

ASMADA *IN VITRO* MİKROAŞILAMA TEKNİĞİNİN UYGULANIŞI VE KULLANIM OLANAKLARI

Nilgün GÖKTÜRK BAYDAR

Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, ISPARTA

Özet

Bu derlemede, *in vitro* mikroaşılama tekniğinin tanımı, asmada uygulanışı ve kullanım alanları konusunda detaylı bilgi verilmiştir. Büyüklüğü 0.1-0.8 mm arasında değişen sürgün ucu meristeminin, tepesi vurularak değişik şekillerde kesit açılmış vejetatif ya da generatif anaçlar üzerine steril koşullarda yerleştirilme işlemi olarak tanımlanabilen *in vitro* mikroaşılama; asmaya, anacın yetiştirilmesi, sürgün ucu meristemlerinin elde edilmesi, aşılama, *in vitro*'da aşıli bitkilerin bakımı ve mikroaşıli bitkilerin dış koşullara alıştırılması olmak üzere birbirini takip eden 5 aşamada uygulanmaktadır. Asmada *in vitro* mikroaşılama tekniği, virüs ve benzeri etmenlerden arındırılmış bitki elde etme, aşı uyumsuzluğu mekanizmasının incelenmesi, aşı yerinde meydana gelen hücre aktivitelerinin morfolojik ve anatomik olarak belirlenmesi, indeksleme çalışmalarının kısa sürede sonuçlandırılması ve hastalık etmenlerinin yayılmasını önlemeye yönelik karantina önlemleri çerçevesinde kullanılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Asma, *In Vitro* Mikroaşılama, Sürgün Ucu Meristemi, Anaç.

Application and Using Possibilities of *In Vitro* Micrografting Technique to Grapevine

Abstract

In this article, the *in vitro* micrografting technique was described and applications to grapevine were submitted in detail. *In vitro* micrografting is a technique that consists of grafting a shoot-tip meristem of 0.1-0.8 mm on top of the decapitated surface of generative or vegetative rootstocks in sterile conditions. The technique is applied to grapevine following 5 steps (obtaining of rootstocks, obtaining of shoot-tip meristems, grafting procedure, growing of micrografted plant *in vitro* and acclimatization of micrografted plants). *In vitro* micrografting is applied to grapevine for some purposes such as recovery of virus and virus-like free plants, studies on graft incompatibility mechanism, morphological and anatomical studies on cell activity of graft union, rapid diagnosis of virus and virus-like diseases and quarantine procedures.

Key Words: Grapevine, *In Vitro* Micrografting, Shoot Tip Meristem, Rootstocks.

1. Giriş

Doku kültürü tekniklerinden biri olan *in vitro* mikroaşılama; büyüklüğü türlere göre 0.1-0.8 mm arasında değişen sürgün ucu meristeminin, binoküler mikroskop altında, tohumdan ya da *in vitro* mikroçoğaltma yoluyla elde edilmiş ve tepesi vurularak değişik biçimlerde kesit açılmış anaçlar üzerine, steril koşullarda yerleştirilmesi işlemidir.

In vitro mikroaşılama tekniği, ilk olarak 1953 yılında Doorenbos tarafından sarmaşıklarda, 1956 yılında da Holmes tarafından krizantemlerde uygulanmıştır

(Jonard, 1986). Fakat asıl gelişmeler, Stubbs (1968) ile Murashige ve ark. (1972)'nin virüs ve benzeri hastalıklardan kaynaklanan ekonomik kayıplara karşı, bu hastalık etmenlerinden arındırılmış çoğaltma materyalleri elde etmek amacıyla, bu tekniği turuncgillerde uygulamaları ile başlamıştır.

Bağcılıkta *in vitro* mikroaşılama çalışmaları ise çok daha yeni olup, 1980'li yıllardan bu yana ağırlık kazanmıştır. Bu tekniğin bağcılıkta uygulanması, klonların virüs ve benzeri etmenlerden arındırılması ve temiz bitkilerle damızlık parsellerin kurulmasında diğer

yöntemlere göre daha avantajlı olmasından kaynaklanmaktadır.

Mikroaşılama, bağıcılıkta virüsten ari asma bitkileri elde etme sürecini kısaltan bir yöntem olmasının yanında, ayrıca aşı uyumsuzluğu mekanizmasının ve aşı yerinde meydana gelen değişimlerin incelenmesinde, indeksleme çalışmalarının kısa sürede sonuçlandırılmasında ve bir karantina tedbiri olarak hastalık etmenlerinin taşınmasını ve yayılmasını önlemede kullanılan önemli bir tekniktir.

2. Asmada *In Vitro* Mikroaşılama Tekniğinin Yapılışı

Oldukça yeni bir teknik olmasına karşın, önemi giderek artan, değişik sorunların çözümünü kolaylaştıran ve üstün özelliklerdeki çeşit/anaç kombinasyonlarına ait aşılı bitkilerin sağlıklı olarak kısa sürede elde edilmesine olanak sağlayan *in vitro* mikroaşılama tekniği (Gebhardt ve Goldbach, 1988), anacın yetiştirilmesi ve aşıya hazırlanması, sürgün ucu meristemlerinin elde edilmesi, aşılama, *in vitro*'da aşılı bitkilerin bakımı ve aşılı bitkilerin dış koşullara alıştırılması olmak üzere birbirini izleyen 5 aşamadan oluşmaktadır (Deograties ve ark., 1986).

2.1. Anacın Yetiştirilmesi ve Aşıya Hazırlanması

Asmada uygulanan *in vitro* mikroaşılama çalışmalarında anaç olarak, ya vegetatif ya da tohumların çimlendirilmesi ile elde edilen generatif anaçlar kullanılabilir. Asma tohumlarının, sert tohum kabuğunun yumuşatılarak, çimlenmenin uyarılması için steril saf su ya da gibberellik asit katkılı çözeltilerde 24 saat bekletilmelerinin tohumların çimlenme oranını artırdığı tespit edildiğinden (Martino, 1991; Göktürk-Baydar, 1997), bu ön uygulamanın ardından tohumlar, birçok meyve türü ile asma tohumlarının çimlenmesi üzerinde başarılı sonuçlar verdiği belirlenen (Navarro ve ark., 1975; Edriss ve Burger, 1984; Plastira, 1987; Martino, 1991) %3 sakkaroz ve %0.1

mikroçelikler kullanılmaktadır. Ancak, virüs ve benzeri etmenler çoğunlukla tohumla transfer edilemediklerinden bu etmenlerden ari olmaları ve kısa sürede aşıya hazır hale gelmeleri nedeniyle, birçok bitki türünde olduğu gibi asmada da büyük çoğunlukla generatif yani çöğür anaçlar kullanılmaktadır.

Asmada çöğür anaç olarak, 41 B M.G., Kober 5 BB, 1613 C gibi anaçların örnek olarak verilebileceği dişi çiçek yapısına sahip, dolayısıyla tohum bağlayabilen bütün anaçlar kullanılabilir de, iri ve tanedeki çekirdek sayısının fazla olması nedeniyle Vialla, bazı virüs hastalıklarının indikatör bitkisi olması nedeniyle de Mission en fazla tercih edilen anaçlardır.

