan eksplantlarda en yüksek kallus oluşum oranı (%37,50) 0,05 mg/l TDZ içeren ortamda gözlenirken; 0,10 mg/l, 0,30 mg/l ve 0,40 mg/l kinetin içeren ortamlarda kallus oluşumu gözlenmemiştir. Buna rağmen 3 kırmızı:1 mavi ışık altında bırakılan eksplantlarda ise sadece 0,30 mg/l TDZ içeren ortamlarda %12,50 kallus oluşum oranı gözlenirken; diğer tüm ortamlarda kallus oluşumu gözlenmemiştir. Eksplant başına sürgün sayısı ise; 1,33-2,50 adet olarak tespit edilmiştir. En yüksek eksplant başına sürgün sayısı (2,00) 0,10 mg/l ve 0,20 mg/l TDZ içeren ortamda, 4 kırmızı:1 mavi ışık altında bırakılan eksplantlarda kaydedilmiştir. En düşük eksplant başına sürgün sayısı (1,33) ise her iki ışık kombinasyonunda da bırakılan eksplantlarda 0,40 mg/l TDZ içeren ortamda gözlenmiştir (Çizelge 5.14.). Petri başına toplam sürgün sayısı 4,00-7,50 adet

olarak tespit edilmiştir. En yüksek petri başına toplam sürgün sayısı; 4 kırmızı:1 mavi ışık kombinasyonunda ve 0,05 mg/l TDZ içeren petrielerde elde edilmiştir. 3 kırmızı:1 mavi ışık için ise 0,30 mg/l TDZ içeren ortamda en yüksek petri başına toplam sürgün sayısı elde edilmiştir. TDZ konsantrasyonundaki artışın kallus oluşum oranı, sürgün rejenerasyon oranı, eksplant başına sürgün sayısı ve petri başına toplam sürgün sayısı üzerinde herhangi bir değişime sebep olduğuna rastlanmazken; sadece ortamlarda 0,40 mg/l TDZ varlığının bitkiler için zararlı bir etki oluşturabileceği gözlenmiştir. Ayrıca 4 kırmızı:1 mavi ışık kombinasyonunda kullanılan tüm TDZ oranlarında; 3 kırmızı:1 mavi ışık kombinasyonuna göre daha fazla eksplant başına sürgün sayısı kaydedilmiştir. Meydana gelen tüm sürgünler oksin (IBA ve NAA) içeren ortamlarda köklendirildikten sonra adaptasyona alınmıştır.

5.2.2. STN-468 çeşidinde farklı TDZ-IBA ve beyaz LED ışık uygulamasının etkisi

Bu denemede STN-468 çeşidine ait 13-15 günlük kotiledon boğum eksplantları kullanılmıştır. Eksplantlar fitajel ile katılaştırılmış; 0,05-0,40 mg/l TDZ ile 0,10 mg/l IBA içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Rejenerasyon elde etmek için iklim odasında beyaz LED (Light Emitting Diode) ışık altına yerleştirilen eksplantlar gözleme alınmıştır. İkinci hafta içerisinde sürgün ve kallus oluşumları başlayan eksplantlarda dokuz hafta sonra elde edilen veriler kullanılarak yapılan varyans analizi sonuçları Çizelge 5.15’de verilmiştir.

Çizelge 5.15. STN-468 çeşidinde farklı TDZ-IBA konsantrasyonları ve beyaz LED ışığın sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi

VK	SD	Kallus oluşumu (%)		Sürgün Rejenerasyonu (%)		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)	
		KO	F	KO	F	KO	F
TDZ-IBA	4	2429,91	19,19**	843,75	32,14**	2,63	10,42**
Hata	10	126,64	-	26,25	-	0,25	-
Genel Toplam	14	-	-	-	-	-	-

**p<0,01 düzeyinde önemli

Çizelge 5.15. incelendiğinde farklı oranlarda TDZ içeren ortamlarda kotiledon boğum eksplantlarında kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyon yüzdesi ile eksplant başına sürgün sayısı için $p<0,01$ düzeyinde önemli olduğu tespit edilmiştir. Bu farklılıkların önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 5.16.'da verilmiştir.

Çizelge 5.16. STN-468 çeşidinde farklı TDZ-IBA konsantrasyonları ve beyaz LED ışığın sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi

TDZ (mg/l)	IBA (mg/l)	Kallus oluşumu (%)	Sürgün Rejenerasyonu (%)	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	Petri başına toplam sürgün sayısı (adet)
0,05	0,10	37,70 ^{b**}	25,00 ^{b**}	2,00 ^{a**}	6,00
0,10	0,10	12,50 ^c	25,00 ^b	1,50 ^a	4,33
0,20	0,10	75,00 ^a	37,50 ^a	1,50 ^a	6,00
0,30	0,10	62,50 ^a	0,00 ^c	0,00 ^b	0,00
0,40	0,10	12,50 ^c	0,00 ^c	0,00 ^b	0,00

**Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında fark $p<0,01$ düzeyinde önemlidir.

Denemede kullanılan 0,05-0,40 mg/l TDZ ve 0,10 mg/l IBA içeren MS ortamlarda kotiledon eksplantlarda kallus oluşum oranı %12,50-75,00 olarak kaydedilmiştir. Kallus oluşum oranı en yüksek (%75,00) 0,20 mg/l TDZ+0,10 mg/l IBA içeren ortamda gözlenmiştir. En düşük kallus oluşum oranı (%12,50) ise iki farklı ortamda (0,10 mg/l TDZ+0,10 mg/l IBA içeren, 0,40 mg/l TDZ+0,10 mg/l IBA içeren) gözlenmiştir. Sürgün rejenerasyon oranı ise %0,00-37,50 olarak kaydedilmiştir. En yüksek sürgün rejenerasyon oranı (%37,50) 0,20 mg/l TDZ+0,10 mg/l IBA içeren ortamda gözlenirken; iki farklı ortamda (0,30 mg/l TDZ+0,10 mg/l IBA ve 0,40 mg/l TDZ+0,10 mg/l IBA içeren) sürgün rejenerasyonu tespit edilmemiştir. Eksplant başına sürgün sayısı 0,00-2,00 adet olarak gözlenirken; en yüksek eksplant başına sürgün sayısı (2,00) 0,05 mg/l TDZ+0,10 mg/l IBA içeren ortamda elde edilmiştir (Çizelge 5.16.). Petri başına toplam sürgün sayısı 0,00-6,00 adet olarak tespit edilmiştir. En yüksek sonuç (6,00 adet) 0,05 mg/l TDZ ve 0,10 mg/l IBA içeren ortamda elde edilmiştir. TDZ konsantrasyonundaki artış ve IBA ilavesi ile kallus oluşum oranı ve sürgün rejenerasyon oranı arasında bir ilişki gözlenmezken; eksplant

başına sürgün sayısında ise azalma tespit edilmiştir. Meydana gelen tüm sürgünler oksin (IBA ve NAA) içeren ortamlarda köklendirildikten sonra adaptasyona alınmıştır.

