

CEVİZ AŞILARINDAN KESİT ALINMASINDA MİKRO-DALGA TEKNİĞİNDEN YARARLANMA İMKANLARI¹

Fikri BALTA²

M. Atilla AŞKIN³

ÖZET

Çeşitli anatomik çalışmalarda parafin tekniği yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, parafin tekniği modifiye edilerek geliştirilen Mikro-dalga yöntemiyle, ceviz (*Juglans regia* L.) aşılarından amaca uygun nitelikte ve kısa sürede kesit alma imkanları araştırılmıştır. Bu amaçla, klasik parafin tekniği ve Mikro-dalga tekniğine göre ayrı ayrı kesitler alınarak, bu iki teknik karşılaştırılmıştır. Rotary mikrotomla omega aşılarından 9-12 mikron arasında değişen enine boyuna ve boyuna kesitler alınarak, Mikro-dalga tekniğinin klasik yöntemle göre daha kısa sürede sonuca ulaştırıldığı gözlenmiştir. Bu tekniğin, benzer çalışmalara uyarlanabileceği tavsiye edilmiştir.

GİRİŞ

Gerek aşılamayla gerekse bahçe bitkileriyle ilgili çeşitli anatomik çalışmalarda, kesitlerin daimi preparat haline getirilmesinde parafin tekniğinden yaygın olarak yararlanılmaktadır (1,3,5,7). Ne var ki, materyalin parafine doyurulması bakımından, bu tekniğin uzun zaman alması (1,3), göz ardı edilemeyecek bir dezavantaj teşkil etmektedir. Dolayısıyla, bu gibi araştırmalarda kısa sürede sonuca ulaştıracak tekniklerden yararlanılması önem taşımaktadır. Buna yönelik ilk çalışmalar ülkemizde Aşkın ve ark. (2,6) tarafından başlatılmış ve bahçe bitkileri preparasyon tekniği uygulamalarında yeni ve hızlı bir yöntem olan Mikro-dalga (Mikro-Wave) yönteminin, preparat kalitesini bozmadan

preparasyon süresini önemli ölçüde kısalttığı saptanmıştır. Bunun yanında, bu yöntemden faydalanılarak kestane (*Castanea sativa* Mill.) aşılarından amaca uygun nitelikte enine ve boyuna kesitlerin alındığı tespit edilmiştir (4).

Bu çalışmada, omega ceviz aşılarından kesit alınmasında, Mikro-dalga tekniğinin uygulanabilme imkanları araştırılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Bu çalışma, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümüne ait kontrollü aşılama tesisleri ile bölüm laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

1. Yayın Kuruluna geliş tarihi: Ocak 1996

2. Yrd. Doç. Dr., Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, VAN

3. Doç. Dr., Ege Üniversitesi, Ödemiş Meslek Yüksekokulu, Ödemiş-İZMİR

Materyal

Van ekolojik şartlarında yetiştirilen iki yaşlı ceviz (*Juglans regia* L.) çöğürleri ile Adilcevaz ilçesinde (Bitlis) seleksiyon neticesinde seçilen 13 AD 01 nolu ceviz tipinin kalemeleri, denemenin aşı materyalini oluşturmuştur. Aşılar, omega aşı tekniğiyle yapılmıştır. Aşı bölgelerinden kesilen küçük parçacıklara yapılan muameleler Imperial marka Mikro-dalga (Mikro-Wave) fırında gerçekleştirilirken, kesitler Rotary Mikrotomla alınmış ve preparatların incelenmesi ve fotoğraf çekimi için Olympus BH-2 fotomikroskop kullanılmıştır. Mikro-dalga fırında yapılan muameleler için, çeşitli alkol ve ksilol çözeltileri ile sert doku parafini kullanılmıştır.