Mikroaşılama çalışmalarında çöğür anaç elde etmede kullanılacak tohumların, *in vivo* ya da *in vitro* koşullarda çimlendirilmeden önce, dinlenmenin kırılması için +4°C'de 3 ay boyunca steril nemli kum içinde katlanmaları gerekmektedir. *In vitro* koşullarda çimlendirilecek tohumlar, yüzey dezenfeksiyonu için, önce %70'lik etil alkol içinde 1 dakika, daha sonra da %30'luk sodyum hipoklorit çözeltisi içinde 10 dakika tutulurlar. Bu işlem sonunda, dezenfektan maddelerin tohum yüzeyinden uzaklaştırılması için, tohumlar, her biri en az 5'er dakika olmak üzere 3 kez steril saf su ile çalkalanarak kültüre hazır hale getirilirler. Asma tohumlarının, sert tohum kabuğunun yumuşatılarak, çimlenmenin uyarılması için steril saf su ya da gibberellik asit katkılı çözeltilerde 24 saat bekletilmelerinin tohumların çimlenme oranını artırdığı tespit edildiğinden (Martino, 1991; Göktürk-Baydar, 1997), bu ön uygulamanın ardından tohumlar, birçok meyve türü ile asma tohumlarının çimlenmesi üzerinde başarılı sonuçlar verdiği belirlenen (Navarro ve ark., 1975; Edriss ve Burger, 1984; Plastira, 1987; Martino, 1991) %3 sakkaroz ve %0.1

agar katkılı Murashige ve Skoog (1962) (MS) mineral tuzlarını içeren besin ortamında çimlendirilirler. Bu besin ortamına ayrıca 0.5 mg/l gibberellik asit ilave edildiğinde çimlenme oranının daha da arttığı belirlenmiştir (Göktürk-Baydar, 1997). Hazırlanan besin ortamına steril koşullarda yerleştirilerek, sıcaklığı 25 °C ve gün uzunluğu 16 saat olarak sabit tutulmuş iklim odalarında kültüre alınan tohumlar, kültürün 3. haftasında aşya hazır hale gelirler.

İntakt olarak enfekte edilen tohumların *in vitro* koşullarda sağlıklı olarak çimlendirilmesi çoğu zaman mümkün olamamaktadır. Böyle durumlarda *in vivo* koşullarda çimlendirilmiş çöğür anaçlar da mikroaşlamada kullanılabilir. Bu amaçla tohumlar, steril perlit içinde ve sıcaklığı 25 °C olan iklim odalarında yaklaşık 3 hafta içinde çimlendirilmekte, ardından elde edilen çöğürler %10'luk sodyum hipoklorit çözeltisi içinde dezenfekte edilmektedirler.

In vitro ya da *in vivo* koşullarda yetiştirilen çöğürler daha sonra, epikotil kısmı 1-1.5 cm, kök kısmı da 2-2.5 cm uzunlukta olacak şekilde kesilerek aşya hazır hale getirilirler.

2.2. Sürgün Ucu Meristemlerinin Elde Edilmesi

Asma mikroaşlarında sürgün ucu kaynağı olarak *in vivo* (çeliklerin sürdürülmesi ile elde edilen sürgünler, sera ya da iklim odalarında yetiştirilen termoterapi uygulanmış ya da uygulanmamış bitkiler ile bağda doğal koşullarda yetiştirilen omcalardan izole edilen) ya da *in vitro* (sürgün ucu ya da tek gözlü mikroçeliklerin steril koşullarda kültüre alınmasıyla elde edilen *in vitro* bitkilerden alınan) sürgün ucu meristemleri kullanılmaktadır.

In vivo sürgün ucu meristemleri, sağlıklı ve aktif gelişme dönemindeki *in*

vivo bitkilerden alınan 2.5-3 cm uzunluğunda ve dezenfekte edilmiş sürgün uçlarından, 2 yaprak taslağını içerecek şekilde izole edilirler.

In vitro sürgün ucu meristemleri ise, sera ya da bağda yetişen omcalardan alınan sürgün uçlarının veya tek gözlü boğumların dezenfekte edildikten sonra, çeşitlere göre farklı bileşime sahip besin ortamlarında kültüre alınmaları ve yeterli sürgün ucu elde edilinceye kadar 3'er haftalık aralıklarla yapılan alt kültür çalışmaları sonucunda elde edilirler. Daha sonra bu mikro sürgünlerden, 0.3-0.8 mm büyüklüğündeki 2 yaprak taslaklı meristemler binoküler mikroskop altında izole edilerek, mikroaşlama çalışmalarında kullanılırlar.

Mikroaşlamada her iki tipteki sürgün ucu meristemleri de kullanılabilir. Ancak değişik meyve türlerinde yapılan araştırmaların bazıları *in vivo* sürgün uçlarının çok daha başarılı sonuçlar verdiğini (Navarro ve ark., 1975), bazıları da bunun tam tersini ortaya koymaktadırlar (Huang ve Millikan, 1980; Deograties ve ark., 1986; Deograties ve ark., 1991). Asmada ise, Martino (1991) ile Cupidi ve Barba (1993), *in vitro* sürgün ucu meristemlerinin asma için en uygun sürgün ucu kaynağı olduğu bildirilmişlerdir. Benzer şekilde Göktürk-Baydar ve Çelik (1999) de asma mikroaşları için *in vitro* sürgün uçlarının, bağdan alınan ya da serada çeliklerin sürdürülmesiyle elde edilen *in vivo* sürgün uçlarına göre daha başarılı sonuçlar verdiğini belirlemişlerdir.

2.3. Aşılama

Kalem ve anacın steril koşullarda birbirlerine tutturulması işleminin yapıldığı aşılama sırasında, aşı kalemi olarak kullanılan sürgün ucu meristemleri değişik şekillerde anaç üzerine yerleştirilirler. Aşılama yöntemi olarak da

ifade edilen bu yerleşim şekilleri aşağıda kısaca özetlenmiştir:

Tepeye yerleştirme aşılama yöntemi:

Anaçta epikotilin 1-1.5 cm kısaltılmasından başka herhangi bir işlem yapılmadığı bu aşılama yönteminde, sürgün ucu meristeminin taban kısmı epikotilin kesilmesi ile açıkta kalan iletim halkasına iyice temas edecek şekilde yerleştirilir.

Ters T aşılama yöntemi:

Bu aşılama yönteminde, anacın epikotilinde tepe noktasından itibaren 1 mm dikey, 1-2 mm yatay ters T şeklinde kesit açılır. Kesimlerin korteks dokusu içinde kambiyuma doğru yapıldığı bu yöntemde, sürgün ucu meristeminin taban kısmı, yatay kesimle ortaya çıkan korteks yüzeyine sıkıca temas edecek şekilde yerleştirilir.