5.2.3. STN-468 çeşidinde yüksek oranda kinetin ön muamelelerinin etkisi

In vitro koşullarda çimlenen STN-468 çeşidine ait 7-8 günlük bitkiciklerden elde edilen kotiledon boğum eksplantları 10 ve 20 mg/l Kinetin içeren, fitajel ile katılaştırılmış MS ortamında; 4 kırmızı:1 mavi LED ışık altında 10 gün kültüre alınarak ön muamele uygulanmıştır. Bu süre sonunda aynı eksplantlar fitajel ile katılaştırılmış MS, ½MS, ¼MS ortamlarında; 4 kırmızı:1 mavi LED ışık altında kültüre bırakılarak gözleme alınmıştır. Eksplantlarda iki hafta içinde sürgün rejenerasyonu gözlenmiştir. Ancak kallus oluşumu kültür süresince hiç gözlenmemiştir. Sekiz hafta sonra sürgün rejenerasyon oranı ve eksplant başına sürgün sayısı sonuçları kaydedilmiştir. Tüm eksplantlarda sürgün rejenerasyonu gözlendiği için varyans analizi yapılmazken, eksplant başına sürgün sayısı için varyans analizi yapılmıştır (Çizelge 5.17.).

Çizelge 5.17. STN-468 çeşidinde farklı Kinetin konsantrasyonlarının sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi

VK	SD	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)	
		KO	F
Ön muamele- Ortam	5	3,67	19,36**
Hata	12	0,19	-
Genel Toplam	17	-	-

**p<0,01 düzeyinde önemli

Çizelge 5.17. incelendiğinde farklı oranlarda TDZ içeren ortamlarda kotiledon boğum eksplantlarında eksplant başına sürgün sayısı için p<0,01 düzeyinde önemli olduğu tespit edilmiştir. Bu farklılıkların önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 5.18.'de verilmiştir.

Çizelge 5.18. STN-468 çeşidine ait eksplantlarda yüksek oranlarda Kinetin ön muamelesi ve MS ortamı dozlarının eksplant başına sürgün sayısı üzerine etkisi

Ön Muamele Kinetin(mg/l)	Ortam	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	Petri başına toplam sürgün sayısı (adet)
10,00	¼MS	3,33 ^{de**}	10,00
	½MS	5,66 ^a	17,00
	MS	3,66 ^{cd}	11,00
20,00	¼MS	2,66 ^e	8,00
	½MS	4,33 ^{bc}	13,00
	MS	5,00 ^{ab}	15,33

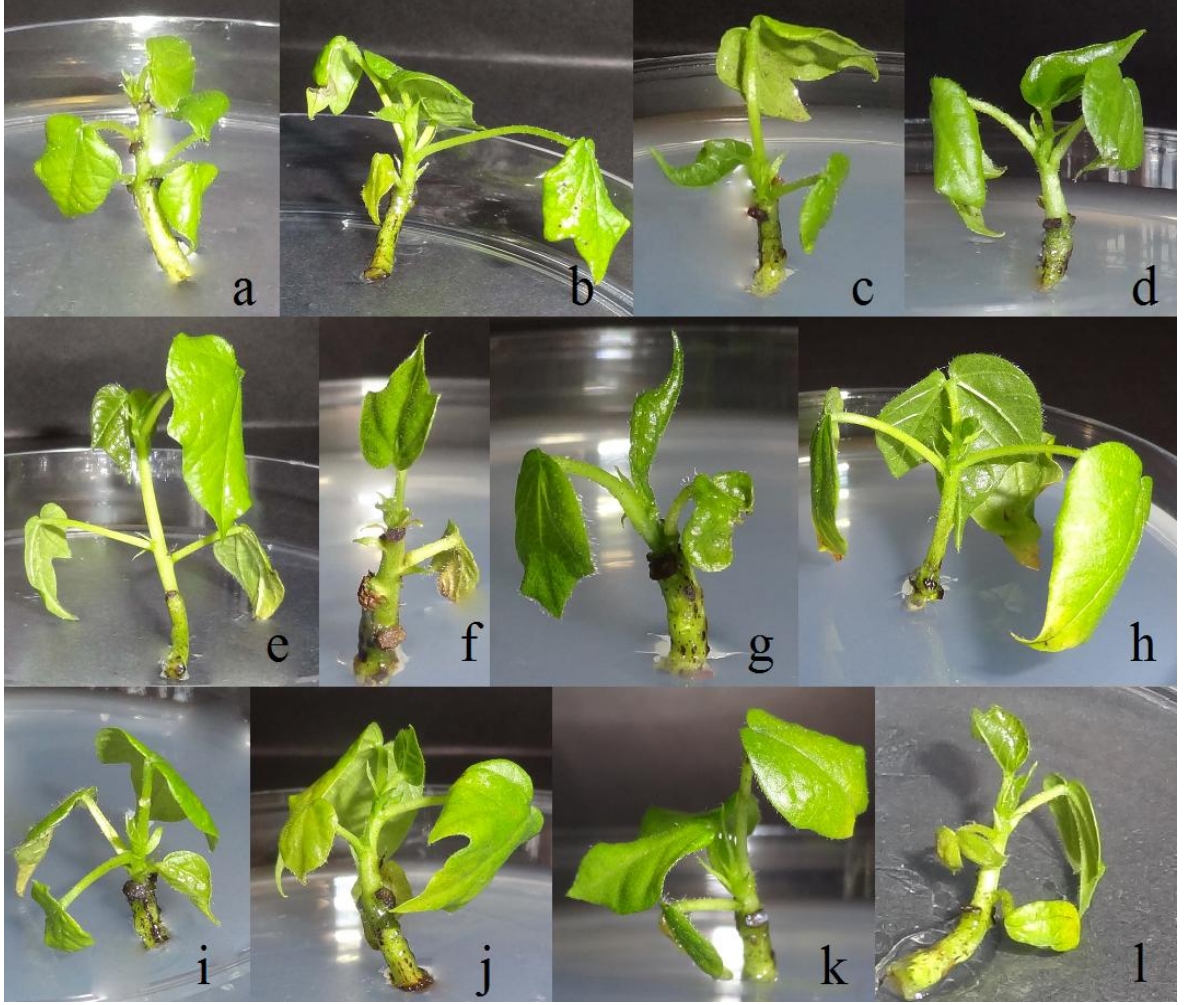
**Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında fark $p<0,01$ düzeyinde önemlidir.

