

ASMADA POLİPLOİDİ İNDÜKSİYONUNDA AZOT PROTOKSİTİN (N₂O) UYGULANABİLİRLİĞİ

Zeki KARA¹, Ayşe ÖZER², Ali SABİR¹, Kevser YAZAR³, Osman DOĞAN³

¹Prof. Dr., Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, KONYA

²Öğr. Gör., İnönü Üniversitesi, Battalgazi MYO, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Battalgazi/MALATYA

³Arş. Gör., Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, KONYA

Geliş tarihi / Received: 11.09.2017, Kabul tarihi / Accepted: 20.06.2018

ÖZET

Dünyada 6.969.373 ha alanda üretilen 67.067.129 ton taze üzümün, %6.4'ünü sağlayarak Türkiye, Dünya kuru üzüm üretiminde ikinci ve sofralık üzüm üretiminde beşinci sırayı almaktadır. Ülkesel düzeyde üzüm üretimi ve pazar payının sürdürülebilmesi için yeni ve özellikle de iri taneli üzüm çeşitlerine gereksinim duyulmaktadır. Poliploid bitkilerin oluşumu kolhisin, oryzalin, trifluralin, amiprofos–methyl gibi depolimerizasyon ajanı bazı bileşiklerle, hücre bölünmesine müdahale etmek suretiyle teşvik edilebilmektedir. Azot protoksit (N₂O), 1970'lerden itibaren antimitotik ajan olarak poliploid bitkiler üretilmesinde, anormal mayotik hücre bölünmesi yoluyla indirgenmemiş gamet oluşumu çalışmalarında kullanılmaktadır. Bu çalışmada, poliploid asma ıslahında N₂O'nun uygulanabilirliği irdelenmiştir. Ploidi teşviki maksadıyla kullanılan kimyasalların uygulandığı bitki kısımları, uygulama teknikleri, dozları ve etkinliği türler ve hatta çeşitler düzeyinde farklılıklar arz etmektedir. N₂O basınca dayanıklı bir kapta farklı sürelerde aktif mitoz veya mayoz bölünmedeki dokulara (polen ve/veya yumurta kesesi ana hücresi) uygulanmaktadır ve bu şekilde 2n polen, poliploid fide ve/veya sürgün oluşumu teşvik edilmektedir. Asma ıslahında uygulanmasına yönelik çalışmaya rastlanılmamış olup birçok bitkinin gamet, zigot ve fidelerine, bir poliploidize edici madde olarak N₂O uygulanabilmektedir. Genomik araçların uygulanması ve 2n–gametin teşvikinde rol oynayan genler ve mekanizmaların tanımlanması ve izolasyonu, farklı bitki türlerinde artan kullanım sağlayarak bitki ıslahında yeni yollar açacaktır.

Anahtar Kelimeler: Bağcılık, asma ıslahı, poliploidi, gülme gazı, antimitotik etki

NITROGEN PROTOXIDE (N₂O) APPLICABILITY IN GRAPEVINE POLYPLOIDY INDUCTION

ABSTRACT

Turkey, providing 6.4% of 67.067.129 tons of fresh grapes produced in 6.969.373 hectares area surface in the world is taking the second rank in world raisin production and “the fifth in table grape production. New and especially bigger grape varieties are needed to sustain grape production and market share at the global level. The formation of polyploidy plants can be promoted by interfering with cell division with certain compounds of depolymerisation agents such as colchicine, oryzalin, trifluralin, amiprofos–methyl. Nitrogen protoxide (N₂O) has been used for the production of polyploidy plants as an antimitotic agent, since 1970's and for unreduced gametogenesis studies through abnormal meiotic cell division. In this study, the applicability of N₂O in polyploid grapevine breeding was reviewed. Plant parts applied of the chemicals used for ploidy induction, application techniques, dosages and activity differ in species and even varieties. N₂O is applied to (pollen and/or the main cell of the egg vesicle) tissues during active mitosis or meiosis division at different times in a pressure resistant tank and thus 2n pollen, polyploid seedlings and/or shoot formation is promoted. There was no study on the N₂O application in grape breeding while it is possible to apply N₂O as a polyploidizing agent to gametes, zygotes and seedlings of many plants. The application of genomic devices and identification and isolation of genes and mechanisms involved in the induction of 2n–gamete will enable increased exploitation in different plant species, which will open new ways for plant breeding.

Keywords: Viticulture, grapevine breeding, polyploidy, laughing gas, antimitotic effect

GİRİŞ

Üç veya daha fazla kromozom setine sahip organizmalar poliploid olarak adlandırılırlar. İki farklı poliploid tipi tanımlanabilir. Kromozom setlerini aynı türden olanlara autopoliploidler; kromozom setlerini farklı türlerden alanlara ise allopoliploidler denilmektedir. Autopoliploid bitkilerin tümünde fertilité azalır, triploid olanlar tohum meydana getirmezler. Öte yandan çok yıllık meyveler ve süs bitkilerinde tohumluluk istenen bir özellik olduğundan bu bitkilerde “autopoliploidi” sık kullanılır. Allopoliploidi, farklı genomlar taşıyan iki türün melezlenmesi ve kromozom sayısının iki katına çıkmasıyla elde edilmektedir. Genellikle iki türün kromozomları homolog olmadıklarından, aralarında eşleşemezler ve dolayısıyla melezler kısır olur [35].

Poliploidler ıslahçılar için çok değerlidir çünkü sıkça diploidlerden farklı yani daha kalın yapraklar, daha büyük çiçekler ve daha büyük tohumlar gibi morfolojik özelliklere sahiptirler [7, 24]. Tetraploid bitkilerin hücre yapıları diploid bitkilere göre daha büyük olduğundan tetraploid bitkilerin bazı vejetatif (gövde uzunluğu, yaprak eni ve boyu, yaprak sayısı) ve çiçek özelliklerinin (çiçek sayısı, stigma uzunluğu, yumurtalık büyüklüğü) diploid bitkilere göre oldukça farklıdır [26].

Poliploidi, aynı zamanda, türler arası melezlerin fertilliklerini geri kazandırabilir [16] veya kısır çeşitlerin gelişmesine neden olabilir. Poliploidinin diğer etkileri kendiyile uyumsuzluk kaybı, çiçeklenme zamanı farklılığı, reproduktif sistemdeki değişiklikler (aseksüel çoğalma), pestisit direncinde artış ve büyüme gücündeki değişimleri içerir [7].

Poliploidi doğal olarak iki şekilde oluşur. İlki meristematik hücrelerde mitoz bölünme sırasında oluşan anormalliklere bağlı olarak somatik katlanmalar meydana gelmesidir. İkincisi ise mayoz bölünme sırasında kromozom takımları ayrılmadığından gametlerin beklenenin iki katı kromozom taşımasıdır. Yapay olarak bitkilerde poliploidi oluşturmak için ise kromozom katlama yöntemi kullanılır. Bu yöntemde ıslahçıların en çok kullandığı kimyasal kolhisindir. Doku kültürü, pek çok konuda olduğu gibi poliploid bitkilerin elde edilmesinde de ıslahçılara kolaylık sağlamaktadır. Besin ortamına ilave

edilen kromozom katlamada kullanılan kimyasal maddeler aracılığıyla *in vitro* koşullarda poliploid bitkiler elde edilebilmektedir [26].