Ters T'den parça alma aşılama yöntemi:

Ters T şeklinin bir modifikasyonu olarak geliştirilen bu aşılama yönteminde, aralarında 0.5 mm aralık olacak şekilde 1 mm uzunluğunda iki dikey ve buna paralel 1-2 mm uzunluğunda yatay kesim yapılarak, aradaki parça kambiyuma zarar vermeyecek şekilde çıkartılır. Sürgün ucu meristeminin taban kısmı da ortaya çıkan kortekse sıkıca temas edecek şekilde yerleştirilir.

Çizgi açma aşılama yöntemi:

Anaçta 1-2 mm uzunluğunda yatay bir kesim dışında herhangi bir kesimin yapılmadığı bu aşılama yönteminde, sürgün ucu meristeminin taban kısmı, gövdede açılan yatay çizgi ile ortaya çıkan korteks üzerine yerleştirilir.

Gövdeye üçgen kesim aşılama yöntemi:

Anaçta epikotilin tepe noktasının 3-4 mm altında, herbir kenar uzunluğu 0.4-0.5 mm olan dik kenar üçgen şeklinde

kesimlerin yapıldığı bu aşılama yönteminde, korteks doku parçası çıkartılır. Sürgün ucu meristeminin taban kısmı, gövdede oluşturulan dik üçgenin taban kısmında açığa çıkan korteks üzerine yerleştirilir. Daha sonra meristemin üst kısmı, anaçtan çıkarılan parça ile zarar görmeyecek şekilde yeniden kapatılır.

Aşılama işlemi, ince uçlu pens ve iğneler yardımıyla sürgün ucu meristemlerinin, bu aşılama yöntemlerinden birine göre, anaçta açılan kesit üzerine mümkün olduğunca hızlı bir şekilde yerleştirilmeleri ile gerçekleştirilir.

Sürgün ucu meristemlerinin anaç üzerine yerleştirilme şekli, bir diğer ifade ile aşılama yöntemi, mikroaşılama elde edilen başarıyı önemli ölçüde etkileyen ve bu bağlamda tür ve çeşitlere göre farklı sonuçların ortaya çıkmasına neden olan bir faktördür. Turunçgillerde ters T aşılama yönteminin tepeye yerleştirme yöntemine göre daha başarılı sonuçlar verdiğinin belirlendiği çalışmalar yanında (Murashige ve ark., 1972; Navarro ve ark., 1975; Edriss ve Burger, 1984; Deogratis ve ark., 1991); Topakbaş (1992) turunçgillerde en uygun aşılama yönteminin tür ve çeşitlere göre değiştiğini tespit etmiştir. Kiraz (Kırbayır, 1995) ve asmada (Benin ve Grenan, 1984; Martino, 1991; Cupidi ve Barba, 1993; Göktürk-Baydar, 1997) ise sürgün ucu meristeminin taban kısmının anaçta epikotilin kesilmesiyle ortaya çıkan iletim halkası üzerine iyice temas edecek şekilde yerleştirildiği tepeye yerleştirme aşılama yönteminin en uygun aşılama yöntemi olduğu saptanmıştır.

2.4. In Vitro'da Aşılı Bitkilerin Bakımı

Anılan aşılama yöntemleri ile anaç üzerine yerleştirilen sürgün ucu meristemleri, daha sonra aşının tutması ve gelişmenin sağlanması için değişik besin

ortamlarında kültüre alınır. Kullanılan temel besin ortamı, ortama ilave edilen büyümeyi düzenleyici madde tip ve konsantrasyonları ile ortamın fiziksel yapısı kültürün başarısı üzerinde son derece etkili olmaktadır.

Murashige ve Skoog (1962) tuzları ile White (1954) vitaminlerinden oluşan sıvı ortam (MS+W) turuncgillerde (Navarro ve ark., 1975) ve asmada (Martino, 1991) kullanılmaktadır. Oysa mikroaşılı bitkilerin filtre kağıtlarından yapılmış köprüler üzerine yerleştirildiği sıvı ortamların kirazlarda (Özzambak ve Schmidt, 1991) ve antepfistiklerinde (Kuyucu, 1995) hiç de iyi sonuçlar vermediği, özellikle bitkilerin toprağa şaşırtılması sırasında çoğunun kaybedildiği tespit edilmiştir. Asmada yapılan bir çalışmada da (Göktürk-Baydar, 1997), benzer şekilde büyümeyi düzenleyici madde içermeyen katı MS besin ortamının, sıvı MS+W ortamı ile katı Chee ve Pool (1987) besin ortamına göre aşı tutma oranını önemli ölçüde artırdığı belirlenmiştir.

Besin ortamlarına katılan büyümeyi düzenleyici maddelerin, aşı tutma oranları üzerine çok farklı etkileri bulunmaktadır. Nitekim şeftalilerde ortama ilave edilen naftalin asetik asit ve indol asetik asidin aşı tutma oranını artırdığı belirlenirken (Martinez ve ark., 1979); kayıslarda (Deograties ve ark., 1991), kirazlarda (Deograties ve ark., 1986) ve şeftalilerde (Jonard ve ark., 1983) ortama katılan gibberellik asit, naftalin asetik asit ve indol asetik asitin, mikroaşılıların tutma oranı üzerinde belirgin bir etkilerinin bulunmadığı tespit edilmiştir. Asmada ise Hassani (1990), büyümeyi düzenleyici maddelerin aşılama kullanılan kalem/anaç kombinasyonuna göre farklı etkilerde bulunduğunu belirlemiştir. Göktürk-Baydar (1997) ise Vialla ve Kober 5 BB üzerine aşılı Kalecik karası ve Uslu çeşitlerinde, naftalin asetik asit ve indol

butirik asitin aşı tutma oranı üzerinde olumlu bir etkisinin bulunmadığını tespit etmiştir.

Tür ve çeşitlere göre en yüksek aşı tutma oranını veren besin ortamı belirlendikten sonra bu besin ortamına yerleştirilen mikroaşılılar, daha sonra sıcaklığı 25 °C ve ışıklenme süresi 16 saat olarak ayarlanmış iklim odalarında kültüre alınarak, mikroaşılılarda sürgün ve kök gelişimi sağlanır.

2.5. Mikroaşılı Bitkiciklerin Dış Koşullara Aşırtılması

Aşılamanın ardından yaklaşık 2 ay sonra, sürgün ve kök gelişimini sağlayan mikroaşılılar, kültür tüplerinden çıkarılarak kök kısımları steril saf su içinde iyice temizlenir. Ardından içinde steril perlit ve toprak karışımı bulunan saksılara dikilirler. Nemle doymuş bir ortamdan çıktıkları için su kaybına karşı son derece hassas olan mikroaşılı bitkilerin üzerine şeffaf örtüler veya cam kavanozlar örtülerek ya da mistleme sistemi altında tutularak nem oranı yüksek bir ortamda kalmaları sağlanır. 1/8 oranında seyreltilmiş MS tuzları ile zaman zaman sulanan bitkiciklerin üzeri 8-10 gün içinde yavaş yavaş açılarak 2-3 hafta içinde tamamen dış koşullara alışmaları sağlanır.