Denemede 10-20 mg/l Kinetin ön muamelesi sonrası MS, ½MS, ¼MS ortamlarında kültüre alınan kotiledon eksplantlarda eksplant başına sürgün sayısı; 2,66-5,66 adet olarak tespit edilmiştir. En yüksek eksplant başına sürgün sayısı (5,66) 10 mg/l Kinetin ön muamelesi sonrası ½MS ortamına aktarılan eksplantlarda, en düşük (2,66) ise 20 mg/l Kinetin ön muamelesi sonrası ¼MS ortamına aktarılan eksplantlarda gözlenmiştir (Çizelge 5.18.). Petri başına toplam sürgün sayısı 8,00-17,00 adet olarak tespit edilmiştir. En yüksek petri başına toplam sürgün sayısı 10 mg/l kinetin ön muamelesi sonrası ½MS ortamında elde edilmiştir. Çizelge incelendiğinde; en iyi sonuçların ½MS ortamlarında elde edildiği görülmüştür. Meydana gelen tüm sürgünler oksin (IBA ve NAA) içeren ortamlarda köklendirildikten sonra adaptasyona alınmıştır.

5.2.4. STN-468 çeşidinde yüksek oranda kinetin ön muamelesi ve LED ışığın etkisi

STN-468 pamuk çeşidine ait *in vitro* koşullarda çimlenen 7-8 günlük bitkiciklerden elde edilmiş kotiledon boğum eksplantları 5, 10 ve 20 mg/l Kinetin içeren, fitajel ile katılaştırılmış MS ortamlarda ön muamele uygulanmıştır. Tüm eksplantlar 4 kırmızı:1 mavi ışık kombinasyonunda 10 gün için bırakılmıştır. Daha sonra fitajel ile katılaştırılmış 4 farklı ortamda (MS, ½MS, ¼MS ve 0,05 mg/l kinetin içeren MS) kültüre alınmış ve farklı ışık kombinasyonlarında (4 kırmızı:1 mavi, 3 kırmızı:1 mavi ve 2 kırmızı:1 mavi)

bırakılarak, gözleme tabi tutulmuştur. 2-3 hafta içinde tüm eksplantlarda sürgün rejenerasyonu gözlenirken; hiçbir eksplantta sekiz hafta boyunca kallus oluşumu gözlenmemiştir. Sekiz hafta sonra (Şekil 5.6.) sürgün rejenerasyon yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısı sonuçları incelenmiştir. Sürgün rejenerasyon yüzdesi %100,00 olduğu için varyans analizine tutulmazken; eksplant başına sürgün sayısı için varyans analizi yapılmıştır (Çizelge 5.19.).



Şekil 5.6. STN-468 çeşidine ait kotiledon boğum eksplantlarda farklı dozlarda kinetin ön muamelesi, farklı ortam dozları ve farklı ışık kombinasyonlarında 8 hafta sonra elde edilen sürgünler (a) 10 mg/l kinetin ön muamelesi sonrası MS ortamında kültüre alınmış, 4 kırmızı:1 mavi ışık altında bırakılmış eksplant (b) 10 mg/l kinetin ön muamelesi sonrası $\frac{1}{4}$ MS ortamında kültüre alınmış, 4 kırmızı:1 mavi ışık altında bırakılmış eksplant (c) 10 mg/l kinetin ön muamelesi sonrası MS ortamında kültüre alınmış, 2 kırmızı:1 mavi ışık altında bırakılmış eksplant (d) 20 mg/l kinetin ön muamelesi sonrası $\frac{1}{2}$ MS ortamında kültüre alınmış, 4 kırmızı:1 mavi ışık altında bırakılmış eksplant (e) 20 mg/l kinetin ön muamelesi sonrası $\frac{1}{2}$ MS ortamında kültüre alınmış, 3 kırmızı:1 mavi ışık altında bırakılmış eksplant (f) 20 mg/l kinetin ön muamelesi sonrası $\frac{1}{2}$ MS ortamında kültüre alınmış, 4 kırmızı:1 mavi ışık altında bırakılmış eksplant (g) 5 mg/l kinetin ön muamelesi sonrası $\frac{1}{4}$ MS ortamında kültüre alınmış, 4 kırmızı:1 mavi ışık altında bırakılmış eksplant (h) 5 mg/l kinetin ön muamelesi sonrası $\frac{1}{2}$ MS ortamında kültüre alınmış, 4 kırmızı:1 mavi ışık altında bırakılmış eksplant (i) 10 mg/l kinetin ön muamelesi sonrası 0,05 mg/l kinetin içeren MS ortamında kültüre alınmış, 4 kırmızı:1 mavi ışık altında bırakılmış eksplant (j) 10 mg/l kinetin ön muamelesi sonrası $\frac{1}{2}$ MS ortamında kültüre alınmış, 2 kırmızı:1 mavi ışık altında bırakılmış eksplant (k) 10 mg/l kinetin ön muamelesi sonrası 0,05 mg/l kinetin içeren MS ortamında kültüre alınmış, 4 kırmızı:1 mavi ışık altında bırakılmış eksplant (l) 10 mg/l kinetin ön muamelesi sonrası MS ortamında kültüre alınmış, 4 kırmızı:1 mavi ışık altında bırakılmış eksplant

Çizelge 5.19. STN-468 çeşidinde Farklı ön muamele, MS ortamı ve ışık kombinasyonlarının sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi

VK	SD	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	
		KO	F
Ön muamele	2	2,50	5,28**
Ortam	3	8,24	17,39**
Işık	2	10,32	21,80**
Ön muamele-Ortam	6	4,21	8,90**
Ön muamele-Işık	4	0,81	1,71*
Ortam-Işık	6	1,28	2,71**
Ön muamele-Ortam-Işık	12	2,79	5,90**
Hata	72	0,47	-
Genel Toplam	107	-	-

**p<0,01 düzeyinde önemli

*p<0,05 düzeyinde önemli

Çizelge 5.19. incelendiğinde farklı oranlarda TDZ içeren ortamlarda kotiledon boğum eksplantlarında eksplant başına sürgün sayısı için ön muamele-ışık varyasyon kaynağı p<0,05 düzeyinde önemli iken; diğer tüm kaynakların p<0,01 düzeyinde önemli olduğu tespit edilmiştir. Bu farklılıkların önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 5.20’de verilmiştir.

Çizelge 5.20. STN-468 çeşidine ait eksplantlarda farklı dozlarda Kinetin ön muamelesi ve MS ortamı dozları ve ışık kombinasyonlarının eksplant başına sürgün sayısı üzerine etkisine ait varyans analizi

Işık	Ön muamele-Kinetin (mg/l)											
	5				10				20			
	Ortam				Ortam				Ortam			
	MS	½MS	¼MS	MS+ 0,05 mg/l Kinetin	MS	½MS	¼MS	MS+ 0,05 mg/l Kinetin	MS	½MS	¼MS	MS+ 0,05 mg/l Kinetin
4 Kırmızı: 1 Mavi LED ışıkları	5,00 ^{a**}	2,75 ^{b**}	5,00 ^{a**}	3,75 ^{a**}	2,50 ^{b**}	5,50 ^{a**}	4,75 ^{a**}	2,75 ^{b**}	3,50 ^{a**}	4,50 ^{a**}	5,67 ^{a**}	5,50 ^{a**}
3 Kırmızı: 1 Mavi LED ışıkları	4,25 ^{b**}	5,00 ^a	4,50 ^b	3,50 ^a	2,25 ^b	4,25 ^b	4,75 ^a	6,00 ^a	3,00 ^b	4,00 ^c	4,75 ^b	5,33 ^a
2 Kırmızı: 1 Mavi LED ışıkları	3,00 ^{c**}	2,75 ^b	4,00 ^c	3,00 ^b	3,00 ^a	2,50 ^c	4,00 ^b	3,00 ^c	2,50 ^c	4,25 ^b	3,25 ^c	5,00 ^b

** Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında fark $p < 0,01$ düzeyinde önemlidir.

Denemede 5,10 ve 20 mg/l Kinetin ön muamelesi sonrası MS, ½MS, ¼MS ve 0,05 mg/l Kinetin içeren MS ortamlarında ve üç farklı ışık kombinasyonunda (4 kırmızı:1 mavi, 3 kırmızı:1 mavi, 2 kırmızı:1 mavi) bırakılan kotiledon boğum eksplantlarında eksplant başına sürgün sayısı; 2,25-6,00 adet olarak tespit edilmiştir. En yüksek eksplant başına sürgün sayısı (6,00) 10 mg/l Kinetin ön muamelesi sonrası 0,05 mg/l Kinetin içeren MS ortamına aktarılan ve 3 kırmızı:1 mavi ışık kombinasyonuna bırakılan eksplantlarda elde edilmiştir. En düşük eksplant başına sürgün sayısı (2,25) ise 10 mg/l Kinetin ön muamelesi sonrası MS ortamına aktarılan ve 3 kırmızı:1 mavi ışık kombinasyonuna bırakılan eksplantlarda gözlenmiştir (Çizelge 5.20.). Çizelge incelendiğinde en iyi sonuçların 4 kırmızı:1 mavi ışık kombinasyonunda elde edildiği görülmüştür. Meydana gelen tüm sürgünler oksin (IBA ve NAA) içeren ortamlarda köklendirildikten sonra adaptasyona alınmıştır.

5.3. *In vitro* Köklendirme

5.3.1. Farklı IBA oranlarının kök oluşumuna etkisi

Sürgün rejenerasyonu denemelerinden elde edilen pamuk sürgünleri köklendirme için farklı dozlarda IBA (0,25, 0,50 ve 1,00 mg/l) içeren ortamlara alınmıştır. Ancak 3-5 haftalık kültür süreleri sonunda köklenme sağlanamamıştır.

5.3.2. Farklı NAA Konsantrasyonlarının Kök Oluşumuna Etkisi

Sürgün rejenerasyonu denemelerinden elde edilen *Gossypium hirsutum* sürgünleri köklendirme için farklı dozlarda NAA (0,25, 0,50 ve 1,00 mg/l) içeren ortamlara alınmıştır. İkinci hafta içerisinde kök oluşumları gözlenmiş, 4 hafta sonunda ise ancak %20,00 köklenme sağlanmıştır (Şekil 5.7.). Kök bölgesinde yoğun kararma olması sebebiyle köklenmenin önlendiği düşünülmüş eksplantlar aynı ortam içerisinde 2 haftalık periyotlarla alt kültürlemeye devam edilmiştir.



Şekil 5.7. Farklı NAA ortamlarında kök oluşumu sağlanmış bitkiler

5.3.3. NAA VE Aktif Karbon Kullanımının Kök Oluşumuna Etkisi

Kararma nedeniyle köklendirilemeyen pamuk sürgünleri köklendirme için 1 g/l aktif karbon ve 0,50 mg/l NAA içeren ortamlara alınmıştır (Şekil 5.7.). 4 hafta sonra, %50,00 oranda köklendirme gözlenirken, 8 hafta sonra bu oranı %60,00 olarak kaydedilmiştir.

5.4. *In vitro* Koşullarda Elde Edilen Sürgünlerin Dış Şartlara Adaptasyonu

In vitro köklendirilmiş bitkilerin adaptasyonu için bitkiler seçilerek öncelikle plastik kaplara aktarılıp üzeri poşetle kapatılarak beyaz floresan ışık altında bırakılmıştır. İki hafta sonra, poşetler çıkarılıp iklim odasında ve oda koşullarında (Şekil 5.8) büyüme için bırakılmıştır. Dört hafta sonra, gelişen bitkiler ise büyük saksılara (Şekil 5.9.) aktarılmıştır. 12 hafta sonra, bitkilerde meyve oluşumu görülmeye başlamıştır (Şekil 5.10.).



Şekil 5.8. Köklendirilmesi sağlanan bitkilerde adaptasyon çalışmaları (a) adaptasyon aşamasında 3-5 günlük bitki (b,c) 10-12 günlük bitkiler (poşetten çıkarılmış) (d) 2-3 haftalık bitkiler



Şekil 5.9. Adaptasyon aşamasında saksılara aktarılmış bitkiler



Şekil 5.10. Saksılara aktarılan bitkilerde tarak oluşumu (kırmızı daire içerisinde)

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. Tartışma

Pamuk farklı kullanım alanları sebebiyle tarım ve ekonomi açısından oldukça önemli bir bitkidir. Bu nedenle Dünya’da çok büyük bir yetiştirilme alanına sahiptir. Ancak pamuk tarımında; hastalıklar, zararlılar, pestisitler ve kuraklık gibi pek çok sonuçla karşılaşmaktadır. Doku kültürü yöntemiyle *in vitro* koşullarda üretilen bitkilerde ileri bitki biyoteknolojisi kullanılarak bu sorunların çözümlenmesi amaçlanmaktadır.

6.1.1. *In vitro* sterilizasyon

Türkiye’de yetiştirilen GSN-12 ve STN-468 Pamuk çeşitlerinin *in vitro* sterilizasyon için önce %1,00 H₂O₂ ile ve daha sonra %0,2’lik SDS+ %0,2’lik HgCl₂ karışımı kullanılarak başarıyla sterilizasyon sağlanmıştır. Sterilizasyondan sonra 4-5 gün içinde çimlenme başlamış olup, 7-8 gün içinde %100,00 çimlenme kaydedilmiştir. Kumar ve ark. (1998); pamuk tohumlarını öncelikle %70’lik etanol içerisinde 2 dk süreyle bekletmiş, ardından %4’lük NaClO ve %0,1’lik HgCl₂ uygulaması ile sterilizasyonu sağlamıştır [29]. Hemphill ve ark. (1998); ise pamuk tohumlarını önce Tween 20 (2 damla/100 ml) içerisinde bekletmiş, ardından yine Tween 20 (2 damla/100 ml) içeren %70’lik etanol kullanarak sterilizasyonu tamamlamıştır [40].