Asmalarda doğal mutasyonlar sonucunda tetraploid yapıların gerçekleştiği belirtilirken [20], Asya’da triploid ve tetraploid olan hemen bütün çeşitlerin *Vitis vinifera* ve *V. labrusca*’dan türediği ifade edilmiştir. 20.yy’ın ikinci yarısında Çin, Japonya ve Kore büyük taneli çekirdekli ve çekirdeksiz sofralık üzüm eldesinde önemli gelişmeler göstermiştir. Islah çalışmalarında kromozom katlaması yöntemiyle tetraploid Kyoho, Pione, Olympima, Heukgoosul gibi üzüm çeşitlerini elde etmişlerdir. Yapılan çalışmalarda tetraploid çeşitlerin diploid çeşitlerle melezlenmesi sonucu triploid Honey Seedless, King Dela ve Mirai gibi çekirdeksiz çeşitler geliştirilmiştir. Ancak tetraploid ve diploidler arasındaki melezlemede başarı oranı düşüktür. Bu nedenle triploid üzüm ıslahı oldukça zordur [26].

Poliploidinin melezleme çalışmaları ile elde edilmesinin zorluğu nedeniyle, bazı bileşiklerle hücre bölünmesine müdahale etmek suretiyle poliploidinin teşviki yoluna gidilmektedir. Bunun için mitoz bölünmede hücre içinde kromozom sayısı iki katına çıktıktan sonra kromozomların kutuplara çekilmesini sağlayan iğ iplikleri ortadan kaldırılır. Kutuplara çekilemeyen ancak sayısı iki katına çıkmış olan kromozomlar bölünme olmayan aynı hücre içerisinde kalır ve bu şekilde kromozom sayısı iki katına çıkarılmış olur. Bu maksatla bağcılıkta en çok kullanılan kolhisine, gerek yüksek oranda mutajenik olması ve çevreye olan görece yüksek zararı, gerekse pahalı olması dolayısıyla alternatif bileşikler denenmektedir.

Yaygın etmenler kolhisin, oryzalin veya trifluralin’in yanında MG 132, kafein, benzobenil veya 2,6-diklorobenzonitril, binüklein 2, puromisin, staurosporin, blebbistatin gibi daha az sıklıkta bildirilen diğer moleküller, mayozu bozmak ve 2n gametleri indüklemek için ilginç alternatifler olabilir. Yukarıda bahsedilen moleküllerin tümü, bitki ya da hayvan sistemlerinin mitozunda metafaz, anafaz ya da sitokinezi bozmaktadır [6]. Yine N₂O, vinblastin, amiprofos-metil (APM), pronamid, asenaften ve lindan (γ-HCH) da poliploid bitki eldesi

çalışmalarında kullanıldığı bildirilen kimyasallardandır [3, 8, 13, 16, 24].

Poliploidlerin üretilmesi için bir araç olarak N_2O , kolhisine kıyasla birçok avantaja sahiptir. Her şeyden önce, kolhisin genellikle tohumlara, fidelere veya büyüyen bitkilere uygulanır; bunların hepsinde büyüme noktası çok sayıda hücreden oluşur. Bu nedenle, muamele edilmiş bitkiler genellikle diploid ve tetraploid dokuların kimeralarına dönüşür ve gerçek bir poliploid elde edilinceye kadar başka bir nesil beklenmek zorundadır. Aksine mitotik poliploidde, N_2O muamelesi, döllenmiş yumurta hücresinde ilk mitozun gerçekleştiği tozlanan çiçekler üzerine uygulanabilir. Muamele doğru zamanda yapılırsa, ortaya çıkan bitkiler %100 poliploid olmalıdır ve hiçbir kimera beklenmeyebilir [18].

Zigotik mitozun başladığı tozlanmış çiçekler, N_2O ile muamele edildiğinde, ortaya çıkan embriyolar gerçekten poliploid hale gelirken, çiçeklerin sonraki aşamalarda muamele görmesi durumunda embriyolar kimeralar haline gelecektir. Öte yandan, iki veya daha fazla hücre bölünme döngüsü için uzatılmış bir muamele, oktoploidleri veya daha yüksek poliploidleri indükleyecektir [18].

Bazı araştırmacılar, yüksek konsantrasyonların bitki mikrotübüllerini depolimerize ettiğini [19, 34] iddia ederken, HeLa hücrelerini kullanan çalışmalar, birleşmenin değil fakat daha sonraki kromozom sıralamasının engellendiğini ifade etmişlerdir [5]. İlk hipotezi savunan araştırmacıların gerekçeleri, bitki hücreleri ile ilgili olduğundan daha olasıdır. Hatta diğer bloke edici bileşiklerle birlikte kromozom dağılımı için ilave muamele olarak N_2O uygulamasını öneren raporlarla daha tutarlıdır [8, 13].

N_2O , dokular içindeki organları muamele etmek için uygundur [16, 23, 24]. Stomalar ve hücrelerarası alanlar yoluyla bitki dokularına hızlı bir şekilde nüfuz edebilen bir gazdır. Mitoz üzerinde etkili olan konsantrasyonlarda nispeten düşük toksisiteye sahiptir [24]. Mitozu etkilediği bilinen çoğu kimyasal etmen sulu solüsyon olarak kullanılırken N_2O basınçlı gaz olarak kullanılır. Muamelede gaz kullanmanın önemli bir avantajı, eğer varsa, toksik etkilerin, dokuyu gaz odasından çıkarmak suretiyle hafifletilebileceği, ancak

dokulara solüsyonlarla muamele edildiğinde bunun başarılması mümkün olmayan bir işlem olduğu gerçeğidir [3]. N_2O muamelelerini kullanmanın temel avantajı, tekniğin kolay olmasıdır. Buna karşılık, muameleden önce tam mayotik aşamayı belirlemek için çok sayıda tarama çalışması gerekli olabilir, tekniğin etkinliği, farklı bitki türlerinde farklılık gösterebilir. Örneğin *Pisum* N_2O 'ya karşı *Allium*'dan çok daha duyarlı olup [10, 24, 25] uygun bir ekipman da gerektirir [6]. Kolhisin ile ilgili ciddi bir sorun, muamele edilmesi gereken hücrelere ulaşmanın çok zor ve onlara ulaştığında kimyasalın hızla tekrar atılmasının imkânsız olduğu gerçeğidir [24]. Kolhisin aktif büyüme bölgelerinde antimitotik etki için kullanılmaktadır. Uygulama yöntemine bağlı olarak uygulandığı bölgede kurumaya neden olması çalışmayı ve sonuç almayı zorlaştırmaktadır [24].

Trifluralin, oryzalin ve APM gibi antimikrotübül herbisitler, kolhisin ile karşılaştırıldığında bitki tübülünü için güçlü bir afiniteye sahiptirler [15].

Tozlaşma ve muamele arasındaki süre boyunca sıcaklık kontrolünün yanı sıra en uygun basınç ve muamele sürecini daha ayrıntılı olarak test ederek heteroploidlerin veriminin önemli ölçüde artırılabilirliği ifade edilmektedir [24].

N_2O ile yapılan çalışmalarda bitkilerin tozlanmış çiçeklerine [4, 9, 18, 25, 27, 30], zigotlarına ve fidelerine [2, 4, 9, 10, 16, 17, 24, 25, 30, 31], çiçek soğanlarına [23], çiçek tomurcuklarına [2, 7, 19, 23, 27, 29] ve kök uçlarına [15] muamele edildiği görülmektedir.

