

ARAŞTIRMA MAKALESİ/RESEARCH ARTICLE

MELEZLEME ve LABORATUVAR YÖNTEMLERİ ile TÛTÜNDE POLEN TOZLARININ DÖLLENME YETENEĞİNİ KAZANDIĞI DÖNEMİN SAPTANMASI

Betül BÜRÜN¹

ÖZ

Nicotiana tabacum L. “Bursa 63/14” ve “Ege 101/215” tütün çeşitlerinde *in vitro* polen çimlendirme testleri ve melezleme çalışmaları ile polen tozlarının çimlenme yeteneğini kazandığı dönem belirlenmiştir. Petal borusu uzamış fakat ucu henüz pembeleşmemiş çiçek tomurcuklarının polenlerinde dölleme yeteneği başlamaktadır. Ancak, korollanın ucu pembeleşmiş fakat açmamış çiçek tomurcuğu polenleri gerek *in vitro*'da (Bursa 63/14 çeşidinde ortalama %87,5 ve Ege 101/215 çeşidinde ortalama %81,0 çimlenme oranı) gerekse melezleme çalışmalarında (Ege 101/215 x Bursa 63/14 melezlemesinden ortalama bir kapsülde 1294 adet tohum) en iyi sonucu vermiştir.

Buna göre melezleme için en uygun tomurcuklar, korollanın uçları pembe ve açılmamış dönemdeki çiçek (5 nolu çiçek tomurcuğu) tomurcuklarıdır.

Anahtar Sözcükler: *Nicotiana tabacum*, *In vitro* polen çimlenmesi, Melezleme.

DETERMINATION OF THE FERTILIZATION ABILITY OF POLLEN WITH HYBRIDIZATION and *IN VITRO* TECHNIQUES IN TOBACCO

ABSTRACT

By *in vitro* pollen germination and hybridization the stage is determined in which the pollen grains gain the ability of fertilization in *Nicotiana tabacum* “Bursa 63/14” and “Ege 101/215”. The ability of fertilization was achieved in the pollens of flower buds of which petal tubes elongated but their tips were still green. However the pollens of flower buds whose tips of corolla were pink, gave the best results both *in vitro* (in Bursa 63/14, average %87,5 and in Ege 101/215 average %81,0 germination rate) and hybridization (in Ege 101/215 x Bursa 63/14 hybridization, average 1294 number seeds /capsule).

According to these results, the most appropriate buds for hybridization were the buds whose corolla's tip were pink and didn't open yet (flower bud number 5).

Key Words: *Nicotiana Tabacum*, *In Vitro* Pollen Germination, Hybridization.

1.GİRİŞ

Yüksek bitkilerde normal döllemede stigma üzerinde polen tozları çimlenerek polen tüpü oluşturur ve embriyo kesesine ilerler. Polen tüpündeki 2 generatif çekirdekten biri yumurta hücresi diğeri kutup çekirdekleri ile birleşir. Böylece çift dölleme ile embriyo ve endosperm meydana gelir ve tohum gelişir. Döllemenin gerçekleşmesi pek çok faktöre bağlıdır yani dölleme ancak uygun koşullar altında gerçekleşir. Bunlardan bi-

risi de mikrosporların dölleme yeteneğini kazanmış olmasıdır.

Polenlerin dölleme yeteneğini kazandığı dönem gerek *in vitro* gerekse *in vivo* olarak çeşitli yöntemlerle belirlenmektedir.

Polenlerin *in vitro* koşullarda çeşitli amaçlar için çimlendirilmesi ile (bazı kimyasal maddelerin polen çimlenmesi üzerine etkilerini araştırmak, uygun çim-

¹ Muğla Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü 48000, MUĞLA.
Faks: 0 252 2238656; E-posta: bbetul@mu.edu.tr.
Geliş: 14 Eylül 2001; Kabul: 08 Ekim 2001.

lendirme ortamı belirlemek, uyumsuzluk vb.) polen çimlenme oranları ve polen tüpü uzaması konusunda tütünde ve diğer bazı bitkiler üzerinde yapılmış bir çok çalışma bulunmaktadır (Mahaver ve Misra,1997, Paolletti ve Raddi, 1995).