3. Asmada Mikroaşılama Tekniğinin Uygulama Alanları

3.1. Virüs ve Benzeri Etmenlerden Arındırılmış Bitkilerin Elde Edilmesi

Virüs ve benzeri etmenler, bağlarda önemli zararlara neden olmaktadır. Bu etmenlerin neden olduğu hastalıklar, asmaların zayıflamasına, dolayısı ile gelişiminin gerileyerek verim ve kalitenin düşmesine ve giderek artan zararlanmalar

sonucu bağların tümüyle elden çıkmasına neden olmaktadır.

Kimyasal savaşım yöntemleri ile yok edilemeyen virüslerin, yayılmalarının kontrol altına alınması için, temiz toprak ve çoğaltma materyallerinin kullanılması gerekmektedir. Asma heterozigot yapı nedeniyle, vegetatif yöntemlerle çoğaltılan bir bitkidir. Oysa, virüsler en çok aşı gözü, aşı kalemi, çelik gibi vegetatif üretim materyalleri ile taşınmakta ve yayılmaktadırlar. Özellikle virüsleri latent olarak taşıyan Amerikan asmaları bulaşmada en etkin rolü oynamaktadırlar.

Virüs ve benzeri etmenlerle bulaşık bitkilerden sağlıklı bitkiler elde etmek amacıyla kullanılan termoterapi yönteminin uzun zaman alması ve bitkilerde bulunabilecek birden fazla virüs etmeninin eliminasyonunda farklı süre ve sıcaklık gerekmesi nedeniyle özellikle sıcaklığı dayanıkların patojenlerin eliminasyonunda her zaman güvenilir sonuçlar vermemektedir (Kassanis ve Posnetta, 1961; Tamer, 1988).

Bir diğer yöntem arayışının sonucu olarak geliştirilen meristem kültürü, bağcılıkta virüsten ari bitki elde etme amacıyla ya tek başına ya da termoterapi ile kombine olarak kullanılmaktadır. Ancak son yıllarda, virüs ve benzeri etmenlerden arındırılmış bitki elde etme sürecinin daha kısa ve daha etkin bir yöntem olması nedeniyle, başta Fransa, İspanya ve İtalya olmak üzere bağcılığın son derece önem taşıdığı ülkelerde meristem kültürü yerini hızla mikroaşılama tekniğine bırakmaktadır.

Sağlıklı bitkiler elde etmek amacıyla, mikroaşılama tekniği turuncgiller başta olmak üzere (Murashige ve ark., 1972; Navarro ve ark., 1975; Plastira, 1987; Tamer, 1988; Vogel ve ark., 1988; Paiva ve ark., 1993), elma (Huang ve Millikan, 1980); kiraz (Carnaggia, 1986; Deograties ve ark., 1986), şeftali (Mosella

ve ark., 1979; Navarro ve ark., 1982; Jonard ve ark., 1983; Juarez ve ark., 1988) ve bademde (Juarez ve ark., 1992) de uygulanmaktadır.

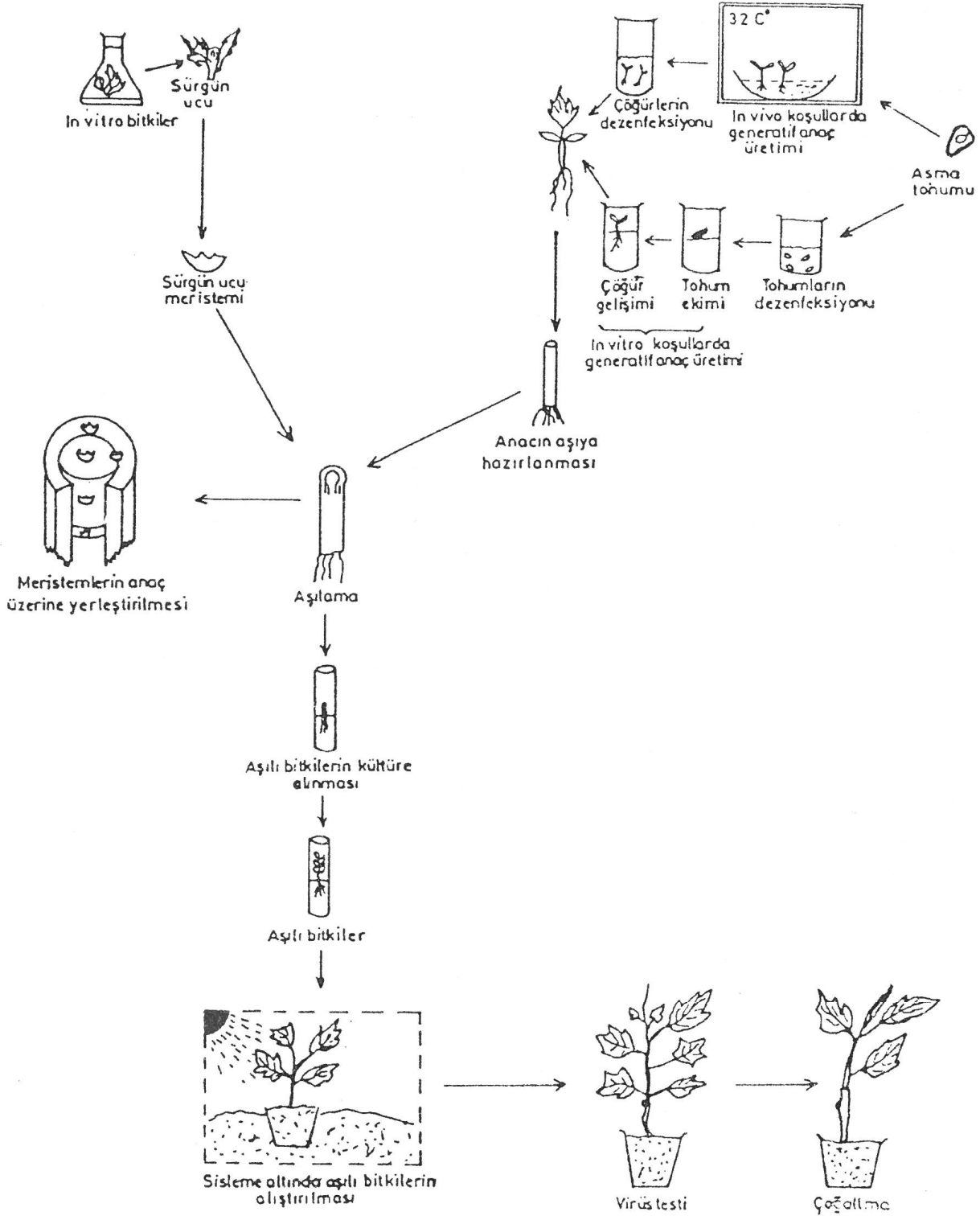
Asmada ise, özellikle yaprak kıvrıcıklığı, kısa boğum, flek ve mozaik virus gibi etmenlerden arındırılmış çoğaltma materyalleri elde etmek amacıyla (Pena-Iglesias ve Ayuso, 1980; Benin ve Grenan, 1984; Cupidi ve Barba, 1993), 1980'li yıllardan beri ağırlıklı olarak kullanılmakta olan mikroaşılama tekniği ile, sağlıklı bitkiler elde etmede izlenen işlem basamakları Şekil 1'de sunulmuştur.