Muamele öncesi bitki materyallerinin mayotik aşamasının belirlenmesi gerektiği için, büyük anterleri olan bitki türlerinin (lale, zambak vb.), küçük çiçek ve çiçek salkımlarına sahip türlere kıyasla mayotik evrenin belirlenmesinde bir avantaja sahip olduğu bildirilmiştir [23, 34].

Polenlerin asetokarmin-asetikorsein gibi boyalar ile boyanarak mikroskopi yoluyla boyutlarının belirlenmesiyle, mayotik dönemleri periyodik olarak belirlenebilmektedir [2, 19, 23, 27].

N_2O uygulamaları basınca dayanıklı bir kaptaki $21.1 \cdot 10^{-3}$ – $42.2 \cdot 10^{-3} \text{ kg m}^{-2}$ (30 ila 60 psi) [30], 0.5 MPa [4], 3–10 atm 3–72 saat [10, 14, 15, 18, 22, 24, 25, 27, 31], 6 bar 15–72 saat [3, 7, 28, 31], 300–1000 kPa 48 saat [13, 16, 17],

6 atm ($N_2O:O_2=5:1$) 24–48 saat [2, 23] ve 6–10 atm N_2O + 1 atm hava 1–3 saat [15] olmak üzere farklı sürelerde aktif mitoz veya mayoz bölünmedeki dokulara uygulanmakta, 2n polen, poliploid fide ve/veya sürgün oluşumu teşvik edilmektedir. 2n polenlerin diploid çiçekli ebeveynlerle melezlenmesi triploid/poliploid ıslahında bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bu gaz bölünen kök ucu hücrelerini sonraki kromozom analizi için metafazda tutmak için de kullanılabilir.

2n gamet üretiminin sıklığı, sıcaklık gibi çevresel faktörleri manipüle ederek artırılabilir [7]. N_2O 'yu oda sıcaklığında uyguladığını belirten yazarların [2, 14, 15, 16, 17, 23, 27, 30] yanı sıra sıcaklık kontrol edilmediği için uygun muamele anının değişkenlik göstermesi nedeniyle olumsuz sonuç aldığını belirten yazarlarda [24] mevcuttur.

N_2O muamelesinde kullanılan cihazın, azaltma vanalı N_2O tüpü olduğu ve ince bir bakır boru vasıtasıyla işlem kabının kapağına bağlandığı belirtilmiştir. Aynı kapağa takılabilen farklı boyutlarda üç işlem kabının olduğundan bahsedilmiştir. Bu farklı ebat kapların küçük bir bitki muamele edildiğinde az miktarda gazın kullanılmasını mümkün kıldığı belirtilmiştir. Gazın, çelik tüplerde ticari kaynaklardan edinilebildiği, bunların içindeki basıncın yaklaşık 55 atmosfer olduğu, gaz akışının ise redüksiyon valfi ile kontrol edildiği bildirilmektedir [24].

Muamele esnasında gazın çok hızlı bir şekilde verilmemesi veya salınmamasının çok önemli olduğu bildirilmiştir. Aksi durumda dokuların içindeki ve dıştaki basınç arasındaki ani farklar tohum bağlamada tam bozulmaya neden olmaktadır. Deneyimler, dakikada yaklaşık $2.8 \times 10^3 \text{ kg/m}^2$ (4 psi)'nin tatmin edici bir değişim oranı olduğunu ortaya koymuştur [30]. Bitkilerin fizyolojik hasarından kaçınmak için, sıkıştırma süresinin 1.5 saat, basınç boşaltmanın ise 3 saatten fazla sürdüğü [28], muamele periyodunun sonunda, kap içindeki basıncın yaklaşık 20 dakika süresince yavaş yavaş nispeten azaltıldığı [24], gazın düşük bir oranda (0.2 atm/dakika) içeri alınıp bırakıldığı [14], gazın 10 dakikalık bir süre zarfında yavaşça odanın içine uygulandığı [16] çalışmalar mevcuttur.

Muamele sonucunda ploidi düzeylerini belirlemek için flow sitometri (FC) analizlerinden faydalanılmaktadır [2, 7, 13, 19, 662

23]. Stoma boyu, stoma sıklığı ve polen tanesi çapı ölçümleri de belirlemelerde yardımcı olmaktadır [4]. Kök ucu kromozom sayımları, enzimatik maserasyon–hava–kurutma prosedürüne [15] göre gerçekleştirile bilmektedir [17].

Çeşitli çalışmalarda *Arabidopsis thaliana*, *Avena sativa*, *Begonia* spp., *Crepis capillaris*, *Datura stramonium*, *Gossypium hirsutum*, *Hordeum* spp., *Lilium* spp., *Phalaris* spp., *Psathyrostachys juncea*, *Solanum* spp., *Trifolium* spp., *Triticum* spp., *Tulipa* spp., *Zea mays* bitkilerine N_2O muameleleri yapılmış türler ve hatta çeşitler düzeyinde farklı sonuçlar alınmıştır.

Asmada N_2O muamelesi ile ploidi elde edilmesine yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada N_2O ve diğer etmenlerin çeşitli türlerdeki etkileri incelenerek asma poliploidi ıslahı çalışmalarına katkı amaçlanmıştır.

AZOT PEROKSİDİN UYGULAMLARI

Araştırmacılar *Tulipa* spp. bitkileri üzerine N_2O uygulamasıyla tetraploidler elde etmişlerdir. Seçilen birtakım klonlar orijinal ebeveynlerine göre daha uzun çiçek ömrü göstermiştir [32].

N_2O muamelesinin, buğdayda poliploidler üretmek için etkili bir araç olduğunu kanıtladığını belirten araştırmacılar, muameleden 24 saat önce tozlanan *Triticum dicoccum* Khapli'nin başaklarını, 5, 10 ve 15 saatlik periyotların her biri için 3 veya 6 atmosfer basınçta N_2O muamelesine maruz bıraktıktan sonra yapay bir ortamda kültüre almışlardır. 5 saat boyunca uygulanan materyalde herhangi bir kromozom sayısı sapmasına rastlanmamıştır. 3 ve 6 atm'lik her iki muamele, 10 veya 15 saatlik basınçlar, muamele edilmiş çiçeklerden elde edilen bitkilerin yüzde 70'inde veya daha fazlasında tetraploid ve anöploidler üretmiştir. Anöploidlerin büyük çoğunluğu hipotetraploidlerden oluşmuştur. En iyi başarı, 6 atm, 15 saat süre basınçlı muamele ile elde edilmiş ve bu işlemde geçirilen çiçeklerin %98'i poliploidler ve anöploidler vermiştir [18].

Crepis capillaris bitkileri, tozlaşmış çiçeklerinde birinci veya ikinci zigotik bölünmelerinin geçtiği anda dört ila altı saat

boyunca on atmosfer basınçlı N₂O ile muamele edildiğinde, döllerinde bol miktarda poliploid ve anöploid bitkiler elde edilmiştir [24].

Zambak hibritleri (2n=2x=24) arasındaki F1 melezlerinin sekiz farklı genotipten 0.5–1 cm arası değişen çiçek tomurcukları, 24 ve 48 saat boyunca 6 bar basınçlı N₂O gazı ile muamele edilmiş, toplam 41 bitkiden; 34 triploid (2n=3x=36), 7 tetraploid (2n=4x=48) elde edilmiştir. Tamamen kısır türler arası hibritlerde fertillığın, basınçlı N₂O muameleleri ile onarılabileceği sonucuna varılmıştır [3].