Swaminathan ve Murty (1957) *Nicotiana* genusunda bazı tür çaprazlamalarında tek yönlü uyumsuzluk üzerinde yaptıkları çalışmada sadece sükröz ve agarlı *in vitro* çimlendirme ortamı kullanmışlardır. Dean (1964) ise % 15 sükröz ve 30 ppm bor içeren ortamın tütün polenlerinin çimlenmesi için uygun olduğunu belirtmiştir. Daha sonraki çalışmalarda *Nicotiana* için daha fazla besin elementi içeren ortamların uygun olduğu belirtilmektedir (Read vd.,1993; Tandon vd.,1999).

Hlasnikova ve Dubousky (1980), tütünde *in vitro* polen çimlenmesinde sükröz veya glikozun çimlenme üzerine etkisini araştırmış ve sükrözün gerek polen çimlenmesi gerekse polen tüpü uzunluğu bakımından daha iyi sonuç verdiğini belirtmişlerdir. Ayrıca tütünde polen çimlenmesi üzerine sükröz, amino asit, borik asit, tuzlar ve antibakteriyel ajan (rifamycin) içeren likit ortamda PEG – 6000'in ve Cu (II) tuzlarının ilavesi ile polen çimlenmesi ve polen tüpü büyümesinin teşvik edildiği, anormal büyümenin engellendiği belirtilmektedir (Read vd., 1993). Bor, kalsiyum, potasyum ve magnezyumun PEG 10000 ile birlikte polen çimlenmesi üzerine olumlu etkileri saptanmıştır (Tandon vd.,1999).

Tütünde çok düşük konsantrasyonlarda flavonol ilavesi (0,15 – 1,5 μ M) ile çimlenme, gelişim ve polen tüpü büyümesinde en iyi sonuçların elde edildiği belirtilmektedir (Ylstra vd., 1992). Tütünde steroid hormonlarının da polen çimlenmesi ve *in vitro*'da olgunlaşan polenlerin polen tüpü büyümesini teşvik ettiği saptanmıştır (Ylstra vd., 1995).

Nicotiana tabacum'da polen tüpü büyümesi ve generatif çekirdeğin bölünmesini ekzogen Ca^{+2} 'un teşvik ettiği (optimum konsantrasyon 10^{-3} M); yüksek Ca^{+2} uygulamalarının ise polen tüpü büyümesini engellediği ortaya konmuştur (Fan vd., 1997).

Polen çimlenmesi üzerine çevre koşullarının etkisi ve polen depolama koşulları üzerine yapılmış çalışmalar da bulunmaktadır (Dean, 1964; Dean, 1965; Bhat ve Ratnambal, 1997; Zhang vd.,1997; Nenadovic vd., 1996; Loupassaki vd., 1997). Dean (1965), oda sıcaklığı ve nemi koşullarında muhafaza edilen *N. tabacum* polenlerinin 5 hafta içinde canlılıklarını kaybettiklerini oysa 0°C'de ve % 5'den düşük nisbi nem koşullarında saklanan polenlerin 136 hafta sonra dahi canlı kaldıklarını gözlemiştir.

Mohammad ve Shah (1970), tütünde mayıs ayındaki çiçeklenmeyi incelemiş ve çiçeklerin açılmasının sabah 05 – 08 arasında maksimum olduğunu, anterlerin açılmasının ise öğleden sonra daha yüksek olduğunu gözlemişlerdir. Araştırmacılar, stigmaların çiçek açıldıktan 48 saat önce polen tozu kabul edebilir duruma geldiklerini ve bu durumun çiçek açıldıktan 60 saat sonra ya kadar devam ettiğini belirlemişlerdir.