Metot

Muameleler için aşı örneklerinin hazırlanması

İncelenen materyalin parafinle doyurulmasını kolaylaştırmak amacıyla, Omega aşı tekniğiyle yapılan aşıların önce aşı bölgeleri kesilmiş ve kesit alınmaya kadar % 70'lik Etil alkol içerisinde bir süre bekletilmiştir. Daha sonra kesilen bu parçalar, aşı kaynaşma bölgelerini

içine alacak şekilde ve ayrıca enine ve boyuna kesitler alınacak biçimde, keskin jilet yardımıyla küçük parçacıklara bölünmüştür. Gerek klasik parafin yöntemi gerekse Mikro-dalga yöntemi için gerekli muameleler, bu parçacıklara uygulanmıştır.

Parafin tekniğinin uygulanması

Kesilen parçacıklara uygulanan parafin yöntemi ve bu yöntemdeki işlem basamakları Cetvel 1'de verilmiştir.

Mikro-dalga (Mikro-Wave) tekniğinin uygulanması

Bu tekniğin uygulanmasında Imperial marka Mikro-dalga fırından yararlanılmıştır. Parafin yöntemindeki işlem basamakları mikro-dalga fırına modifiye edilmiş ve amaca uygun yöntem geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla öncelikle, materyalin dokusuna ve Mikro-dalga fırında muamele sırasında çözeltilerin ısınma durumlarına uygun olarak, aynı uygulamaların tekrarı şeklinde çeşitli muamele sayıları ve süreleri denenmiştir. Daha sonra, bu şekilde parafine doyurulan örneklerden kesit alınıp alınmadığı kontrol edilmiştir. Parçalanmadan kesit almaya cevap veren muamele sayıları ve süreleri belirlenerek, Cetvel 2'de sunulmuştur. Mikro - dalga

Cetvel 1. Parafin yöntemine göre örneklere sırayla uygulanan muameleler

Table 1. The treatments to made in order by the paraffin method

Muamele sırası <i>Treatments in rows</i>	Muameleler <i>Treatments</i>	Süre <i>Time</i>
1	% 80 etil alkol <i>80 % ethyl alcohol</i>	4 saat <i>hour</i>
2	% 90 etil alkol <i>90 % ethyl alcohol</i>	1 saat <i>hour</i>
3	Saf etil alkol <i>Pure ethyl alcohol</i>	1 saat <i>hour</i>
4	3 kısım saf alkol + 1 kısım ksilol <i>3 volumes pure ethyl alcohol + 1 volume xylol</i>	2 saat <i>hour</i>
5	2 kısım saf alkol + 2 kısım ksilol <i>3 volumes pure ethyl alcohol + 1 volume xylol</i>	2 saat <i>hour</i>
6	1 kısım saf alkol + 3 kısım ksilol <i>3 volumes pure ethyl alcohol + 1 volume xylol</i>	2 saat <i>hour</i>
7	Ksilol <i>Xylol</i>	2 saat <i>hour</i>
8	Ksilol hacminin 1/3'ü kadar parafin ilavesi <i>Paraffin adding as volume as 1/3 of xylol volume</i>	1 gün <i>day</i>
9	62°C'deki Etüvde doyurma <i>Saturation with paraffin in the drying cupboard at</i>	1.5-2 ay <i>month</i>

Cetvel 2. Mikro-dalga (Mikro-wave) tekniğinin uygulanışında takip edilen işlemler.
Table 2. The followed treatments in applying the Micro-wave technique.