Begonya çiçek tomurcuklarına hem trifluralin (10, 100 ve 1000 µM'de) hem de N₂O (basınçlı gaz şeklinde) muameleleri 2n polen oluşumunu teşvik için uygulanmıştır. 3 erkek fertil (*Begonia cucullata*, *Begonia subvillosa*, *Begonia fischeri*), 2 erkek kısır melez (*Begonia schmidtiana* × *B. cucullata* ve *B. subvillosa* × *B. cucullata*) çiçek tomurcuklarına 6 bar N₂O ile 48 saat muamele edilmiştir. Polen DNA içeriğiyle ilişkili olan polen büyüklüğü, hem N₂O hem de trifluralin muameleleri sonrasında artmış, ancak büyük polenlerin indüksiyonu genotipe bağımlı olmuştur. *Trifluralin* erkek fertil türlerde yalnızca büyük polen üretirken, N₂O muameleleri erkek kısır *B. schmidtiana* × *B. cucullata*'da verimli polen üretmiştir. Sitolojik araştırmalar, trifluralinin neden olduğu 2n gamet yerine 4n gamet ile sonuçlanan multinükleer monadları indüklediğini göstermiştir. Genel olarak, trifluralin muameleleri sonrasında elde edilen büyük polen düşük çimlenme kabiliyeti gösterirken, N₂O muameleleri sonrasında elde edilen büyük polen çimlenme kabiliyeti yüksek kalmıştır. Yükseltilmiş ploid seviyesine sahip fideler ancak, N₂O muamelelerinden elde edilen büyük polen ile melezlemeler yapıldıktan sonra elde edilebileceğinden begonya'da 2n gamet üretmek için N₂O muamelelerinin trifluralin kullanımına tercih edilebileceği belirtilmiştir [7].

Mayotik işlemi N₂O gazı ile tutarak Asya hibrit zambaklarının 2n polenini indüklemeye çalışan araştırmacılar farklı mayotik evrelerde eklenen tomurcuklu bitkilere oda sıcaklığında, 24 saat, basınca dayanıklı tüpte 6 atm basınçla (N₂O:O₂=5:1) muamele etmişlerdir. Normal zambak polen taneleri eliptik olmasına rağmen, N₂O muamelesi, küresel görünen dev polen

taneciklerine neden olmuştur. FC analizleri, dev polen tanelerinin diploid olduğunu göstermiştir. Normal ve dev polen içeren karışık polenler, tetraploid çeşitlerle melezlendiğinde, ortaya çıkan fideler tetraploid ve anöploid olmuştur. Kolhisin muamelesi yoluyla elde edilen poliploidlerin yavaş bitki gelişimi nedeniyle uzun süre çiçek vermedikleri [33], N₂O ile muamelenin, 2n zambak poleninin üretimi için yararlı olduğu ve tetraploid zambak ıslahı için yeni bir yaklaşım sağlayabileceği belirtilmiştir [2].

Arpa ve buğdayda N₂O'nun poliploidleştirici bir etmen olarak kullanımının, arpada tozlanma sonrası 4 ila 24 saat ve buğdayda tozlaşma sonrası 24 ila 48 saat arasında uygulandığında her iki türde de etkili olduğu kanıtlanmıştır. Bu aralıklarda 4 atmosfer basınçla muamele edildiğinde, arpanın %75'i ve buğday embriyolarının %54'ü poliploid olmuştur. Üretilen anöploidlerin oranı bakımından iki tür arasında belirgin bir fark bulunmuştur. Kritik muamelelerde arpada muamele edilen embriyoların %5'i anöploid iken, buğday embriyolarının %42'si anöploid olmuştur [10].

Araştırmacılar kolhisin veya N₂O kullanarak diploid takson veya hibridler ve triploid hibridlerin indüklenen kromozom katlaması yoluyla tetraploidlerin ve hekzaploidlerin elde edilebilirliğini artırmanın mümkün olabileceğini belirtmişlerdir. İndüklenmiş amfihekzaploidlerin genetik köprü olarak kullanılmasının, egzotik allelleri *Actinidia deliciosa*'ya geri melezlemek için en iyi ihtimalleri sunabileceğini ifade etmişlerdir [21].

Heterozigot *Arabidopsis thaliana* bitkilerini, homozigot, indirgenmemiş gametlerin üretileceği şekilde ikinci mayotik bölünmeyi bozan farklı muameleleri test etmek için kullanan araştırmacı, 6 bar N₂O muamelesini sırasıyla 15 saat, 24 saat, 36 saat ve 48 saat süreyle basınca dayanıklı bir kapta gerçekleştirmiştir. Sıkıştırma süresi 1.5 saat, basınç boşaltma ise bitkinin fizyolojik hasarından kaçınmak için 3 saatten fazla sürmüştür. Basınç altında N₂O uygulaması ve sıcak uygulaması ile ikinci bölünme onarımı gametleri indüklemeye çabasının başarılı olmadığını belirtmiştir. Her iki uygulamadan daha büyük polen elde edilmiş olmasına rağmen daha büyük polen üretiminin zor

olduğu, kolhisin ve oryzalin ile yapılan kimyasal işlemlerin, *Arabidopsis* bitkilerinde beklenen daha büyük poleni üretmediği ifade edilmiştir [28].

N₂O'nun, anter kültüründen genç buğday bitkilerinin kromozom katlaması üzerine etkisi araştırılmış ve kolhisin muamelesinin etkisi ile karşılaştırılmıştır. İki kolhisin muamelesi (24 saat boyunca %0.01 ve %0.005), iki N₂O muamelesi (6 atm basınçta 24 saat ve 48 saat) ile karşılaştırılmıştır. Her iki N₂O muamelesi, muamele görmüş bitkilerde tohum oluşumunu teşvik etmek için %0.01 kolhisin kadar etkili olmuştur. Bununla birlikte, kolhisin muamelesi, muamele edilmiş bitkilerin önemli bir bölümünü öldürürken, N₂O muameleleri toksik görünmemiştir. N₂O'nun kromozom katlama etkisi, düşük toksisitesi ile kombine edildiğinde, özellikle anter kültürünün erken safhalarında, haploid bitkilerin kromozom katlaması araştırmaları için kolhisine ilginç bir alternatif olabileceği ifade edilmiştir [14].

Sekiz farklı genotipten elde edilen mısır haploid fideleri, N₂O gazı (600 kPa'da 2 gün) ile muamele edilmiştir. Altı yapraklı aşamadaki (çiçek primordia oluşum evresi) muamele, püsküller ve koçanlar üzerindeki fertil bölgelerin oluşumunu önemli ölçüde artırmıştır. Böylece muamele edilen haploidlerin yaklaşık yarısı (%44) kendine tozlanmadan sonra çekirdekler üretmiştir. Kontrolde, kromozom kendiliğinden iki katına çıktığı için haploidlerin sadece %11'i kendilenmiş çekirdekler üretmiştir. Muameleden sonra verimli alanların oluşmasında güçlü bir genotipik etki gözlenmiştir. Bu yöntemin mısır ıslah programlarında kendilenmiş hat gelişimi için kullanılabileceğine vurgu yapılmıştır [16].