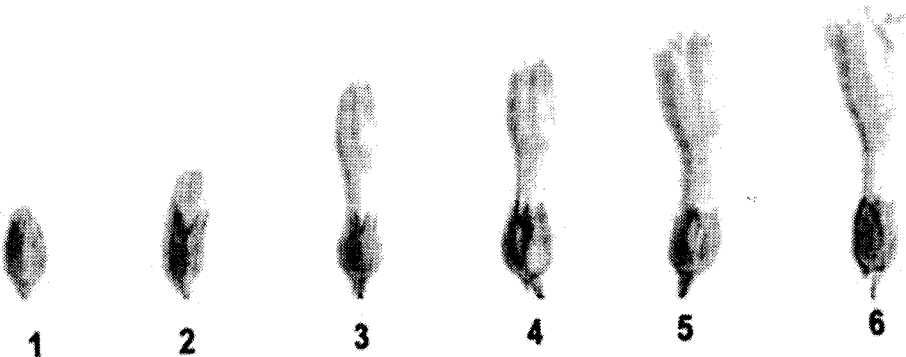
Bu çalışmada, melezleme ve laboratuvar yöntemleriyle polen tozlarının dölleme yeteneğini kazandığı ve en yüksek döllemenin gerçekleştiği dönem saptanmaya çalışılmıştır.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Materyal

Materyal olarak *Nicotiana tabacum* L. "Bursa 63 / 14" ve "Ege 101 / 215" çeşitleri kullanılmıştır.

Çalışmada 6 farklı büyüklükte çiçek tomurcuğu seçilmiştir (Şekil 1). 1 nolu çiçek tomurcuğunda korolla kaliksden çıkmak üzere, 2 nolu çiçek tomurcuğunda korolla biraz uzamış, 3 nolu çiçekte korolla biraz daha uzamış ve ucu şişkin durumdadır. 4 nolu çiçek tomurcuğunda korollanın ucu pembeleşmeye başlamış, 5 nolu çiçek tomurcuğu korollanın ucu tamamen pembeleşmiş fakat çiçek tomurcuğu henüz açılmamış durumdadır ve 6 nolu çiçek petalleri açılmış olan çiçeklerdir.



Şekil 1. Seçilen 6 Boy Çiçek Tomurcuğu Büyüklükleri.

2.2. Yöntem

2.2.1. *In vitro* Çimlendirme

In vitro çimlendirme ortamı olarak Swaminathan ve Murty (1957)'nin verdiği ortam kullanılmıştır. 3 g süzkroz, 0,5 g agar ve 25 ml distile su ile 100°C su banyosunda 20 dakika karıştırılarak çimlendirme ortamı hazırlanmıştır. Bu ortam lamlar üzerine damlatılıp bunların üzerine 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 nolu çiçek tomurcuklarının polenleri ayrı ayrı silkelenmiş ve lamlar 30°C'de sıcaklıkta nemli ortamda çimlenmeye bırakılmıştır. 22 saat sonra % çimlenme oranları belirlenmiştir.

Çalışma 2 tekerrürlü olarak yürütülmüş ve polen çimlenme oranları (%) açı değerlerine çevrilerek tesadüf parselleri deneme desenine göre değerlendirilmiştir.

2.2.2. Melezleme

Her iki çeşit için de 5 nolu büyüklükteki çiçek tomurcuğu ana ebeveyn olarak seçilerek 6 boy çiçek tomurcuklarına ait polenler ile ayrı ayrı melezlenmiştir.

Melezleme 4 tekerrürlü olarak yapılmış ve istatistik olarak tesadüf parsellerine göre değerlendirilmiştir. Hava koşulları nedeniyle düşen melez kapsüldeki tohum sayısının tahminlemesi kayıp parsel formülünden bulunmuştur (Açıkgöz, 1981).