İşlem Sırasına Göre Muameleler <i>Treatments by procedure series</i>	Muamele Sayısı <i>Numbers of treatments</i>	Muamele Ortamı ^z <i>Treatment media</i>	Muamele Süresi <i>Treatment duration</i>	Soğutma İşlemi ^y <i>Cooling procedure</i>
1. Alkol Serileri <i>(1.Series of alcohols)</i>				
% 70 Etil alkol	5	Mikro-dalga	1 dak.	1-2 dak.
% 80 Etil alkol	5	Mikro-dalga	1 dak.	1-2 dak.
% 90 Etil alkol	5	Mikro-dalga	1 dak.	1-2 dak.
Saf etil alkol	5	Mikro-dalga	1 dak.	1-2 dak.
2. Alkol ve ksilol serileri <i>(2.Series of alcohols and xylols)</i> Etil alkol (hacim)+Ksilol (hacim) <i>Ethyl alcohol (volume)-Xylol (volume)</i>				
3 + 1	2	Mikro-dalga	1 dak.	1-2 dak.
2 + 2	12	Mikro-dalga	1 dak.	1-2 dak.
1 + 3	12	Mikro-dalga	1 dak.	1-2 dak.
Saf ksilol (Pure xylol)	12	Mikro-dalga	1 dak.	1-2 dak.
3. Ksilol ve parafin serileri <i>(3. Xylol and paraffin series)</i> Ksilol (hacim)+Parafin (hacim) <i>Xylol (volume) and paraffin (volume)</i>				
5 + 1	12	Mikro-dalga	1 dak.	1-2 dak.
5 + 2	12	Mikro-dalga	1 dak.	1-2 dak.
5 + 5	12	Mikro-dalga	1 dak.	1-2 dak.
2 + 5	12	Mikro-dalga	1 dak.	1-2 dak.
1 + 5	15	Mikro-dalga	1 dak.	1-2 dak.
Parafin (paraffin)	20	Mikro-dalga	1.5 dak.	1-2 dak.

Mikro-dalga (Micro-wave) Dak. (min.)

^z Mikro-dalga fırın, alkol serileri için % 30 güç'de (3. kademe), diğer seriler için % 40 güç'de (4. kademe) çalıştırılmıştır.

Micro-wave oven was plied at 30 % power (third step) for alcohol series, and at 40% power for other series.

^y Mikro-dalga fırında öngörülen süreyle muamele sırasında, alkol ve ksilol çözeltileri çok çabuk ısındıkları için, başlangıçtaki uygulamalar dışında, her bir mikro-dalga muamelesinden sonra, herhangi bir tehlikeye neden olmamak için en az muamele süresi kadar soğutma işlemi yapılmıştır.

During the treatments for recommended times in the Micro-wave oven, because of quick warming of alcohol and xylol solutions, cooling procedure as time as treatment duration at least after each treatment was made so that any danger is not given opportunity, except for treatments at the beginning.

fırın çalıştırılırken, alkol serileri için % 30 güç (3. kademe), diğer seriler için iise % 40 güç (4. kademe) kullanılmıştır.

Cetvel 2'de görüldüğü gibi materyal, Mikro-dalga fırında sırasıyla çeşitli alkol, alkol-ksilol ve ksilol-parafin serilerine tabi tutulmuştur. Muameleler esnasında, örnek kapları ve çözeltiler çok çabuk ısındıkları için, muamelelerden sonra en az muamele süresi kadar, herhangi bir tehlikeli duruma neden olmamak için soğutma işlemi uygulanmıştır.

Kesitlerin alınması, boyanması ve incelenmesi

İki farklı yöntemle göre muamele gören aşırı örnekleri, enine ve boyuna kesitler alınacak biçimde parafin bloklara yerleştirilmiştir. Bu

bloklardan rotary mikrotomla enine ve boyuna alınan kesitler, yaklaşık 45 °C'lık sıcak su banyosunda açılmışlardır.

Kesitler üzerindeki dokuların boyanması amacıyla, Safranin (tekli boyama) ve Safranin/Fast Green (ikili boyama) olmak üzere, iki farklı boyama yapılmıştır. Klasik parafin yöntemine göre alınan kesitlerde Safranin/Fast Green ikili boyama, Mikro-dalga tekniğine göre alınan kesitlerde ise Safranin tekli boyama gerçekleştirilmiştir. Boyamalarda, Cetvel 3'de gösterilen işlem basamakları takip edilmiştir. Safraninle yapılan tekli boyamada, 13. muamele yapılmamıştır.