Mısırdaki (*Zea mays* L.) kromozom sayımı için N₂O, kolhisin, trifluralin, APM, 8-hidroksikuinolin ve sıcaklık ön-muameleleri (soğuk ve soğuk – sıcak – soğuk) karşılaştırılmıştır. Önceden hazırlanmış kök uçları, enzimatik maserasyon ve hava ile kurutularak hazırlanmış ve sayılabilir yapılar ve mitotik indeksler kaydedilmiştir. 3 saat boyunca 10 atm'de N₂O muamelesi, hazırlık başına en çok sayılabilir kromozom yapısı (preparat başına 266.5) ve ortalama 44.2 örtüşmeyen kromozom yapısı üretmiştir. 3 saat süreyle %0.04'lük 8-hidroksikuinolin ile muamele etme, orta düzeyde sayılabilir

kromozom yapıları sergilemiştir (preparat başına 53.9). Kolhisin, trifluralin, APM ve sıcaklık ön muamelelerinin etkileri sınırlı bulunmuştur [15].

Poliploid bitkiler üretmek için N₂O gazının kullanılabildiğini ancak etki mekanizmasının bilinmediğini ifade eden araştırmacılar, aktin ve mikrotübül hücre iskeletini, DAPI, FITC-bağlı tübülün antikoru ve falloidin bağlı Alexa Fluor 546 ile boyadıktan sonra flüoresan mikroskobu kullanarak, *Lilium* spp. "Asya melez zambaklar" ın N₂O ile muamele edilmiş mikrosporositlerinde gözlemlemiştir. Ayrıca, *L. longiflorum*'un mikrosporositleri N₂O muamelesini takiben asetokarmin boyama ile gözlenmiştir. Tipik metafaz I mikrotübül dağılımı, kontrol mikrosporositlerinde gözlenmiştir. N₂O ile 24 saat süreyle muamele edildikten sonra, mikrotübüller etkili bir şekilde depolimerize edilmiş; bu, kromozomların kutuplara doğru hareket etmesini engellemiş ve N₂O ile muamele edilmiş hücrelerin merkezinde kromozom tutulmasına neden olmuştur. Hücre plağı oluşumu gecikmesiz meydana gelmiş bununla birlikte diploid genomlu yavru bir hücre ve kromozom içermeyen bir başka yavru sağlamıştır. Buna ek olarak, sitokinez sırasında anormal kromozom ayrışması nedeniyle N₂O muamelesi çoğunlukla mikro çekirdeği indüklemiştir. Mikro sporositlerdeki aktin filamentleri N₂O'ya duyarsız bulunmuştur. Bu bulgulara dayanarak, aktin filament oluşumuyla değil de N₂O'nun, mikrosporosit mayozunda mikrotübül polimerizasyonunu inhibe ederek poliploidizasyona aracılık ettiğini bildirmişlerdir [19].

Triploid lalelerin, güçlü büyüme ve büyük çiçek boyutu gibi agronomik olarak istenen özelliklere sahip olduğunu ancak tüm kültüre alınmış lalelerin yalnızca bir kısmının triploid olduğunu belirten araştırmacılar, lalelerin poliploid ıslahında 2n polen elde etmek için, çiçek soğanlarına poliploidize edici etmen olan N₂O gazını uygulamışlardır. Lalelerde, anterlerdeki mayozun, ekim ayı ortasından sonuna çiçek soğanlarının içinde oluştuğunu belirtmişlerdir. Anterlerde (çiçek soğanlarından kesilen) mayoz, metafaz I'e ulaştığında, aynı klonların diğer çiçek soğanlarına 24-48 saat boyunca N₂O ile muamele etmişlerdir. Muamele edilmiş bitkilerin çoğu, n, 2n ve anöplid polen

tanelerinin bir karışımını belirten, geniş aralıklı veya bimodal boyut dağılımlı polen taneleri üretmiştir. Dev polen taneciklerinin nispeten yüksek oranını içeren polen kullanımı, nesilde daha fazla sayıda triploid getirisi eğiliminde olmuştur. Dev polen taneleri sayısının, N₂O ile muamele edilmiş polen taneleri %10 sükrözde süspanse edildiğinde ve daha sonra bir naylon elek vasıtasıyla elendiğinde artabileceği ifade edilmiştir. Bazı melez kombinasyonlarda, nispeten yüksek oranlı dev taneli polenleri içerse bile çok az poliploid gözlenmiştir. Yine de, bu düşük poliploid verimin, muhtemelen triploid bir bloktan kaynaklandığını, sebebinin diploid × N₂O ile muamele edilmiş bitkilerin melezlemelerinde elde edilen (tohum zarfı) kapsüllerin, çoğunlukla triploid olan bazı anormal tohumlar içermesi olduğunu belirtmişlerdir. Embriyo kültürünün, anormal embriyoların kurtarılmasında kullanışlı olduğunu ifade etmişlerdir. Mevcut çalışma, lale ıslahı sırasında N₂O kullanarak yüksek sıklıkta 2n polen üretilebileceğini ortaya çıkarmıştır [23].

Phalaris canariensis ve *Phalaris paradoxa* paniküllerinin çiçeklenmeden kısa bir süre sonra 4–12 saat 10 atmosfer basıncındaki N₂O ile muamelesi, neslin bazı bitkilerinde poliploidi ve anöploidiyi indüklemiştir [25].

Hordeum vulgare L.'nin (2n=14), *H. bulbosum* L. (2n=14) ile melezlemesinin, *H. bulbosum* kromozomlarının seçmeli olarak ortadan kaldırılmasıyla *Hordeum vulgare* haploidlerinin yüksek bir frekansına neden olduğu çalışmada, double haploidler, N₂O veya %0.1 kolhisin ile dimetil sülfoksit (DMSO) muameleleri olarak ve olmaksızın üretilmiştir. Tozlanmış çiçekler (*vulgare* × *bulbosum*), 21.1×10⁻³ ila 42.2 × 10⁻³ kg/m² basınç (30 ila 60 psi) altında N₂O ile muamele edilmiş, basınç ve uygulama süresine bağlı olarak double haploidlerin frekansı %0 ila %100 arasında değişmiştir. Bununla birlikte, en etkin N₂O katlama muamelesinde fidelerin sıklığı çok düşük (%0.5) olmuştur. Oysa kontrollerde tozlanan çiçeklerin %17'si fideyle sonuçlanmıştır. %0.1 kolhisin veya kolhisin + DMSO ile muamele edilen haploid fidelerde sırasıyla %37.4 ve %55.8'de katlanmış bölümler meydana gelmiştir. Tohum ayrıca, muamele edilmemiş bitkilerin 38'inden elde edilmiş ve düşük bir doğal kromozom katlama sıklığı göstermiştir. Bitki başına katlanmış filiz

oranı, kolhisin + DMSO muamelelerinde %61.6, kolhisin muameleleri için %30.8 olmuştur. Kolhisin + DMSO'nun gelişmenin erken safhalarında arpa haploidlerini katlamak için en etkili muamele olduğu belirtilmiştir [30].