3.2. Aşı Uyuşmazlığı Mekanizmasının İncelenmesi

Heterozigot yapı nedeniyle vegetatif olarak çoğaltılma zorunluluğu bulunan asmada, aşı ile çoğaltma filoksera nedeniyle, pratikte en fazla kullanılan çoğaltma şeklidir. Aşı ile çoğaltmada farklı iki yapıdaki bireyin bir araya gelmesi söz konusu olduğu için, anaç/kalem ilişkisi büyük önem taşımaktadır. Ancak farklı iki yapıdaki bireyin bir araya gelmesi her zaman başarılı sonuçlanmayabilir. Anaç ve kalem bir birey oluşturamıyor ve tek bir bitki gibi yaşamına devam edemiyorsa anaç/kalem uyumsuzluğu söz konusu olabilmektedir.

Bitki tür ve çeşitlerine bağlı olarak değişmekle birlikte, birçok belirtileri içeren, fizyolojik bir rahatsızlık olarak da ifade edilen aşı uyumsuzluğu (Bauer ve ark., 1989), birbiri ile aşılansmış iki farklı bitkinin başarılı bir birleşme meydana getirememesi olayıdır. Bu durumun tersi ise uyuşma olarak tanımlanmaktadır.

Kromozom sayılarındaki farklılıklar nedeniyle *V. rotundifolia* ile *V. vinifera* arasında görülen uyumsuzluklar dışında, aşı uyumsuzluğu asmada çok yaygın görülen bir durum değildir. Ancak her



Şekil 1: Asmada Virus ve Benzeri Etmenlerden Arındırılmış Bitki Elde Etmek İçin Kullanılan *In Vitro* Mikroaşılama Tekniğinin Uygulanışı.

üzüm çeşidi değişik anaçlar üzerinde erkencilik, ürün miktarı, kalite, gelişme kuvveti gibi özellikler bakımından farklı performans gösterebilmekte, hatta bazı durumlarda uyumsuzluğa benzer belirtiler oluşturabilmektedirler. Asmada görülen bu belirtiler, iklim ve toprak faktörlerinin anaç ve çeşidi farklı düzeylerde etkilenmelerinden, virüslerden ya da anaç ve kalemin farklı büyüme kuvvetinde olmalarından kaynaklanabilmektedir.

Asmada Jaoumet/157 R aşısı kombinasyonunda rastlanıldığı gibi (Boubals ve Huglin, 1950; Mosse, 1962), hareket halindeki bazı etmenlerin aşısı yerinden karşı tarafa taşınması nedeniyle floem bozulmalarının ortaya çıktığı ve kabuk dokusunda nekrotik bir alanın ya da kahverengi bir hattın oluşması ile tanımlanabilen "taşınan uyumsuzluk" yanında; "differe" olarak isimlendirilen farklı bir uyumsuzluk tipi daha görülmektedir. Syrah klon 101/SO4 klon 5 aşısı kombinasyonunda görülen (Grenan ve Valat, 1987) bu tip uyumsuzlukta, belirtiler bitkiler kültüre alındıktan ancak 3-4 yıl sonra görülmekte ve bunda özellikle virütik etmenlerin etkili olabileceği üzerinde durulmaktadır (D'khili ve ark., 1995).

Değişik faktörlerin etkisi altında ortaya çıkan uyumsuzluk benzeri belirtilerin incelenmesinde, *in vitro* mikroaşılama tekniği etkin bir biçimde kullanılmaktadır.

Bağda klasik yöntemlerle aşılандıklarında tomurcukların geç sürmesi, yaprak kenarlarının sararması, sürgünlerin iyi pişkinleşmemesi şeklinde uyumsuzluk benzeri belirtilerin gözlemlendiği *Vitis vinifera* x *Vitis rupestris* 3309 C anacı üzerine aşılı Chein, Cabernet Sauvignon, Colombard ve Sauvignon üzüm çeşitlerinde bu belirtilerin nedenleri üzerinde çalışan D'khili ve ark., (1994) bu amaçla mikroaşılama tekniğini kullanmışlardır.

Vitis vinifera x *Vitis rupestris* 101-14 Mgt anacını kontrol kabul ederek, yukarıda anılan çeşitleri 3309 C ve 101-14 Mgt anaçları üzerine mikroaşılama araştırmacılar, elde ettikleri bitkilerde morfolojik ve histolojik olarak uyumsuzlukla ilgili hiçbir belirtiyeye rastlanılmadığını, arazi koşullarında 3309 C anacı üzerine aşılı çeşitlerde ortaya çıkan vegetatif gelişme sorunlarının ve zayıflamanın aşısı uyumsuzluğundan değil, 3309 C anacının kuraklığa karşı çok hassas olması nedeniyle, omcalardaki su dengesinin bozulmasından kaynaklandığını belirlemişlerdir.

Yine kalem, anaç ve aşısı yerindeki peroksidaz aktiviteleri ile aşısı uyumsuzluğu arasındaki ilişkiyi mikroaşılama tekniği ile inceleyen D'khili ve ark., (1995), peroksidaz aktivitesinin sadece Jaoumet/57 R kombinasyonunda olduğu gibi uyumsuz gruplara özgü olmadığını; normalde uyşur kombinasyonlarda da aynı hatta daha fazla peroksidaz aktivitesinin görülebildiğini belirtmişlerdir.

Mikroaşılama, asmada aşısı uyumsuzluğunu mekanizmasının incelenmesinde olduğu kadar, birçok meyve türünde aşısı uyumsuzluğunun erken dönemde belirlenmesinde de kullanılmaktadır (Martinez ve ark., 1981; Jonard ve ark., 1983; Jonard ve ark., 1990).

3.3. Aşısı Yerinde Meydana Gelen Değişimlerin İncelenmesi

Aşısı yerinde histolojik çalışmalar için kullanılacak mükemmel dokular oluşturan mikroaşılama (De Lange ve ark., 1981), aşısı kaynaşması sırasındaki hücre farklılaşmasını kontrol eden faktörlerin belirlenmesinde de kullanılabilir. Asmada, mikroaşılama sonucunda aşısı yerinde oluşan hücre faaliyetleri ile

ortaya çıkan değişimlerin belirlenmesine yönelik bir araştırmada Contas ve ark. (1995), 110 R, 161-49 C ve 41 B M.G. anaçları üzerine mikroaşılanmış Palomino Fino, Pedro Ximenez ve Zalema çeşitlerinde aşı yerinde kallus oluşumunun aşılamadan 6 gün sonra gerçekleştiği ve birkaç gün içinde daha da kuvvetlendiği kaydetmişlerdir. Bu aşamadan sonra hiçbir aşılı asma bitkisinin kaybedilmediği araştırmada, iletim dokularındaki ilk bağlantının aşılamadan 8 gün sonra grldği, 12. günde bütünüyle tamamlandığı, 20-30 gün sonra da aşı yerinde kallus oluşumunun tamamen gerçekleştiği belirlenmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda, farklı çeşit/anaç kombinasyonlarına göre aşı yerinde meydana gelen değişimlerin herhangi bir farklılık göstermeksizin, bütünüyle aynı Şekilde gerçekleştiği belirlenmiştir.