Kesitlerin incelenmesi ve fotoğraf çekimi için, Olympus BH-2 marka fotomikroskop kullanılmıştır.

Cetvel 3. Safranin/Fast Green ikili boyamada takip edilen işlem basamakları

Table 3. The followed treatment steps for double staining with Safranin/fast green.

Muamele Sırası Treatments in rows	Muameleler Treatments	Süre Time
1	3 kısım ksilol + 1 kısım saf etil alkol 3 vol. xylol + 1 vol. pure ethyl alcohol	8 dak.
2	2 kısım ksilol + 2 kısım saf etil alkol 2 vol. xylol + 2 vol. pure ethyl alcohol	8 dak.
3	1 kısım ksilol + 3 kısım saf etil alkol	8 dak.
4	Saf etil alkol Pure ethyl alcohol	1 dak.
5	% 90 etil alkol Ethyl alcohol	5 dak.
6	% 80 etil alkol Ethyl alcohol	5 dak.
7	% 70 etil alkol Ethyl alcohol	5 dak.
8	% 1'lik safranin Safranin	45 dak.
9	Çeşme suyunda yıkama Washing in tap water	1.5 dak
10	% 0.5'lik pikrik asit Picric acid	1.5 dak.
11	Birkaç damla amonyak damlatılmış Added few drops amo % 96'lık etil alkol Ethyl alcohol	1.5 dak.
12	% 96'lık etil alkol Ethyl alcohol	10 sn.
13 ^z	% 1'lik Fast Green	10 sn.
14	1 kısım ksilol + 1 kısım saf etil alkol 1 vol. xylol + 1 vol. pure ethyl alcohol	15 sn.
15	Birkaç damla ksilol damlatılmış saf etil alkol Pure ethyl alcohol with few drops of xylol	2-3 sn.
16	Ksilol'e alma ve Entellan ile kapama Transfer to xylol and cover with Entellan	

^z Safraninle tekli boyamada, bu muamele yapılmamıştır.

This treatment was not used for single staining with safranin.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Anatomik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmakta olan parafin yönteminin modifiye edilmesi sonucu geliştirilen ve ceviz aşılarında tatbik edilen Mikro-dalga tekniğiyle, amaca uygun enine ve boyuna kesitler seri halde kolaylıkla alınmıştır. Gerek rotary mikrotomla 9-12 mikron arasında değişen enine ve boyuna kesitlerin alınması, gerekse alınan kesitlerin boyanması başarıyla gerçekleştirilmiştir. Diğer taraftan, klasik parafin yöntemiyle etüvde 1.5-2 ay parafine doyurulan örneklerden de 12-18 mikron arasında değişen kesitler alınmıştır. Ancak bu yöntemle, seri kesitler alınamamış ve özellikle alınan enine kesitlerde parçalanmalar gözlenirken, kesitlerin sıcak su banyosunda açılması zorluklarla karşılaşmıştır. Oysa, Mikro-dalga fırında çeşitli alkol, ksilol ve parafin serilerine tabi tutulan aşı parçacıklarından, klasik yöntemle göre doyurulan materyallere göre, hem daha seri hem de daha ince enine ve boyuna kesitlerin alınması mümkün olmuştur. Her iki teknikle de alınan kesitler incelenmeye uygun bulunmakla beraber, mikro-dalga fırında muamele gören materyalden alınan kesitler üzerinde dokular daha belirgin şekilde görülmektedir (Şekil 1, 2, 3, 4).