N₂O ile muamele edilerek türetilmiş ototetraploid kırmızı yonca (*Trifolium pratense* L.) popülasyonunun rastgele eşlenmiş, birinci ve altıncı nesilleri (2n=28) erkek ve dişi verimliliklerindeki değişimleri belirlemek için incelenmiştir. Ölçülen karakterler kromozom eşleştirmesi, polen boyana bilirliliği ve tohum bağlama olmuştur. Test edilen her jenerasyonda yaklaşık olarak eşit sayıda anöploid (2n-1, 2n+1, 2n+2) gözlenmiştir. Bu anöploidler, sera melezlemelerindeki öploidlere kıyasla daha az boyanabilen polen ve tohum üretmiş ancak tarla korunmuş koşullar altında sadece 2n=27 genotipleri, öploid genotiplerden (2n=28) başak başına daha az tohum üretmiştir. Bununla birlikte, 27, 28 ve 30 kromozomlu klonlar, 29 kromozomlu klonlardan daha hafif tohumlar üretmiştir. Sonuç olarak, rastgele eşleşen altı kuşağın mayotik konfigürasyonların değiştirilmesi, polen boyana bilirliliği ve tohum veriminde etkisiz olduğu sonucuna varılmıştır. Bu çalışmada doğrudan karşılaştırılmasa da, anöploidlerin N₂O ve kolhisin türevli tetraploid popülasyonlarda yaklaşık aynı sıklıkta üretildiği görülmüştür. Anöploidler, tetraploid kırmızı yoncanın düşük tohum verimlerinde açık şekilde önemli bir faktör olmamıştır. Yüksek tohum verimi için doğrudan seleksiyonun anöploid eksikliği için seleksiyondan daha etkili olabileceği izlenimini uyandırmıştır [12].

Zayıf fide büyüme gücü, tamamlayıcı ot olarak Rus yabani çavdarının (*Psathyrostachys juncea* (Fischer) Nevski) (2n=2x=14) yaygın kullanımını sınırlayan önemli bir faktördür. İndüklenen poliploidinin bitki büyüme gücünü, diğer diploid türlerin özellikle fide büyüme gücünü artırdığı tespit edilmiştir. Başaklar elle emasküle edilmiş, tozlanmış, tozlanmadan 20 ila 44 saat sonra 0.5 MPa basınçta N₂O ile muamele edilmiştir. Diploid ve ototetraploid soy varsayılanlar stoma boyu, stoma sıklığı ve polen tanesi çapı ölçümlerinden belirlenmiştir. Ploidi sınıflandırması, mikrosporositlerden alınan kromozom sayıları ile doğrulanmıştır.

Dokuz melezlemeden elli iki soy elde edilmiş ancak sadece 21'i ototetraploid, bir bitki de 29 kromozoma sahip anöplöid olmuştur. Rus yabancı çavdarının N₂O ile muamele edilmesi, diploid kontroller için fide oluşumunda üstün olan soylar ile mayotik olarak kararlı ototetraploid seleksiyonlarıyla sonuçlanmıştır [4].

Begonyada farklı teknikler 2n polen üretimini indüklemek veya frekanslarını türler arası hibridizasyon, sıcaklık stresi, FC polen sınıflandırması ve N₂O veya *trifluralin* gibi hücre döngüsü bozucular ile muamelelerde olduğu gibi artırmak için test edilmiştir. N₂O muamelelerinin kullanımı çimlenebilen 2n polen ile sonuçlanmış, ancak etki genotipe bağımlı bulunmuştur. Ayrıca, bu tekniği kullanarak, erkek kısır bitkilerin canlı 2n polen üretebileceği ifade edilmiştir. *Trifluralinin* kullanımı esas olarak çimlenme kabiliyeti daha zayıf olan 4n polen ile sonuçlanmıştır. Sıcaklık koşullarındaki değişiklikler 2n polen üretiminin frekansı üzerinde etkili olmasına rağmen, diğer teknikler, 2n polen üretimi üzerinde hiç ya da çok az etki göstermiştir [6].

Pamuk fideleri, farklı yapıda beş antitübül bileşeni, kolhisin, APM, N₂O gazı, RH-4032 olarak adlandırılan bir benzamid ve yeni bir fenilsikloheksen kolhisin benzeri RH-9472 ile muamele edilmiştir. Anti-tübül bileşiklerinin üçü APM, RH-9472 ve RH-4032, senkronize edilmiş kök uçlarında 0.3 yâda daha yüksek ortalama metafaz indeksleri sağlamış ve metafaz birikimi için standart etmen olan kolhisine tercih edilmiştir. N₂O, metafaz indekslerini arttırmak için veya kromozom kümelenmesine neden olma eğiliminde olan diğer mitotik bloke edici bileşiklerle uyumlu bir şekilde hareket etmek için az kabiliyet gösterse de N₂O'nun kromozom dağılımı etkileri, yüksek kaliteli kromozom preparatlarının üretimine izin vermiştir [13].

Mısır (*Zea mays* L.), çeşitli genetik ve fizyolojik çalışmalar için model bir organizmadır. Elit kendilenmiş hattan autotetraploid hatların indüksiyonu, moleküler seviyedeki gen dozaj etkilerini araştırmak için değerlidir. N₂O gazı, mısır kendilenmiş hat Oh43'e döllenme esnasında (tozlanmadan 30–36 saat sonra) 20 saat süreyle uygulanmıştır. N₂O gazı muamelesinin 600–1000 kPa basınç arasında tetraploidleri indüklemeye etkili olduğu kanıtlanmıştır. Muamele aynı zamanda

çimlenmemiş ve büzüşmüş tanelerin oranını da önemli ölçüde artırmıştır. 12 kendilenmiş hat, tozlanmadan 30 ya da 36 saat sonra ya 800 ya da 900 kPa basınçta 20 saat N₂O gazı ile muamele edilmiştir. Test edilen 12 hattın 9'undan tetraploid ya da tetraploid sınıf anöplöid bitkiler başarıyla üretilmesine rağmen sadece 6 genotip döl üretmiştir. Anöplöidler, kırık kromozomlu bitkiler ve kimeralar da muamele görmüş materyaller arasında bulunmuştur [17].

Zambakta 4n embriyo indüksiyonu için, bitkiler tozlanmadan 13 gün sonra 6 atm'de 72 saat N₂O gazı ile muamele edilmiştir. Tozlanmış yumurtalıklara sahip bitkiler, N₂O gazı ile muamele edildikten sonra büyüdükçe görsel olarak normalleşmiş ve bu kapsüller polinasyondan 75–85 gün sonra hasat edilmiştir. Bu kapsüllerden birçok bitkicik alınmıştır. Rastgele seçilen 49 fide arasından 22'sinin FC analizi ile tetraploid olduğu ortaya çıkmıştır. Poliploid seviyesinde *Lilium* × *formolongi* ıslahı için hem erkek gamet hem de zigotik embriyo manipülasyonu için N₂O gaz muamelesinin yararlı olduğu kanıtlanmıştır [27].

Yulaf bitkileri, tozlanmadan kısa süre sonra N₂O ile muamele edilmiştir. Muamele edilmiş bitkilerin nesillerindeki anöplöidlerin yüksek sıklığı, bu tekniğin yulaf anöplöid serilerinin üretiminde yararlı bir araç olabileceğini göstermiştir [9].