3. BULGULAR

In vitro çimlendirme ortamında her iki çeşidin de polenlerinden 2 saat sonra çim borucuklarının meydana gelmeye başladığı gözlenmiştir. *In vitro* kültürün 2. saatinde yapılan incelemede her iki çeşitte sadece 5 ve 6 nolu çiçek tomurcukları polenlerinde çimlenme olduğu 22 saat sonra ise 4, 5 ve 6 nolu çiçek tomurcuklarının polenlerinde çimlenme olduğu hatta Ege 101 / 215 çeşidinde 3 nolu çiçek tomurcuğunun polenlerinden de birkaç polenin çim borucuğu oluşturduğu gözlenmiştir. 3 nolu çiçek tomurcuğu büyüklüğünden 4 nolu çiçek tomurcuğu büyüklüğüne geçişteki çiçeklerin polenlerinin çimlenme yeteneği başlamış olmaktadır. Çiçek tomurcuğu büyüklüklerine göre her iki çeşidin polen çimlenme oranları tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1'den en yüksek çimlenme oranının her iki çeşitte de 5 nolu çiçek tomurcuğu büyüklüğünde olduğu (çeşit ortalaması % 84,25); ayrıca 4 nolu büyüklükteki çiçek tomurcuğundaki polenlerin çimlenme oranının çok düşük olduğu da (çeşit ortalaması % 39,25) görülmektedir.

Çiçek tomurcuklarının büyüklüklerine göre polen çimlenme oranları istatistiki olarak % 1 düzeyinde önemli bulunmuştur. Çoklu t testine göre her iki çeşitte de 5 ve 6 nolu çiçek tomurcuklarının polenlerinin % çimlenme oranları aynı grupta yer almış, 4 nolu çiçek tomurcuğunun polenlerinin çimlenme oranı ayrı bir grup olmuştur. Ayrıca, 5 ve 6 nolu çiçek tomurcuğu po-

Tablo 1. *In Vitro* Polen Çimlenme Oranları.

Çiçek Tomurcuğu Büyüklüğü	Bursa 63 / 14			Ege 101 / 215		
	% çimlenme			% çimlenme		
	Tekerrür I	Tekerrür II	Ortalama	Tekerrür I	Tekerrür II	Ortalama
1	---	---	---	---	---	---
2	---	---	---	---	---	---
3	---	---	---	Çok az	Çok az	Çok az
4	25	60	42,5	20	52	36,0
5	90	85	87,5	85	77	81,0
6	70	70	70,0	82	77	79,5

Tablo 2. Ege 101 / 215 x Bursa 63 / 14 Melezlemede Tohum Tutma Durumu ve Her Bir Kapsüldeki Tohum Sayısı.

Çiçek tomurcuğu Büyüklüğü	Tekerrür				
	I	II	III	IV	Ortalama
1	Tohum tutmadı	Tohum tutmadı	Tohum tutmadı	Tohum tutmadı	Tohum tutmadı
2	Tohum tutmadı	Tohum tutmadı	Tohum tutmadı	Tohum tutmadı	Tohum tutmadı
3	Tohum tutmadı	Tohum tutmadı	Tohum tutmadı	Tohum tutmadı	Tohum tutmadı
4	0(*)	96	388	73	139
5	970	1344	1715	1150	1294
6	1270	1210	1300	1137	1229

(*) Kayıp parsel formülüne göre hesaplanmış ve -3 değeri bulunduğundan nazari olarak 0 değeri alınmıştır.

lenlerinin % çimlenme oranları arasındaki fark önemli bulunmamıştır. İki çeşit arasında polen çimlenme oranları bakımından istatistiki önemlilik yoktur.

Melezlemeler resiprok yapılmış ve sadece son 3 boy çiçek tomurcuğu ile yapılan melezlemelerden tohum alınmıştır (Tablo 2). Bursa 63/14 x Ege 101/215 melezlemesinde çoğu kapsüller rüzgardan düştüğü için tablo 2'de sadece Ege 101/215 x Bursa 63/14 melezlemesine ait veriler görülmektedir.

Ege 101 / 215 x Bursa 63 / 14 melezlemelerinde kapsüldeki tohum sayısı 4 nolu çiçek tomurcuğunun polenleri ile yapılan tozlamada ortalama 139, 5 nolu çiçek tomurcuğu polenleri ile yapılan tozlamada ortalama 1294 ve 6 nolu çiçek büyüklüğünde ortalama 1229 adet ile en iyi tohum bağlamanın 5 nolu çiçek tomurcuğunun polenleri ile yapılan tozlamadan elde edildiği görülmektedir.