Öte yandan, Mikro-dalga fırında muamele gören tüm aşı parçacıklardan, aynı serilikte kesitler alınamamış ve özellikle büyük olan parçacıklardan kesitlerin alınmasında zaman zaman kesitlerde parçalanmalar görülmüştür. Dolayısıyla, mikrotomla seri kesitler halinde kesitler alınmasını, parçacıkların büyüklükleri ile bloklara enine ve boyuna yerleştirilme şekli etkilemiştir. Genel olarak boyuna kesitler, enine kesitlere göre daha kolay ve daha seri bir şekilde alınmıştır. Klasik parafin yöntemine göre işlem gören parçacıklarda ise, amaca uygun kesitler alınmakla birlikte, zaman zaman doku parçalanmaları gözlenmiştir.

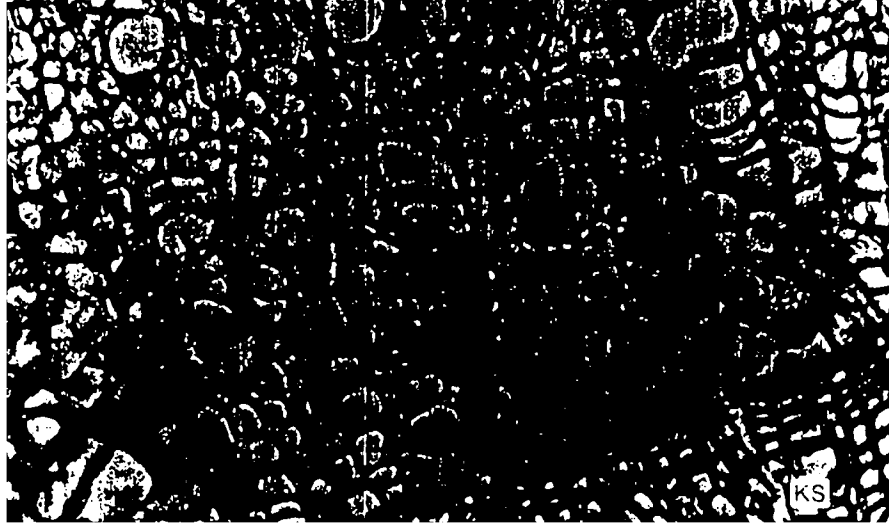
Araştırmada, Mikro-dalga fırında aşı parçacıklarına uygulanan muameleler sırasında, örnek kaplarında ve çözeltilerinde ısınmalar gözlenmiştir. Bu nedenle, hem örneklerin aşırı derecede ısınmalarına, parçalanıp bozulmalarına sebebiyet vermemek hem de herhangi bir tehlikeli duruma meydan vermemek için, soğutma işlemleri yapılmıştır. Bu husus, ihmal edilmemesi ve titizlikle uyulması gereken önemli bir nokta olarak

değerlendirilmiştir. Mikro-dalga fırında muamele süreleri ayarlanırken, bu önemli noktaya dikkat edilerek, uygun muamele süreleri saptanmıştır.

Şekil 1, 2 ve 3 'de Mikro-dalga tekniğine göre işlem görmüş aşı materyallerinden rotary mikrotomla alınmış enine ve boyuna kesitlerden örnekler sunulmuştur. Şekil 1'de, aşılama 25 gün sonrasına ait olan ve aşı bölgesinden alınmış enine kesitte; kallus hücreleri, hücreler arasındaki nekrotik tabakalar, aşı bölgesinin anaç tarafında farklılaşmakta olan yeni ksilem elemanları görülmektedir. Şekil 2'de, aynı döneme ait bir boyuna kesitte, aşı elemanları arasında tesis edilmiş kallus köprüsü üzerinde yeni farklılaşmakta olan dokular kolaylıkla ayırılabilir. Aynı şekilde, Şekil 3'de aşı elemanlarının boyuna birleşme bölgesinden alınmış bir boyuna kesitte, kavimli olarak sağlanmış kambiyal devamlılık ile farklılaşmakta olan yeni dokular görülebilmektedir. Şekil 4'de ise klasik yöntemle göre alınmış bir enine kesit üzerinde, aşı bölgesindeki dokular görülmektedir. Şekillerde görüldüğü gibi, Mikro-dalga tekniği, amaca uygun nitelikte kesitlerin alınabilmesine ve hatta gerek aşı kaynaşma bölgesinde oluşan yeni dokuların gerekse kesitler üzerindeki diğer bazı dokuların daha detaylı olarak incelenebilmesine imkan vermektedir.