6.1.2. TDZ etkisi

In vitro koşullarda mikroçoğaltım çalışmalarında 3 farklı hormon (TDZ, Kinetin ve IBA) kullanılmıştır. Denemelerde her iki çeşit için TDZ tek başına veya 0.10 mg/l IBA ile birlikte kullanılmıştır. Her iki çeşit için en yüksek sürgün rejenerasyonu ve eksplant başına sürgün sayısı 0,30 mg/l TDZ içeren ortamlarda elde edilmiştir. Ouma ve ark. (2004); Delta pine 50 (DP50) çeşidinin hipokotil eksplantlarında 0.175 mg/l ve Stoneville 474 (STV474) çeşidinin hipokotil eksplantlarında ise 0,08 mg/l TDZ içeren ortamlarda sürgün rejenerasyonu sağlamıştır [40]. Yang ve ark. (2010) ise *Gossypium bickii* Prokhanov bitkisiyle yürüttükleri çalışmada kotiledon nodlarında 0,10 mg/l TDZ içeren ortamlarda en

fazla sürgün rejenerasyonunu sağlamıştır [48]. Ancak Divya ve ark. (2008); pamuk bitkisi hipokotil eksplantlarında, 2 mg/l TDZ içeren ortamları, %76 sürgün rejenerasyonu ve 10,6 adet eksplant başına sürgün sayısı ile sürgün rejenerasyonu için en uygun ortam olarak tespit etmiştir [42].

Her iki çeşitte de farklı TDZ oranları kullandığında kallus oluşumu gözlenmiştir. TDZ konsantrasyonuyla kallus oluşumu arasında belirgin bir ilişki gözlenmezken; 0,30 mg/l TDZ içeren ortamlarda kallus oluşum oranları %75 olarak tespit edilmiştir. Buna karşın, Kumari ve Meenakshi (2012); Coker 310, MCU 12 ve KC3 çeşitlerinde 3 farklı TDZ konsantrasyonunda (0.1, 0.5, 1.0 mg/l) kallus rejenerasyonu sağlayamamıştır [36]. Ayrıca TDZ içeren ortamlara, 0,10 mg/l IBA ilave edilmesinin sürgün rejenerasyonunu arttırdığı tespit edilmiştir.

6.1.3. Kinetin

Çalışmamızda en yüksek sürgün rejenerasyonu Kinetin içeren ortamlarda sağlanmıştır. GSN-12 çeşidine ait eksplantların 0,40 mg/l Kinetin içeren ortamlarında en yüksek sürgün rejenerasyonu (%100,00) ve eksplant başına sürgün sayısı (5,20) sağlanmıştır. Benzer şekilde, Pushpa ve Raveendran (2010); Coker310, MCU-5, SVPR-2 çeşitlerinde sürgün ucu eksplantlarında 0,1 mg/l kinetin içeren ortamlarda en iyi sürgün gelişimi elde ettiğini belirtmiştir [45]. Chowdhury ve ark. (2011); *Gossypium herbaceum* L. bitkisi kotiledon eksplantlarında 1 mg/l Kinetin içeren ortamlarda en yüksek kallus başına sürgün sayısını (3,02) elde etmiştir [49]. Pathi ve Tuteja (2013); *Gossypium hirsutum* L. cv Narashima bitkisinde embriyo ucu eksplantlarında 2 mg/l BAP ve 2 mg/l kinetin içeren ortamlarda çoklu sürgün rejenerasyonu sağlandığını belirtmiştir [53].

6.1.4. Kinetin Ön muamelesi

In vitro çoğaltım için ilk aşamada yüksek oranda sitokinin kullanılarak oluşturulan ön muamele uygulaması birçok bitkide rapor edilmiştir [59, 60]. Ön muamele, hem hızlı hem de çoklu sürgün oluşumu sağlar [59]. GSN-12 çeşidine ait eksplantlarda 10 mg/l Kinetin ön muamelesinin eksplant başına sürgün sayısında artışa neden olduğu tespit edilmiştir.

Kinetin ön muamelesinin domates bitkisinde gen aktarım frekansını arttırdığı tespit edilmiştir [61]. Phip ve ark. (2009) ise; *A. acutiloba* Kitagwa bitkisinde 100 ve 200 ppm kinetin ön muamelesinin çimlenmeyi arttırdığını belirtmiştir [62].

6.1.5. Ön muamele sonrası ortam

Ön muamele görmüş eksplantlar ise daha sonra ve farklı MS (MSO, ½MS, ¼MS) besin ortamına kültüre alınmıştır. En yüksek eksplant başına sürgün sayısının ½MS ortamlarında elde edildiği görülmüştür. Bu noktada mineral miktarındaki azalmanın eksplant başına sürgün sayısında artışa neden olduğu ancak ¼MS ortamındaki mineral düzeyinin ise yetersiz kaldığı düşünülmüştür. Ayrıca çalışmamızda MS ortamı fitajel kullanılarak katılaştırılmıştır. Zimmerman (1987); 6 farklı besin ortamını 2 farklı katılaştırıcı ajan kullanarak katılaştırmış; gelrite ile katılaştırılmış ortamlarda kallus oluşumunun agarla katılaştırılanlara göre daha yüksek olduğunu tespit etmiştir [63]. Agrawal ve ark. (1997); *Gossypium hirsutum* L. bitkisi Anjali-LRK 516 çeşidinde kotiledon nod eksplantlarında çoklu sürgünlerin uzaması için sıvı ortamların yanı sıra agar ile katılaştırılmış MS besin ortamı kullanmış, köklendirme için ise yarı katı ortam denemelerinde bulunulduğunu belirtmiştir [37].

6.1.6. LED ışık kaynağı

Çalışmamızda sürgün rejenerasyonu için en uygun ışık kombinasyonu 4 kırmızı:1 mavi ışık olarak tespit edilmiştir. Li ve ark. (2010); pamuk bitkisinde LED ışıkların bitki büyümesi ve morfojenezi üzerine etkisini incelemiştir. Eksplantlar 45 gün boyunca 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fotosentetik foton akısına sahip 6 farklı ışık (fluorasan lamba (F), monokromatik mavi LED (B), 3 mavi:1 kırmızı LED karışımı (B:R = 3:1, 1:1, 1:3) ve monokromatik kırmızı LED (R)) altında 12 saat fotoperiyoda bırakılmıştır. Yaş ağırlık, kuru ağırlık, kök uzunluğu ve ikinci nodlar arası uzunluğu 3 mavi:1 kırmızı ışık karışımında en iyi sonucu verirken; florasan lamba altında en düşük sonuçları verdiği belirtilmiştir. Klorofil miktarı, yaprak kalınlığı, palizat doku kalınlığı, yaprak ve stoma çapının monokromatik mavi LED altında; kök gelişimi, şeker, nişasta ve çözülmüş şeker içeriği bakımından ise kırmızı LED ışıkların en yüksek sonuçları verdiği gözlenmiştir.

Ancak çalışma sonucunda 4 kırmızı:1 mavi LED karışımının bitki gelişimi için en uygun olduğu saptanmıştır [20].