Diploid kırmızı yonca (*Trifolium pratense* L.)'da kromozom katlaması üzerine N₂O etkisini belirlemek için, kesilmiş başaklara 6 bar atmosferik basınçta muamele edilmiştir. Muamele melezlemeden 24 saat sonra başlamış ve takip eden 24 saat devam etmiştir. Çiçeklenen bitkilerin %71'i polen boyutu baz alınarak tetraploid olarak sınıflandırılmıştır. Bu 136 bitkinin sonraki kök-ucu ve polen ana hücreleri kromozom sayıları 119'unun tetraploid, 3'ünün diploid, 12'sinin anöplöid olduğunu ortaya koymuştur. Kromozom sayımları yapılmadan önce iki bitki ölmüştür. Bu teknik *Trifolium alpestre* L. ve *Trifolium rubens* L.'de sırasıyla %49 ve %79 tetraploid üretmiştir. *Trifolium noricum* Wulf. ve *Trifolium pallidum* Wald. ve Kit.'in kromozom sayıları başarıyla iki katına çıkmıştır. Kromozom katlama kolaylığı ve sıklığı önemli derecede yüksek ve miksploid üretimi daha önce bildirilen kolhisin muamelelerinden daha

düşük bulunmuştur. Muamele, *Trifolium hirtum* All. ve *Trifolium heldreichianum* Hausn için toksik etki yapmıştır [31].

Datura çiçekleri, muameleden 24 saat önce emasküle edilmiş ve kesilen anterler bir petri kabında tutulmuştur. 24 saat sonra anterlerin polenleri serbest kalmış ve tozlaşma gerçekleşmiştir. Generatif çekirdeğin mitozu üzerinde c-mitotik etkileri indüklemek için, profaz veya ön-metafazın sonunda, diğer bir deyişle mitotik iğ oluşmadan önce, N₂O gaz muamelesinin verilmesinin esas olduğu bulunmuştur. Tozlanmadan 4 saat sonra 26–29°C sıcaklıkta, generatif çekirdeğin bu safhalarda olduğu tespit edilmiştir. Buna göre, 26–29°C’de bir çimlendirici içinde tutulan bitkiler tozlanmadan 4 saat sonra gaz tüpüne alınmış ve 2 saat süreyle 4, 6 veya 9 atmosfer basınca maruz bırakılmıştır. Birkaç çeşidin *Solanum tuberosum* çiçekleri emasküle edilmiş ve 24 saat sonra *Solanum phureja*’dan yeni polenle tozlanmıştır. *Solanum phureja*’daki polen tüpü mitozunun, tozlaşmadan yaklaşık 7 saat sonra 26–29°C sıcaklıkta başladığı belirtilmiştir. N₂O muamelesi 2 saat boyunca 6 veya 9 atmosfer basınçta uygulanmıştır. Muamele koşulları, *Datura* için tanımlanan koşullarla aynı olmuştur. Gaz muamelesinden sonra çiçeklerin 2 veya 3 gün sonra düşme eğilimi olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, bu etki, çiçeklerin kalikslerine veya yumurtalıklarına 6 ppm’lik konsantrasyonda bir veya iki damla 2–4–D uygulayarak düzeltilmiştir. Buna göre, tohum elde etmek amacıyla N₂O gazına maruz bırakılan bitkilere, N₂O deneyinden hemen sonra, yâda bazen 24 saat sonra böyle bir 2–4–D muamelesi verilmiştir. N₂O ile 2 saat muameleden sonra, gazın c-mitotik etkileri çok net olmuştur. *S. phureja*’da N₂O’nun metafaz kromozomları üzerindeki etkisi, pek fark edilememiştir. Gaz muamelesinden sonra sadece kromozomlar daha kısalmış gibi görünmüştür. Tek onarma sperm çekirdeği polen tüpü mitozunun N₂O muamelesinden sonra kolayca indüklenebileceği sonucuna varılmıştır. Hem *Datura* hem de *Solanum*’da, polen tüplerinin çoğunun (%70 civarı), gaz mitozun doğru evresinde uygulanıyorsa, onarma etkisi gösterdiği belirtilmiştir. Bununla birlikte, uzatılmış bir gaz muamelesiyle hepsinin etkilendiği ancak tohum elde etmek için N₂O’nun bitkiler üzerindeki genel zehirli

etkileri nedeniyle kısa bir muamele tercih edilmesi gerektiği vurgulanmıştır [24]. Muamele edilmiş *Datura* materyalindeki tohum bağlama normal bitkilerdekinden daha düşük ve kullanılan farklı basınçların (4, 6 ve 9 atmosferde) o yüzdeler üzerine açık etkisinin olmadığı görülmesine rağmen kabaca %50 ila %7 arasında değiştiği tahmin edilmiştir. Hem *Datura* hem de *Solanum*’daki makul bir tohum bağlama, mitotik olarak bozulmuş polen tüplerinin embriyo kesesini dölleye bildiğini ispatlamasa da, polen tüpü büyümesinin N₂O gaz muamelesinden etkilenmediğini kanıtlamıştır. Polen tanesinde generatif çekirdek mitozu anında N₂O uygulanırsa, üç çekirdekli polen taneli (*Gramineae*, *Chenopodiaceae*, *Compositae* vb.) bitkilerde de onarılan sperm çekirdeğinin indüksiyonunun olabileceği belirtilmiştir. Böyle muamele görmüş polenin stigma üzerine konduğunda sadece bir sperm çekirdekli bir polen tüpü oluşacağı belirtilmiştir. Dişi ebeveyn gazla muamele edilmesine gerek duymadığından, gazın toksik etkilerinden kaçınılacağı belirtilmiştir [22].

Lale çeşitliliğinin ağırlıklı olarak diploidlerden (12 kromozomdan 2 grup, 2n=2x=24), bazılarının triploidlerden (çoğunlukla Darwin hibritleri) ve nadiren tetraploidlerden (2n=4x=48) oluştuğunu belirten araştırmacılar tetraploidler, diploidlerden daha kuvvetli ve sağlam olduğu için daha fazla tetraploid elde etmek üzere araştırma yapmışlardır. Mevcut tetraploidler ile ilgili bir sorunun, dölllerinin mevsimin geç döneminde çiçeklenmiş olmaları olduğunu ve bunun onları erken zorlamak için uygun olmadığını ifade etmişlerdir. Bir hafta önce tozlanan genç tomurcukları, bir günde 5 ila 6 atmosferik basınç ile N₂O olan bir silindire yerleştirilerek tetraploid fideler elde etmişlerdir [29].

SONUÇ

Asmanın fenolojik gelişme safhaları üzerine Eichhorn ve Lorenz tarafından yapılan ayrıntılı sınıflandırma [1, 11] esas alındığında, 22 farklı dönem altında incelenen fenolojik gelişme safhalarına göre 2 ila 7 aralığındaki aşamaların mitotik poliploidizasyon, 9 ila 17 aralığındaki aşamaların ise mayotik poliploidizasyon için uygun olabileceği düşünülmektedir.

Sürgün ve kök ucu aktif bölgelerine yapılacak muamelelerde de başarı beklenebilir.

N₂O muamelesi ile asmalarda indirgenmemiş gametlerin etkin bir şekilde teşviki gerçekleştirilebilirse çekirdeksizlik, tane boyutu, erkencilik, stres idaresi, salamura yaprak kalitesi geliştirilmesi ve daha pek çok hususta gelişme kat edilecek poliploid ıslahında yeni yollar açılacaktır.