Aşı yerinde meydana gelen hücre faaliyetleri ile ortaya çıkan değişimlerin incelendiği benzer çalışmalar, diğer meyve türlerinde de gerçekleştirilmiştir (De Lange ve ark., 1981; Jonard, 1986; Abboussalim ve Mantell 1992).

3.4. İndeksleme alışmalarının Kısa Srede Sonuçlandırılması

Mikroaşılama, özellikle zaman bakımından büyük avantaj sağlaması nedeniyle, virüs indeksleme çalışmaların kısa sürede sonuçlandırılması amacıyla da kullanılmaktadır.

Asmada mikroaşılama ile, damar nekrotik simtomlarının erken dönemde belirlenmesi amacıyla, damar nekrotik simtomlarının indikatör bitkisi olan 110 R anacına ait *in vitro* mikroelikler üzerine enfekte olmuş çeşitlerden alınan sürgün uçları mikroaşılanmıştır. Hastalığa ait Őiddetli simtomların, aşılamayı takip eden en az 30 gün içinde ortaya çıktığı, en son bulguların ise, aşılamadan 45 gün sonra grldği tespit edilmiştir. Hastalık

simtomlarının yapraklarda, yaprak saplarında, sürgünlerde ve bazı durumlarda da kallusta grldğinin belirlendiği araştırmada, bu indeksleme yönteminin, alışıla gelmiş yeşil aşılama tekniği ile büyük bir paralellik gösterdiği; buna karşın klasik aşılama yönteminde belirtilerin 2-3 ay gibi daha uzun bir süre sonunda görülebildiği kaydedilmiştir (D'Khili ve Grenan, 1995).

gr anaç olarak Mission kullanıldığında ise, bu anacın damar bantlaşması, sarı mozaik ve kısa boğumun indikatör bitkisi olması nedeniyle, virüssüz bitki elde etme ile indeksleme sürece aynı anda tamamlanabilmekte ve zaman açısından büyük kazanç sağlanmaktadır.

3.5. Karantina

Gerek ulusal, gerekse uluslararası düzeyde başta virüs ve benzeri hastalıklar olmak üzere, toleransın çok düşük olduğu hastalıkların bulaşımını ve yayılmasını önlemek amacıyla bir dizi önlemler alınmıştır. Yeni ışlah edilmiş üstün özelliklere sahip çeşitlerin, uluslararası alanlarda ithal edilmesi, özellikle hastalıkların yayılması bakımından büyük sakıncalar yaratmaktadır. Bu nedenle virüs ve benzeri hastalıkları ithal etme olasılığı nedeniyle, çoğu ülkeler aşı kalemi, elik gibi vegetatif çoğaltma materyallerinin ithalatını yasaklamışlar ve sadece tohumla sınırlanmasına karar vermişlerdir.

Son yıllarda kullanılan bir teknik olarak mikroaşılama ile hastalıklı aşı kalemi ithal etme olasılığı sıfıra indirilmekte ve karantina önlemleri için de büyük kolaylıklar sağlanmaktadır. Bu amaçla 3 yöntem kullanılmaktadır:

1. Kuvvetli bir anaç üzerine ithal edilen gözler aşılanır ve aşılanmış gözlerden oluşan sürgünler, serada ya da evre koşulları kontrollü iklim odalarda yetiştirilir. Bu bitkilerden elde edilen

sürgün uçları mikroaşılama kullanılır ve bu mikroaşılı bitkiler toprakta geliştiği zaman aşı kalemi kaynağı yok edilir (Navarro 1983).

2. İthal edilecek gözler *in vitro*'da kültüre alınarak çok sayıda sürgün oluşturulur. Bu sürgün uçları mikroaşılama kullanıldıktan sonra orijinal kültürler yok edilir (Roistacher 1978).

3. İthal edilmiş gözlerden doğrudan doğruya çıkarılmış sürgün uçları mikroaşılama kullanılır ve kalan bitki parçaları yok edilir (Navarro 1983).

Bu işlemler, mantar, bakteri, ile virüs ve benzeri hastalıkların çoğundan arınmış sadece 0.1-0.2 mm büyüklüğündeki küçük sürgün uçları ile yapıldığından çok emniyetli bir yöntem olmakta ve karantina bakımından büyük yarar sağlamaktadır.

Mikroaşılama tekniği, asmada sayılan bu uygulama alanları dışında, yaşlandıkça köklenme yeteneğini yitiren bitkilerden genç çoğaltma materyalleri elde etmek (Alfora ve Murashige, 1987; Pliego ve ark., 1987; Tranvan ve ark., 1991; Monteuis ve Dumas, 1992; Perrin ve ark., 1994; Monteuis, 1995); hastalık etmenlerinin hayat devresi, bitki üzerindeki etkisi gibi konularda kullanılabilme amacıyla birçok hastalık etmeni ile bulaşık bitkilerden tek bir hastalık etmenini taşıyan bitkiler elde etmek (Roistacher ve Kitto, 1977; Gonzales ve ark., 1980; Juarez ve ark., 1990); diğer doku kültürü teknikleri ile köklendirilemeyen bitki türlerinde tam bitki elde etmek (Bricolti ve Chiari, 1994; Yamamoto ve Matsumato, 1994); ve geç meyveye yatan türlerde gençlik kısırlığı devresini kısaltmak (Nauer ve ark., 1983; Kee ve ark., 1993) amaçları doğrultusunda birçok bitki tür ve çeşidinde kullanılmaktadır.

4. Sonuç

Bu derleme ile, *in vitro* mikroaşılama tekniğinin tanımı yapılarak, asmaya uygulaması ve kullanım alanları ile ilgili bilgiler verilmiş ve bu konularda yapılmış araştırmalar kısaca özetlenmiştir. Buna göre, birçok bitki türünde denenmiş ve bazı bitki türlerinde de pratik olarak kullanılmakta olan *in vitro* mikroaşılama tekniği, yukarıda maddeler halinde belirtilen amaçlara yönelik olarak başta Fransa, İspanya ve İtalya olmak üzere bağcılığın önem taşıdığı ülkelerde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu denli geniş bir yelpazede birçok sorunun çözümünde etkin rol oynayan bu tekniğin ülkemizde de yaygın olarak kullanılması, özellikle virus hastalıklarından arındırılmış yeni tesislerin kurulmasında ve bu hastalıklar nedeniyle her yıl bağlarda ortaya çıkan verim ve kalite kayıplarının önüne geçilmesi bakımından büyük önem taşımaktadır.