6.1.7. Köklendirme

Köklendirme için ise: Hemphill ve ark. (1998); Stoneville 7A ve Paymaster HS26 çeşitlerinde, Özyiğit ve ark. (2007); Nazilli 84S çeşidinde, Divya ve ark. (2008); pamuk bitkisinde hipokotil eksplantlarında, Rashid ve ark. (2009); transgenik pamuk bitkilerinde 1 mg/l IBA içeren ortamları kullanmış ve köklenmeyi sağlamıştır [39, 41, 42, 44]. Ancak çalışmamızda 3 farklı IBA konsantrasyonu (0,25, 0,50 ve 1 mg/l) denenmiş; köklenme sağlanamamıştır.

In vitro koşullarda elde edilen sürgünlerde 3 farklı konsantrasyonda (0,25, 0,50, 1 mg/l) NAA kullanımı ile köklendirme büyük ölçüde sağlanmıştır. Köklendirmenin sağlanamadığı kararmanın yoğun olduğu eksplantlarda ise aktif karbon ilavesiyle köklendirme sağlanmıştır. Chowdhury ve ark. (2011); *Gossypium herbaceum* L. bitkisi kotiledon eksplantlarında 2,0 mg/l NAA içeren MS ortamında en yüksek (%41,23) köklendirme elde ettiğini bildirmiştir. Aynı ortamda en yüksek kök sayısı 3,61, en yüksek kök uzunluğu ise 3,62 cm olarak tespit edilmiştir [49]. Özyiğit (2009) ise *Gossypium hirsutum* L. bitkisi Nazilli 84S çeşidinde köklendirme aşamasında WPM besin ortamı kullanmış ve köklendirme sağlamıştır [43].

6.2. Sonuç

Pamuk bitkisi üzerine birçok çalışma yapılmış; ancak ülkemizde yaygın olarak üretilen çeşitlerde başarılı rejenerasyon prosedürlerinin geliştirildiği çalışmalara rastlanılmamıştır. Bu tez kapsamında *Gossypium hirsutum* L. bitkisi GSN-12 ve STN-468 çeşitlerinde *in vitro* koşullarda çoklu sürgün eldesi başarıyla gerçekleşmiş olup bitki doğal ortamı dışında kısa sürede çoğaltılmış ve tüm olumsuz şartlar laboratuvar ortamında ortadan kaldırılmaya çalışılmıştır.

1. Denemede farklı oksin ve sitokin kombinasyonları kullanılmış; en yüksek kallus oluşum oranı GSN-12 için %100,00, STN-468 için %75,00 ile her iki çeşit için de TDZ-IBA kombinasyonunda sağlanmıştır. Fakat kallustan sürgün rejenerasyonu elde edilememiştir.
2. GSN-12 çeşidinde en düşük sürgün rejenerasyon oranı ise (%0,00) 0,30 mg/l TDZ+ 0,10 mg/l IBA içeren ortamlarda tespit edilmiştir. STN-468 çeşidinde ise en düşük sürgün rejenerasyon oranı 0,30 mg/l TDZ veya 0,40 mg/l TDZ ile 0,10 mg/l IBA kombinasyonunu içeren ortamlarda tespit edilmiştir.
3. Farklı ortam gruplarında eksplant başına sürgün sayısı incelendiğinde: GSN-12 çeşidi için en yüksek eksplant başına sürgün sayısı 7,75 adet ile ¼MS besin ortamında gözlenirken, en düşük eksplant başına sürgün sayısı (0 adet) 0,30 mg/l TDZ ve 0,10 mg/l IBA içeren ortamda elde edilmiştir. STN-468 çeşidinde ise en yüksek eksplant başına sürgün sayısı 6,00 adet ile 0,05 mg/l Kinetin içeren MS ortamında elde edilirken, en düşük eksplant başına sürgün sayısı (0 adet) ise ,30 mg/l TDZ veya 0,40 mg/l TDZ ile 0,10 mg/l IBA kombinasyonunu içeren ortamlarda tespit edilmiştir.
4. Ön muamele çalışmaları Kinetin hormonunun farklı konsantrasyonlarıyla yürütülmüştür. Bu denemelerde GSN-12 çeşidi için en yüksek eksplant başına sürgün sayısı (7,75 adet) 5 mg/l Kinetin ön muamelesiyle sağlanırken; en düşük eksplant başına sürgün sayısı (2,2 adet) 10 mg/l Kinetin ön muamelesinde

gözlenmiştir. STN-468 çeşidi için en yüksek eksplant başına sürgün sayısı ise 10 mg/l kinetin ön muamelesiyle elde edilirken; en düşük eksplant başına sürgün sayısı (2,25 adet) da 10 mg/l kinetin ön muamelesinde tespit edilmiştir.

5. Işık denemelerinde 4 kırmızı:1 mavi, 3 kırmızı:1 mavi, 2 kırmızı:1 mavi LED ışık kombinasyonları ve beyaz LED ışık kullanılmış; GSN-12 çeşidi için en yüksek eksplant başına sürgün sayısı (7,75 adet) 4 kırmızı:1 mavi ışık kombinasyonunda, en düşük (0 adet) ise beyaz LED ışık altında elde edilmiştir. STN-468 çeşidi için ise en yüksek eksplant başına sürgün sayısı (6 adet) 3 kırmızı:1 mavi ışık kombinasyonunda, en düşük (0 adet) ise beyaz LED ışık altında elde edilmiştir. Beyaz LED ışığın pamuk bitkisinin *in vitro* sürgün rejenerasyon çalışmaları için uygun olmadığı saptanmıştır.
6. Köklendirme çalışmaları için IBA ve NAA hormonlarının yanı sıra aktif karbon da kullanılmıştır. IBA içeren ortamlarda köklenme sağlanmazken NAA içeren ortamlarda %60,00 oranında köklenme sağlanmıştır. Kararmanın yoğun olduğu ve bu nedenle köklenmenin önlendiği eksplantlarda ise aktif karbon kullanımı ile kararın giderilerek köklenme sağlanmış ve aklimatizasyon aşamasına geçilmiştir. Önce plastik kaplara aktarılan bitkiler 4 hafta içerisinde saksılara aktarılarak sera koşullarına açılmıştır.

Bu tez kapsamında kullanılan GSN-12 ve STN-468 pamuk çeşitlerinde başarılı rejenerasyon yöntemlerinin geliştirildiği yayınlara rastlanılmamıştır. Yaptığımız çalışmalar, bu çeşitlerin *in vitro* koşullarda doku kültürü yöntemleriyle daha hızlı biçimde çoklu sürgün rejenerasyonunun sağlanabileceğini göstermiştir. GSN-12 ve STN-468 çeşitleri ülkemizde üretimi yaygın pamuk çeşitleri olup, geliştirilen yöntemler ve elde edilen rejenerasyon sonuçları gen aktarımında kullanılacak nitelikte olmuştur.