KAYNAKLAR

1. Ağaoğlu, Y.S., 2002. Bilimsel ve Uygulamalı Bağcılık (Asma Fizyolojisi-1). Kavaklıdere Eğitim Yayın No:5. Ankara. 445 s.
2. Akutsu, M., S. Kitamura, R. Toda, I. Miyajima and K. Okazaki, 2007. Production of 2n Pollen of Asiatic Hybrid Lilies by Nitrous Oxide Treatment. *Euphytica*, 155(1-2):143-152.
3. Barba-Gonzalez, R., Miller, C.T., Ramanna, M.S. and Van Tuyl, J.M., 2006. Nitrous Oxide (N₂O) Induces 2n Gametes in Sterile F₁ Hybrids Between Oriental × Asiatic Lily (*Lilium*) Hybrids and Leads to Intergenomic Recombination. *Euphytica*, 148(3):303-309.
4. Berdahl, J.D. and Barker, R.E., 1991. Characterization of Autotetraploid Russian Wildrye Produced with Nitrous Oxide. *Crop Science*, 31(5):1153-1155.
5. Brinkley, B.R. and Rao, P.N., 1973. Nitrous Oxide: Effects on the Mitotic Apparatus and Chromosome Movement in HeLa Cells. *The Journal of Cell Biology*, 58(1):96-106.
6. Dewitte, A., 2010. Exploitation of 2n Pollen to Create Genetic Variation in the Genus Begonia. PhD Thesis. Faculty of Bioscience Engineering. Ghent University.
7. Dewitte, A., Eeckhaut, T., Van Huylenbroeck, J. and Van Bockstaele, E., 2010. Induction of 2n Pollen Formation in Begonia by Trifluralin and N₂O Treatments. *Euphytica*, 171(2):283-293.
8. Dhooghe, E., Van Laere, K., Eeckhaut, T., Leus, L. and Van Huylenbroeck, J., 2011. Mitotic Chromosome Doubling of Plant Tissues *in Vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 104(3):359-373.
9. Dvorak, J. and B. Harvey, 1973. Production of Aneuploids in *Avena sativa* L. by Nitrous Oxide. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 15(3):649-651.
10. Dvorak, J., Harvey, B. and Coulman, B., 1973. The Use of Nitrous Oxide for Producing Eupolyploids and Aneuploids in Wheat and Barley. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 15(1):205-214.
11. Eichorn, K.W. and D.H. Lorenz, 1977. Phaenologische Entwicklungsstadien der Rebe. *Nachrichtenbl. Dtsch. Pflanzenschutzdienstes (Braunschweig)* 29:119-120.
12. Giri, N., N.L. Taylor and G.B. Collins, 1983. Chromosome Stability and Fertility of a Nitrous Oxide-Derived Tetraploid Population of Red Clover1. *Crop Science*, 23(1):45-48.
13. Halfmann, R.A., D.M. Stelly and D.H. Young, 2007. Towards Improved Cell Cycle Synchronization and Chromosome Preparation Methods in Cotton. *Journal of Cotton Science*.
14. Hansen, F.L., Andersen, S.B., Due, I.K. and Olesen, A., 1988. Nitrous Oxide as a Possible Alternative Agent for Chromosome Doubling of Wheat Haploids. *Plant Science*, 54(3):219-222.
15. Kato, A., 1999. Air Drying Method Using Nitrous Oxide for Chromosome Counting in Maize. *Biotechnic & Histochemistry*, 74(3):160-166.
16. Kato, A. and H.H. Geiger, 2002. Chromosome Doubling of Haploid Maize Seedlings Using Nitrous Oxide Gas at the Flower Primordial Stage. *Plant breeding*, 121(5):370-377.
17. Kato, A. and J.A. Birchler, 2006. Induction of Tetraploid Derivatives of Maize Inbred Lines by Nitrous Oxide Gas Treatment. *J. of Heredity* 97(1):39-44.
18. Kihara, H. and K. Tsunewaki, 1960. Production of Polyploid Wheat by Nitrous Oxide. *Proceedings of the Japan Academy*, 36(10):658-663.
19. Kitamura, S., M. Akutsu and K. Okazaki, 2009. Mechanism of Action of Nitrous Oxide Gas Applied as a Polyploidizing Agent During Meiosis in Lilies. *Sexual Plant Reproduction*, 22(1):9-14.
20. Kunter, B. and D.D. Karataş, 2011. Asmalarda Mutasyonlar ve Mutant *Vitis vinifera* L. Çeşitleri. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi* 21(2): 146-151.

21. McNeilage, M.A. and J.A. Considine, 1989. Chromosome Studies in Some *Actinidia taxa* and Implications for Breeding. New Zealand Journal of Botany 27(1):71–81.
22. Montezuma de Carvalho, J., 1967. The Effect of N₂O on Pollen Tube Mitosis in Styles and Its Potential Significance for Inducing Haploidy in Potato, Euphytica 16(2):190–198.
23. Okazaki, K., Kurimoto, K., Miyajima, I., Enami, A., Mizuochi, H., Matsumoto, Y. and Ohya, H., 2005. Induction of 2n Pollen in Tulips by Arresting the Meiotic Process with Nitrous Oxide Gas. Euphytica 143(1–2):101–114.
24. Östergren, G., 1954. Polyploids and Aneuploids of *Crepis capillaris* Produced by Treatment with Nitrous Oxide. Genetica 27(1):54–64.
25. Östergren, G., 1957. Production of Polyploids and Aneuploids of *Phalaris* by Means of Nitrous Oxide. Hereditas 43(3–4):512–516.
26. Özalp, Z.O. and O. Ergönül, 2013. Asma Islahında Poliploidi Çalışmaları. Trakya University Journal of Natural Sciences 14(2):103–107.
27. Sato, T., K. Miyoshi and K. Okazaki, 2009. Induction of 2n Gametes and 4n Embryo in *Lilium* (*Lilium*×*formolongi* hort.) by Nitrous Oxide Gas Treatment, 23. International Eucarpia Symposium. Section Ornamentals, Colourful Breeding and Genetics Part 2-855:243–248.
28. Shi, X., 2014. Controlling Meiosis for the Benefit of Plant Breeding. MSc thesis.
29. Straathof, T. P. and Eikelboom, W., 1997. Tulip Breeding at PRI. Daffodil and Tulip Yearbook, 8:27–33.
30. Subrahmanyam, N.C. and Kasha, K.J., 1975. Chromosome Doubling of Barley Haploids by Nitrous Oxide and Colchicine Treatments. Canadian Journal of Genetics and Cytology, 17(4):573–583.
31. Taylor, N.L., Anderson, M.K., Quesenberry, K.H. and Watson, L., 1976. Doubling the Chromosome Number of *Trifolium* Species Using Nitrous Oxide 1. Crop Science, 16(4):516–518.
32. Van Eijk, J. P. and Eikelboom, W., 1985. Aspects of Breeding for Keeping Quality in Tulipa. 3. International Symposium on Postharvest Physiology of Ornamentals 181:237–244.
33. Van Tuyl, J.M., B. Meijer and M.P. Van Diën, 1992. The Use of Oryzalin as an Alternative for Colchicine in *in vitro* Chromosome Doubling of *Lilium* and *Nerine*. 6. International Symposium on Flower Bulbs 325:625–630.
34. Younis, A., Y.J. Hwang and K.B. Lim, 2014. Exploitation of Induced 2n–Gametes for Plant Breeding. Plant Cell Reports, 33(2):215–223.
35. Yıldırım, A., Karadağ, Y., Kandemir, N., Sakin, M.A., 2005. Genetik. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayın No:64, Ders Notları Serisi No:32.