Kaynaklar

- Abboussalin, A. and Mantell, S.H., 1992. Micrografting of *Pistachia*. Plant Cell and Tissue Culture, 29:1321-1324.
- Alfaro, F. and Murashige, T., 1987. Possible Rejuvenation of Adult Avakado by Graftage onto Juvenile Rootstocks *In Vitro*. Hortscience, 22(6):1321-1324.
- Bauer, H., Treutter, D., Schmid, P.S., Schmitt, E. and Feucht, W., 1989. Specific Accumulation of Odiphenols in Stressed Leaves of *Prunus Avium*. Phytochemistry, 28(5):1363-1364.
- Bricolti, S. and Chiari, A., 1994. Meristem Culture and Micrografting of *Passiflora Edulis F. Edulis*. Advances In Hort. Sci., 8(3):171-175.
- Benin, M. and Grenan, S., 1984. Le Microgreffage Nouvelle Technique D'elimination des Virus de la Vigne. Le Progres Agricole et Viticole, 101:33-36.
- Boubals, D. and Huglin, P., 1950. Etude de L'incompatibilité au Greffage de Certains Cépages et du 57 Richter. Prog.Agric. Et Vitic., 67, 183-189.
- Carnaggia, D., 1986. Lateral Micrografting In Vitro in Association with Heat Treatment for the

- Regeneration of Fruit Tree Cultivars. *Fruits*, 41(9):557-561.
- Chee, R.P.A. and Pool, R.M., 1987. The Effects of Growth Substances and Photoperiod on the Development of Shoot Apices of *Vitis* cultured *In Vitro*. *Scientia Hort.*, 16:17-27.
- Contas, M., Ales, G., Troncoso, A., Perez,-Camacho, F. and Medina, M., 1995. Morphological and Anatomical Aspects of Cleft Micrografting of Grape Explants *In Vitro*. *Acta Hort.*, 388-135-139.
- Cupidi, A. and Barba, M., 1993. Ottimizzazione Del Microinnesto *In Vitro* per il Risanamento Della Vite. *Vignevini*, 4:43-46.
- De Lange, J.H., Nan, Vuuren, S.P. and Bredell, G.S., 1981. Groeipuntenting Suiwer Sitrusklone vir die Superplantskema van Viruses. *Suptropica*, 2:11-16.
- Deogratis, J.M., Lutz, A. and Dosba, F., 1986. *In Vitro* Shoot Tip Micrografting from Juvenile and Adult *Prunus Avium*, *Prunus Persica* to Produce Virus-Free Plants. *Acta Hort*. 193:139-145.
- Deogratis, J.M., Castelloni, V., Dosba, F., Juarez, J., Arregui, J.M., Ortega, C., Ortega, V., Llacer, G. and Navarro, L., 1991. Study of Growth Parameters on Apricot Shoot-Tip Grafting *In Vitro*. *Acta Hort*. 293: 363-371.
- D'kili, B., Boubals, D. and Grenan, S., 1994. Etude de L'incompatibilité au Greffage Chez la Vigne. *Prog.Agric. Et Vitic.*, 111, 351-359.
- D'khili, B. and Grenan, S., 1995. Rapid Diagnosis of Vein Necrosis Diseases by *In Vitro* Technique. *Journal Int. Des Sciences De La Vigne Et Du Vin*. 29(1):11-15.
- D'khili, B., Michaux-Ferriere, N. and Grenan, S., 1995. Etude Histochemique de L'incompatibilité au Microgreffage et Greffage de Bouters Herbacées Chez la Vigne. *Vitis*, 34(3):135-140.
- Edriss, M.H. and Burger, D.W., 1984. Micrografting Shoot-Tip Culture of Citrus on Tree Trifoliate Rootstocks. *Scientia Hort*. 23:255-259.
- Gebhardt, K. and Goldbach, H., 1988. Establishment, Graft Union Characteristics and Growth of *Prunus* Micrografts. *Physiol. Plant*, 72:153-159.
- Grenan, S. and Valat, C., 1987. Incompatibilité au Greffage D'un Clone de Syrah. IV. Émé Symp. Intern. De La Sélection Clonale, 1 Au.-4 Sep. 1986. Nyons-Changins. la Recherche Agronomique En Suisse, 3(26), 317-319.
- Gonzales, M., Pena, I. and Rodriguez, I., 1980. Influencia de Patrones Medios Nutritivos Sobre el Prendimiento 4. de Sorolle *In Vitro* de Injerto de Apices Para la Obtencion de Plantas Libres del Viroide de la Exocortis a Partir de un Clan Citrus Limon Infestada. *Agrotecnia de Cuba*, 12:67-76.
- Göktürk-Baydar, N., 1997. Bağcılıkta *In Vitro* Mikroaşılama Tekniği ile Çoğaltma Üzerinde Araştırmalar. Ankara üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri anabilim Dalı Doktora Tezi, Ankara.
- Göktürk-Baydar, N. ve Çelik, H., 1999. Asmada (*Vitis vinifera* L.) Sürgün Ucu Kaynağının *In Vitro* Mikroaşılamada Başarı Üzerine Etkileri. TUBITAK Tarım ve Ormanlık Dergisi, 23 (Ek Sayı 3), 741-747.
- Hassani, Z., 1990. Influence de L'acide Béta Indole-Butyrique sur le Comportement des Microgreffes de Vigne Cultivées *In Vitro*. *Progres Agricole et Viticole*. 107(17):375-379.
- Huang, S.C. and Millikan, D.F., 1980. *In Vitro* Micrografting of Apple Shoot Tips. *Hortscience*, 15(6):741-743.
- Jonard, R., Hugard, J., Macheix, J.J., Martinez, J., Chancel, L.M., Bessel, J.L. and Villemur, P., 1983. *In Vitro* Micrografting and its Applications to Fruit Science. *Scientia-Hort.*, 20:147-149.
- Jonard, R., 1986. Biotechnology in Agriculturae and Forestry. Chapter III. Micrografting and its Applications to Tree Improvement. 1:31-48.
- Jonard, R., Lukman, D., Schall, F. and Villemur, P., 1990. Early Testing of Graft Incompatibilities in Apricot and Limon Trees Using *In Vitro* Techniques. *Scientia Hort*. 43:117-128.
- Juarez, J., Arregui, J.M., Camarasa, E., Cambra, N., Llacer, G., Ortega, C., Ortega, V. and Navarro, L., 1988. Recovery of Virus-Free Peach Trees from Selected Clones by Shoot-Tip Grafting *In Vitro*. *Acta Hort*. 35:77-83.
- Juarez, J., Arregui, J.M., Deogratis, J.M., and Navarro, L., 1990. Shoot-Tip Grafting *In Vitro* Temperature Stone Fruit Trees. VIIth Int. Cong. On Plant Tissue and Cell Culture, June 24-29. 119 P. Amsterdam.
- Juarez, J., Camarasa, E., Ortega, V., Arregui, J.M., Cambra, N., Llacer, G. and Navarro, L., 1992. Recovery of Virus-Free Almond Plants by Shoot-Tip Grafting *In Vitro*. *Acta Hort*. 309: 393-400.
- Kassanis, B. and Posnetta, P., 1961. Thermoterapy of Virus Infected Plant Recents. *Adv.Bot.*, 1:557-563.
- Kee, S., Cai, O. and Skirvin, R.M., 1993. Micrografting speeds growth and Fruiting of Protoplast Derived Clones of Kiwifruit (*Actinidia deliciosa* L.). *J. of Hort. Sci.*, 68(6):837-840.
- Kırbayır, T., 1995. Bazı Kiraz Çeşitlerinin (*Prunus Avium*) Mikroaşılama Yöntemiyle Çoğaltılmaları. A.Ü. Fen Bilimleri Ens. Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- Kuyucu, S., 1995. Antepfistiklarının *In Vitro* Koşullarda Mikroaşılanması. Ç.Ü. Fen Bilimleri Ens. Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Adana.
- Martinez, J., Hugard, J. and Jonard, R., 1979. Sur Differentes Combinations de Greffages des Apex Realises *In Vitro* Entre le Peach (*Prunus Persica*), Abricotier (*Prunus Armeniaca*) et Myrobalan