KAYNAKLAR

1. Okur, B. and D. Anaç, *Pamuk Yetiştiriciliğinde Gübreleme*, in *Önemli Kültür Bitkilerinin Gübrenilmesi*, D. Anaç, Editor. 2010, Uluslararası Potayum Enstitüsü Yayınları: İzmir. p. 83-84.
2. Fidan, M.S., et al., *Pamukta Gossypol*. KSÜ Doğa Bilimleri Dergisi 2009. **12**(1): p. 93.
3. İnan, Ö., *Pamuk Glandlerinin Kimyasal Bileşimi, Biyolojik Aktivitesi ve Genetiği*. Antalya Pamuk Araştırma Enstitüsü Raporları, 1980: p. 1-15.
4. Kumar, S.P., et al., *In vitro antioxidant activity of Gossypium herbaceum LINN*. International Research Journal of Pharmacy, 2011. **2**(7): p. 166-170.
5. Chaturvedi, A., S. Singh, and T.N. Nag, *Antimicrobial activity of flavonoids from in vitro tissue culture and seeds of Gossypium species*. Romanian Biotechnological Letters, 2010. **15**(1): p. 4959-4963.
6. T.C. Kalkınma Bakanlığı Güneydoğu Anadolu Projesi Bölge Kalkınma İdaresi Başkanlığı Ekonomik Kalkınma ve Girişimcilik Genel Koordinatörlüğü, *Pamuk*. 2013.
7. Fryxell, P.A., *Taxonomy and Germplasm Resources*, ed. R.J. Kohel. 1984, Madison: American Societies of Agronomy, Crop Science and Soil Science.
8. Nghiem-Phu, L., *Gossypium*. 2013.
9. Çukobirlik Genel Müdürlüğü, *Pamuk*. 2013.
10. Gençer, O., et al., *Türkiye'de Lif Bitkileri Tüketim Projeksiyonları ve Üretim Hedefleri*, in *TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, IV Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi*. 1995, T.C. Ziraat Bankası Kültür Yayınları: Ankara. p. 9-13.
11. Çetiner, S., *Bt Pamuk İntihar Mı Ettiriyor?* Tarlasera, 2012. **Haziran**: p. 18-22.
12. Özudogru, T., *Pamuk durum ve tahmini 2004-2005*. Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü Yayınları, 2006. **148**.
13. Demir, S., A. Bars Orak, and E.D. Durak, 2010. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi, Verticillium Solgunluğuna Farklı Reaksiyon Gösteren Bazı Pamuk Çeşitlerinin Arbusküler Mikorhizal Funguslara (AMF) Karşı Mikorhizal Bağımlılıklar. **20**(3): p. 201-207.
14. James, C., *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops*. 2013.
15. Şenli, N., *Pamuk Borsası*. 2013.
16. Koç, A.A., *Dünya Pamuk Piyasalarında Eğilimler Ve Ulusal Tarım Politikasında Değişmelerin Türkiye Pamuk Pazarına Etkisi*, in *Türkiye VI. Pamuk, Tekstil Ve Konfeksiyon Sempozyumu*, T. Özudogru and Y.E. Ertürk, Editors. 2003, Akdeniz Üniversitesi Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü Yayınları: Antalya. p. 11-13.
17. James, C., *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2012*. ISAAA Briefs 2012. **44**.
18. TÜBİTAK, *LED nedir?* 2013.
19. Jao, R.J., *Effect of Frequency and Duty Ratio on the Growth of Potato Plantlets in vitro Using of Light-emitting Diodes*. HortScience, 2004. **39**(2): p. 375-379.
20. Li, H., Z. Xu, and C. Tang, *Effect of light-emitting diodes on growth and morphogenesis of upland cotton (Gossypium hirsutum L.) plantlets in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2010. **103**(2).
21. SERA LED, *Bitkiler için Yapay Işık*. 2013.
22. Shenk, R.U. and A.C. Hildebrand, *Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures*. Canadian Journal of Botany, 1972. **50**: p. 199.

23. Beasley, C.A. and I.P. Ting, *The effects of plant growth substances on in vivo fiber development from fertilized cotton ovules*. American Journal of Botany, 1973. **60**: p. 130-139.
24. Davis, D.G., K.E. Dusabek, and R.H. Hoerauf, *In Vitro culture of callus tissues and cell suspensions from okra (Hibiscus esculentus L.) and cotton (Gossypium hirsutum L.)*. In Vitro 1974. **9**: p. 395-398.
25. Price, J.H., R.H.-. Smith, and R.M. Grumbles, *Cell cultures of six species of cotton (Gossypium L.) on defined media*. Plant Science Letters, 1977. **10**: p. 115-119.
26. Sandstedt, R., *Habituated callus cultures from two cotton species*, in *Beltwide Cotton Production Conference*. 1975: New Orleans. p. 52.
27. Davidonis, G.H. and R.H. Hamilton, *Plant regeneration from callus tissue of Gossypium hirsutum R*. Plant Science Letters, 1983. **32**: p. 89-93.
28. Trolinder, N. and J.R. Goodin, *Somatic embryogenesis in cell suspension cultures of Gossypium hirsutum*, in *Beltwide Cotton Production Conference*. 1985: New Orleans. p. 46.
29. Kumar, S., P. Sharma, and D. Pental, *A genetic approach to in vitro regeneration of non-regenerating cotton (Gossypium hirsutum L.) cultivars*. Plant Cell Reports, 1998. **18**(59-63).
30. Chamandoosti, F., *The Relationship Between Growth Regulators for Organogenesis and Phenolic Compound in Cotton (Gossypium hirsutum L.)*. Asian Journal of Developmental Biology, 2009: p. 1-7.
31. Khan, T., V.S. Reddy, and S. Leelavathi, *High-frequency regeneration via somatic embryogenesis of an elite recalcitrant cotton genotype (Gossypium hirsutum L.) and efficient Agrobacterium-mediated transformation*. Plant Cell Tissue Organ Culture, 2010. **101**(323-330).
32. Memon, S., et al., *Induction of Callus Through Anther and Ovule Culture in Upland Cotton (Gossypium hirsutum L.)*. World Applied Sciences Journal 2010. **8**: p. 76-79.
33. Ghaemi, M., et al., *Comparison of callus induction and somatic embryogenesis of some Iranian cottons (Gossypium Spp.) with Coker 312 and histology of somatic embryogenesis*. African Journal of Agricultural Research, 2011. **10**(15): p. 2915-2922.
34. Kamal, G.B., *The study of callus induction in cotton (Gossypium Sp.) under tissue culture condition*. International Journal of Agriculture and Crop Sciences, 2011. **3**(1): p. 6-11.
35. Gawel, N.J., *Genetics and in vitro culture of somatic embryogenesis in Gossypium hirsutum L.* 2012, Texas Tech University: Texas.
36. Kumari, V.N. and G.N. Meenakshi, *A Study of factors influencing in vitro callus induction in cotton (G.hirsutum L.)*. International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology, 2012. **5**(1): p. 53-60.
37. Finer, J.J. and M.D. McMullen, *Transformation of cotton (Gossypium hirsutum L.) via particle bombardment*. Plant Cell Reports, 1990. **8**: p. 586-589.
38. Agrawal, D.C., et al., *In vitro induction of multiple shoots and plant regeneration in cotton (Gossypium hirsutum L.)*. Plant Cell Reports, 1997. **16**: p. 647-652.
39. Tuli, R., et al., *In vitro proliferation of shoots and regeneration of cotton*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 1997. **51**: p. 149-152.
40. Hemphill, J.K., C.G.A. Maier, and K.D. Chapman, *Rapid in-vitro plant regeneration of cotton (Gossypium hirsutum L.)*. Plant Cell Reports, 1998. **17**: p. 273-278.