Farklı büyüklükteki çiçek tomurcuğu polenleri ile yapılan melezlemelerde kapsüldeki tohum sayısı bakımından istatistiki önemlilik bulunmuştur. 4 nolu çiçek tomurcuğu ile 5 nolu çiçek tomurcuğu ve 4 nolu çiçek tomurcuğu ile 6 nolu çiçek tomurcuğu arasındaki fark önemlidir.

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Tütünde çeşitli dönemlerdeki polen tozlarının dölleme yeteneğini kazanıp kazanmadığı laboratuvar yöntemleri ve melezleme çalışmaları ile ortaya konmuştur.

Tütünde polen çimlenmesinde ortam bileşimi üzerinde yapılan çeşitli çalışmalar ortama ilave edilecek bazı maddelerin teşvik edici etkilerini ortaya koymuştur (Ylstra vd., 1992; Read vd.,1993; Ylstra vd.,1995). Tütün için çimlendirme ortamında glikoz yerine sükrözün daha uygun olduğu belirtilmiş ve tütün ile ilgili çalışmalarda sükröz kullanıldığı literatür bilgilerinden görülmektedir. Bu çalışmada da diğer maddelerin etkilerinin olmayacağı çok basit bir ortam (sadece şeker ve agar içeren) kullanılmıştır. Diğer çimlenmeyi teşvik edici maddelerin etkileri olmadan % çimlenme oranları saptanmıştır. *In vitro* polen çimlendirme testlerinde 5 ve 6 nolu çiçek tomurcuklarının polen çimlenme oranları en yüksek olmuş (iki çeşit ortalaması olarak sırasıyla %84,25 ve %74,75) ve *in vitro*'da 5 ve 6 nolu çiçek tomurcukları polenleri dölleme yeteneği bakımından uygun bulunmuştur. Benzer şekilde Favili vd.(1964), tütünde farklı dönemlerde toplanmış polenlerin % 20 sulu sükröz solüsyonunda çimlenmesini tespit etmişler ve en iyi çimlenmenin kendisi açılmış anterlerden elde edildiğini, bunu anterin açılmak üzere olduğu polenlerin çimlenmesinin izlediğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada da korolla açılmamış ancak ucu pembeleşmiş çi-

çek tomurcuklarının polenleri ile yeni açmış çiçeklerin polenleri *in vitro*'da en yüksek çimlenme oranını göstermiş ve istatistiki olarak aynı grupta yer almıştır. Melezleme çalışmalarında da aynı çiçek tomurcukları tohum tutma bakımından en iyi sonucu vermiştir.

Melezleme çalışmalarında (Ege 101/215 x Bursa 63/14) 5 nolu çiçek tomurcuğunun polenleri ile yapılan tozlamada tohum tutma (kapsüldeki tohum sayısı ortalama 1294 adet) en iyi olmuştur. Sonuçlara göre 5 ve 6 nolu çiçek boyları melezleme için tozlayıcı olarak önerilmektedir. Paulownia'da benzer şekilde bir çalışma yapılmış ve çiçek büyüklüklerine göre polen çimlenme oranları *in vitro* olarak araştırılmış; uzamış ve açmış olan çiçek tomurcuklarında (30-40 mm) çimlenmenin arttığı hatta 40 mm uzunluktaki çiçeklerin polenlerinin ortamda sükröz bulunmadığında da çimlendiği belirtilmiştir (Ho ve ark., 1998).

Polenlerin *in vitro* % çimlenme oranları melezleme sonuçları ile karşılaştırılırsa paralel sonuçlar elde edildiği görülmektedir. Dean (1965)'da polen canlılığının saptanmasında çimlendirme testleri ile gerçek tozlama testlerinin uyumlu sonuç verdiğini belirtmiştir.