- (*Prunus Cerasifera*). C.R. Acad. Sc. Paris. 288:759-762.
- Martinez, J., Poessel, J.L., Hugard, J. and Jonard, R., 1981. L'utilisation du Microgreffage *In Vitro* Pour L'étude des Greffes Incompatibles. C.R., Acad. Sc. Paris, 294-964.
- Martino, L., 1991. II. Microinnesto *In Vitro* Della Vite. *Petria*, 2(Supplemento1) :17-25.
- Mosella, Ch.L., Riedel, M. and Jonard, R., 1979. Sur Amélioration Apportées aux Techniques de Microgreffage des Apex *In Vitro* Chez les Arbres Fruitières. Cas du Pecher (*Prunus Persica* Batsch), C.R. Acad. Sc. Paris, 289:505-508.
- Montennius, O. and Dumas, E., 1992. Morphological Features as Indicators Maturity in Acclimatized *Prunus pinaster* from Different Origins. *Canadian J. of Forest Reseach*, 22 (9):1417-1421.
- Monteuus, O., 1995. *In Vivo* Grafting and *In Vitro* Micrografting of *Acacia Mangium*: Impact of Ortet Age. *Silvae-Genetica*, 44(4):190-193.
- Mosse, B., 1962. Graft-Incompatibility in Fruit Trees. *Commun. Comm. Bur. Hort. Plant. Crops*, 28.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant*, 15:473-497.
- Murashige, T., Bitters, W.P., Rangan, T.S., Nauer, E.M., Roistacher, C.N. and Holliday, P.B., 1972. A Technique of Shoot Apex Grafting and its Utilization Towards Recovering Virus-Free Citrus Clones. *Hortscience*, 7:118-119.
- Nauer, E.M., Roistacher, C.N., Carson, T.L. and Murashige, T., 1983. *In Vitro* Shoot-Tip Grafting To Eliminate Citrus Viruses and Virus-Like Pathogens Produces Uniform Bud Lines. *Hortscience*, 18(3):308-309.
- Navarro, L., Roistacher, C.N. and Murashige, T., 1975. Improvement of Shoot Tip Grafting *In Vitro* for Virus-Free Citrus. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 100(5):471-479.
- Navarro, L., Llacer, G., Cambra, M., Arregui, J.M. and Juarez, J., 1982. Shoot-Tip Grafting *In Vitro* for Elimination of Viruses in Peach Plants (*Prunus Persica* Batsch). *Acta Hort.* 130:185-192.
- Navarro, L., 1983. Citrus Shoot-Tip Grafting *In Vitro* (STG) and its Applications. A Review 452-456. In: K. Matsumoto (Ed). *Proc. Int. Soc. Citriculture*, Vol:1 Nov.9-12, 1981. Tokyo-Japan.
- Özambak, E. and Schmidt, H., 1991. *In Vitro* and *In Vivo* Micrografting of Cherry (*Prunus Avium*). *Gartenbauwissenschaft* 56(5): 221-223.
- Paiva, L.V., Carvalho, S.A.-De, Souza, M.-De, De-Carvalho, S.A. And De-Sauza, M., 1993. Obtaining A Virus-Free "Seleta Folha Murcha" Through Micrografting *In Vitro*. *Pesquisa-Agropecuaria-Brasileira*, 28(11):1341-1344.
- Pena-Iglesias, A. And Ayuso, P., 1980. Shoot Apex (Meristeme) Micrografting And Indexing Of Infected Grapevine Varieties At The Same Time. P.333-338. In: A.J. McGinnis (Ed). *Proc. 7th Meet. Int. Council Virus-Like Diseases Grapevine*, Canada.
- Perrin, Y., Lardet, L., Enjalric, F. And Carron, M.P., 1994. Rejeunissement De Clones Matures D'*Hevea Brasiliensis* (Mull. Arg.) Par Microgreffage *In Vitro*. *Canadian J. Of Plant Science*, 74(3):623-630.
- Plastira, V., 1987. Application of the Method of Micrografting Mandarin Cultivar Clemantine Poros to Obtain Virus-Free Plants. *Annales-De-Institut-Phytopath. Que-Benaki*, 15(2):95-108.
- Pliego, A., Alfora, F. and Murashige, T., 1987. Possible Rejuvenation of Adult Avocado by Graftage onto Juvenile Rootstocks *In Vitro*. *Hortscience*, 22(6):1321-1324.
- Roistacher, C.N. and Kitto, S.L., 1977. Elimination of Additional Citrus Viruses by Shoot-Tip Grafting *In Vitro*. *Plant. D.S. Rep.*, 61:594-596.
- Roistacher, C.N., 1978. Elimination of Citrus Pathogens in Propagative Budwood. 1. Budwood Selection, Indexing and Thermotherapy, *Proc. Int. Soc. Citriculture*, 3:965-972.
- Stubbs, L.L., 1968. Apparent Elimination of Exocortis and Yellowing Viruses in Lemon by Heat Therapy and Shoot Tip Propagation. In: J.F.L. Childs (Ed). *Proc. 4th Cong. Int. Organ Citrus Virol.*, Univ. of Florida, Press-Gainesville.
- Tamer, İ., 1988. Virüs ve Virüs Benzeri Hastalık Etmenlerinin Navel Portakallarından Arındırılması. *Ç.Ü. Fen Bilimleri Ens. Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı Doktora Tezi*, Adana.
- Topakbaş, M., 1992. Turunçgil Çeşitlerinde Mikroaşılama Tekniğinde Kullanılan Farklı Kesim Şekillerinin Aşıda Başarı Üzerine Etkileri. *Ç.Ü. Fen Bilimleri Ens. Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi*, Adana.
- Tranvan, H., Bardat, F., Jacques, M. and Arnaud, Y., 1991. Rejeunissement chez le *Sequoia sempervirens*: Affect du Microgreffage *In Vitro*. *Canadian J. of Botany*, 69(8):1772-1779.
- Vogel, R., Nicoli, M. and Bove, J.M., 1988. *In Vitro* Meristem Micrografting Used in Corsica for Regenerating Citrus Varieties. *Fruits*, 43(3):167-173.
- White, P.R., 1954. *The Cultivation of Animal and Plant Cell* Ronald Press. New York, 239 P.
- Yamamoto, Y. and Matsumoto, O., 1994. Inhibition of Recalling and Promotion of Shoot Formation of Adventitious Buds in *Solanum melongena* by Micrografting. *J. Japanese Soc. Hort. Sci.*, 63(1):67-72.