41. Ouma, J.P., M.M. Young, and N.A. Reichert, *Optimization of in vitro regeneration of multiple shoots from hypocotyl sections of cotton (Gossypium hirsutum L.)*. African Journal of Agricultural Research, 2004. **3**(3): p. 169-173.
42. Özyigit, İ.İ., M.V. Kahraman, and Ö. Ercan, *Relation between explant age, total phenols and regeneration response in tissue cultured cotton (Gossypium hirsutum L.)*. African Journal of Agricultural Research, 2007. **6**(1): p. 003-008.
43. Divya, K., et al., *Efficient regeneration from hypocotyl explants in three cotton cultivars*. Biologia Plantarum, 2008. **52**(2): p. 201-208.
44. Özyigit, İ.İ., *In vitro Shoot Development from Three Different Nodes of Cotton (Gossypium hirsutum L.)*. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca 2009. **37**(1): p. 74-78.
45. Rashid, B., T. Husnain, and S. Riazuddin, *Rapid In vitro Root Induction in Transgenic Cotton Shoots*. Plant Tissue Culture & Biotechnology, 2009. **19**(2): p. 247-251.
46. Pushpa, R. and T.S. Raveendran, *Optimization of shoot apex based cotton regeneration system*. Electronic Journal of Plant Breeding, 2010. **1**(4): p. 1235-1240.
47. Farahani, F., F. Yahyazadeh, and M. Sheidai, *Optimization of in vitro direct regeneration of multiple shoots in upland cotton (Gossypium hirsutum L.) cv. Iranian varieties*. African Journal of Agricultural Research, 2010. **5**(11): p. 1304-1309.
48. Laud, D., et al., *Effect of growth regulators and explant types on regeneration of diploid cotton G. arboreum*. Asiatic Journal of Biotechnology Resources, 2010. **3**: p. 214-219.
49. Yang, X.-Y., et al., *Multiple shoots induction in wild cotton (Gossypium bickii) through organogenesis and the analysis of genetic homogeneity of the regenerated plants*. Biologia, 2010. **65**(3): p. 496-503.
50. Chowdhury, A.N., et al., *In Vitro Plant Regeneration from Cultured Cotyledons of Cotton (Gossypium herbaceum L.)*. Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research 2011. **46**(3): p. 359-364.
51. Sangannavar, P., et al., *Effect of external damage on regeneration of cotton explants (Gossypium arboreum and G. barbadense)*. Karnataka Journal of Agricultural Sciences, 2011. **24**(5): p. 629-632.
52. Obembe, O.O., T. Khan, and J.O. Popoola, *High Frequency Multiple Shoots Induction And Plant Regeneration In Six Elite Indian Cotton Cultivars*. Canadian Journal of Pure & Applied Sciences, 2011. **5**(1): p. 1385-1389.
53. Mushke, R., T. Sultana, and P.K. Pindi, *High Frequency Regeneration and Multiple Shoot Induction in Indian Cotton (Gossypium hirsutum L.) Cultivar*. Research Journal of Agricultural Sciences, 2012. **3**(5): p. 1109-1112.
54. Pathi, K.M. and N. Tuteja, *High-frequency regeneration via multiple shoot induction of an elite recalcitrant cotton (Gossypium hirsutum L. cv Narashima) by using embryo apex*. Plant Signaling & Behavior, 2013. **8**(1): p. 94-99.
55. Tarım ve Ziraat Bilgi Bankası Çeşit Kataloğu, *Pamuk Çeşitleri*. 2013.
56. Murashige, T. and F. Skoog, *A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures*. Physiologia Plantarum, 1962. **15**(3): p. 473-497.
57. Bakhsh, A., *Expression of two insecticidal genes in Cotton*, in *National Centre of Excellence in Molecular Biology*. 2010, University of the Punjab: Lahore, Pakistan. p. 63-64.
58. Snedecor, G.W. and W.G. Cochran, *Statistical Methods*. 1967, Iowa, USA: The Iowa State University Press.

59. Aasim, M., BÖRÜLCE (*Vigna unguiculata* L.) 'DE DOKU KÜLTÜRÜ VE GEN AKTARIM ÇALISMALARI, in *Crop Sciences*. 2010, Ankara University: Ankara. p. 42-46.
60. Kendir, H., et al., *In vitro plant regeneration from Narbon Vetch (Vicia narbonensis L.) using cotyledonary node explants*. African Journal of Agricultural Research, 2008. 7(14): p. 2491-2494.
61. Barcelo, M., et al., *Regeneration and transformation via Agrobacterium tumefaciens of the strawberry cultivar Chandler*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 1998. 54: p. 29-36.
62. Phip, N.T., H. Nojima, and T. Tashiro, *Effect of pretreatment of seeds by gibberellin (GA₃), kinetin and temperatures on germination and seedling growth of A. acutiloba kitagwa*. Journal of Scientific Research and Development, 2009. 7(2): p. 217-224.
63. Zimmerman, T.W., *Development Of Cotton Callus Initiation Medium and In Vitro Screening For Osmotic Stress Tolerance*, in *Crop Sciences*. 1987, Texas Tech University: Texas. p. 1-5.

EKLER

EK1:Kullanılan kimyasallara ait özellik tablosu

Malzeme Adı	Marka	Ürün Numarası
Aktif Karbon	Sigma-Aldrich	C9157
Civa klorür (HgCl₂)	Sigma-Aldrich	M1136
Fitajel	Sigma-Aldrich	P8169
Hidrojen Peroksit (H₂O₂)	Sigma-Aldrich	216763
Hidroklorik asit (HCl)	Sigma-Aldrich	H1758
Indol Butirik Asit (IBA)	Sigma-Aldrich	I5386
Kinetin	Sigma-Aldrich	K3378
Murashige ve Skoog Temel Besin Ortamı (MS)	Duchefa	M0220
α- Naftalin Asetik Asit (NAA)	Sigma-Aldrich	N0640
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma-Aldrich	L3771
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Sigma-Aldrich	221465
Sukroz	Duchefa	S0809
Sülfürik asit (H₂SO₄)	Sigma-Aldrich	339741
Thidiazuron (TDZ)	Sigma-Aldrich	P6186

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Gözde YALÇIN

Doğum Yeri: Konya

Doğum Tarihi: 31.10.1988

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu:

Lise: Konya Meram Anadolu Lisesi (2002-2006)

Lisans: Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü (2007-2011)

İş Tecrübesi

Kurumu: R.T.E. Rize Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü

Görevi: Araştırma Görevlisi

Yılları: (2012-)