Meyvecilikte gerek aşılama ile gerekse çeşitli konularla ilgili anatomik araştırmalarda, bazı dezavantajları olmakla birlikte, yaygın olarak kullanılan yöntemlerden birisi kuşkusuz parafin tekniğidir (1, 2, 4, 7, 8, 9). Nitekim, bu teknik sayesinde amaca uygun ince kesitlerin alınması ve kesitler üzerinde dokuların belirgin ve detaylı bir şekilde incelenebilmesi, daha sağlıklı yorum yapma imkanı tanımaktadır. Fakat, bazı türlerde aşı yapılacak dokuların seri olmaları, dokuların parafinle doyurulmasını ve ince kesitlerin alınabilmesini zorlaştırabilmektedir. Bu durumda, materyalin doyurulması ve amaca uygun kesitlerin alınabilmesi için, uzun zamana ihtiyaç duyulmaktadır (1, 7). Fındık aşılarında, parafin içerisindeki aşı parçacıklarının etüvde 2-3 bekletilmesiyle ancak amaca uygun olan 12-20 mikron kalınlığında kesitlerin alınabildiği bildirilmektedir (7).

Araştırmada, parafin tekniğinin dezavantajlarını ortadan kaldırmak ve daha kısa sürede sonuca ulaşmak amacıyla, ülkemizde, bahçe



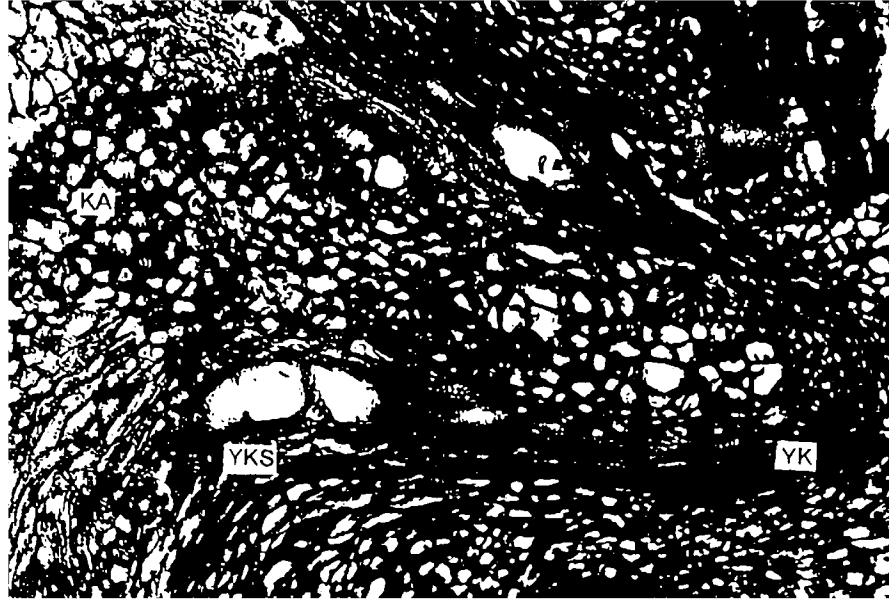
Şekil 1. Mikro - dalga yöntemiyle ceviz aşılarından, aşılamadan 25 gün sonra alınmış bir enine kesitte, anaç tarafında farklılaşmakta olan yeni ksilem elemanları, nekrotik tabakalar ve diğer dokular (Safranin, 10x20) (YKS: Yeni ksilem, KA: Kallus, K:Kambiyum)

Figure 2. New differentiating xylem components in the rootstock side, necrotics and other tissues on a cross section 25 days after grafting by micro-wave technique (Safranin, 10x10; KS: Xylem, YKS: New xylem, KA: Callus)



Şekil 2. Mikro - dalga yöntemiyle, aşılamadan 25 gün sonra alınmış bir boyuna kesitte, aşı elemanları tarafından kurulmuş kallus köprüsü üzerinde, farklılaşmakta olan yeni dokular (Safranin, 10x10) (KS: Ksilem, YKS:Yeni Ksilem, KA:Kallus).