KAYNAKÇA

- Açıkgöz, N. (1988). *Tarımda Araştırma ve Deneme Metodları*. Ege Üniversitesi Yayınları 478, Bornova-İzmir.
- Bhat, S.S. ve Ratnambal, M.J. (1997). Factors affecting *in vitro* germination and storage of coconut pollen. *Journal of Plantation Crops*, 25(1), 77-82.
- Dean, C.E. (1964). Sucrose and boron in artificial media for tobacco pollen germination and tube growth. *Tobacco*, 158(25), 24-28.
- Dean, C.E. (1965). Effect of temperature and humidity on the longevity of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) pollen in storage. *Crop Science*, 5, 148-150.
- Fan, L.M., Yang, H.Y. ve Zhou, C.C. (1997). Exogenous Ca²⁺ regulation of pollen tubes growth and division of the generative nucleus in *Nicotiana tabacum*. *Acta-Phytotaxonomica-Sinica*, 35(10), 899-904 (CAB Abstracts 1996-1998, 981608392).
- Favili, R., Testa, F. ve Verana, P.L. (1963). Preliminary observations on the technique of collecting and preserving tobacco pollen. *Tobacco*, 67(202), 14.
- Hlasnikova, A. ve Dubovsky, J. (1980). Androgenesis *in vitro* and associated problems. Comparison of the effect of saccharose and glucose on the pollen germination in some sorts and varieties of *Nicotiana*. *Genetica*, 11/12, 11-20.

Ho, C.K., Chang, S.H., Chen, Z.Z. ve Tsai, J.Y. (1998). Pollen germination and *in vitro* pollination of *Paulownia x taivaniana*. *Taiwan Journal of Forest Science*, 13(2), 127–138.

Loupassaki, M., Vasilakakis, M. ve Androulakis, I. (1997). Effect of pre-incubation humidity and temperature treatment on the *in vitro* germination of avocado pollen grains, *Euphytica*, 94(2), 247–251.

Mahaver, L.N. ve Misra, R.C. (1997). Studies on pollen germination in gladiolus. *Journal of Ornamental Horticulture*, 5(1–2), 12–15.

Mohammad, Z. Q. ve Shah S.D. (1970). Pollination fashion in *Nicotiana tabacum* L. *Plant Breeding Abstracts*, 42, 1009.

Nenadovic, M.E., Hampson, C.R., Anderson, R.L., Perry, R.L. ve Webster, A.D. (1996). The influence of temperature, sucrose concentration and time on pollen germination and pollen tube growth in sour and sweet cherry. *Acta Horticulture*, 410, 443–447.

Read, S.M., Clarke, A.E. ve Bacic, A. (1993). Stimulation of growth of cultured *Nicotiana tabacum* W38 pollen tubes by poly (ethylene glycol) and Cu (II) salts. *Protoplasma*, 177(1–2), 1–14.

Swaminathan, M.S. ve Murty, B.R. (1957). One-way incompatibility in some species crosses in the genus *Nicotiana*. *Indian J. Genet.*, 17(1), 23–26.

Tandon, R., Manohara, T.N., Nijalingappa, B.H.M. ve Shivanna, K.R. (1999). Polyethylene glycol enhances *in vitro* germination and tube growth of oil palm pollen. *Indian Journal of Experimental Biology*, 37(2), 169–172.

Ylstra, B., Tauraev, A., Moreno, R.M.B., Stoger, E., Tunen, A.J., Vicente, O., Mol, J.N.M. ve Heberle, B.E. (1992). Flavonols stimulate development, germination and tube growth of tobacco pollen. *Plant Physiology*, 100(2), 902–907.

Ylstra, B., Touraev, A., Brinkmann, A.O., Heberle, B.E. ve Tunen, A.J. (1995). Steroid hormones stimulate germination and tube growth of *in vitro* matured tobacco pollen. *Plant Physiology*, 107(2), 639–643.

Zhang, C., Fountain, D.W. ve Morgan, R. (1997). *In vitro* germination of the trinucleate pollen of *Limonium perezii*. *Grana*, 36(5), 284–288.



Betül Bürün, 1961 Manisa doğumludur. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü mezunu olup yüksek lisans ve doktora eğitimini Ege Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü, Genetik ve Bitki Islahı bilim dalında yapmıştır. 1996 yılında Doçent ünvanını almış ve halen Muğla Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünde görev yapmaktadır. Genetik ve bitki teknolojisi alanında çalışmalarına devam etmektedir.