Figure 2. New differentiating tissues on callus bridge on a longitudinal section 25 days after grafting by micro-wave technique (Safranin, 10x10; KS: Xylem, YKS: New xylem, KA: Callus)



Şekil 3. Mikro - dalga yöntemiyle aşılamadan 35 gün sonra alınmış bir boyuna kesitte, anaç ile kalem arasında boyuna birleşme bölgesinde, kavisli olarak tesis edilmiş kambiyal ve vasküler ilişki (Safranin, 10x10; YK: Yeni Kambiyum, KA: Kallus)

Figure 3. Cambial and vascular connection on a longitudinal section 35 days after grafting by micro-wave technique (Safranin, 10x10; YK: New cambium, KA: Callus)



Şekil 4. Klasik parafin yöntemiyle alınmış enine kesitte, aşı bölgesindeki dokular (Safranin, 4x10)

Figure 4. The tissues at the graft area on a cross section by classic paraffin technique (Safranin, 4x10)

bitkileriyle ilgili olarak ilk defa Mikro-dalga fırın kullanılmıştır (3, 6). Mikro-dalga yönteminin, bahçe bitkileri preparasyon tekniği uygulamalarında yeni ve hızlı bir teknik olduğu ve kayısı, kiraz, elma, armut gibi türlerin tomurcuk ve dal eksplantlarından kısa sürede ince kesitlerin alınmasında çok başarılı sonuçlar verdiği saptanmıştır (1, 2). Bu yöntemde mikrodalga ışınların, materyale uygulanan fiksasyon, dehid-rasyon ve infiltrasyon safhalarını kısalttığı ve parafinin kısa süre içerisinde dokulara nüfuz etmesine imkan tanıdığı ifade edilmiştir (1). Bu çalışmada bu yöntemden faydalanılarak, ceviz aşılı için metod geliştirilmiştir. Bilinen parafin tekniği için gerekli muameleler modifiye edilerek mikro-dalga fırında gerçekleştirilmiş ve böylece materyallerin kısa süre içerisinde doyurulması sağlanmıştır. Cevizin doku yapısına uygun olarak, muamele sayıları ve süreleri belirlenmiştir. Türler arasında dokusal farklılıklar gözetilerek bu teknik, özellikle muamele sayı ve sürelerini ayarlamak suretiyle, çeşitli anatomik çalışmalara kolaylıkla uyarlanabilir. Nitekim, kestane (*Castanea sativa* Mill.) aşılardan bu teknikle, rotary mikrotomla 12-20 mikron kalınlığında alınan kesitler üzerinde anatomik incelemelerin yapıldığı bildirilmektedir (5).

Sonuç olarak, klasik yönteme göre 1.5-2 ay gibi bir süre gerektiren işlemler, Mikro-dalga tekniğiyle birkaç güne indirilmiştir. Böylece, ceviz aşı örneklerinde, klasik parafin tekniğine göre daha çabuk sonuca ulaşılmıştır.

SUMMARY

UTILIZING POSSIBILITIES THE MIKRO-WAVE TECHNIQUE IN SECTIONING THE WALNUT GRAFTS

In several anatomical and histological investigations, paraffin technique is commonly used. In this work, sectionable possibilities suitable for purpose in shorter time in omega walnut grafts by the Mikro-wave method which is a new technique in sectioning for anatomical investigations in the horticulture plants, modifying paraffin method were studied. The classic technique was compared with the Mikro-wave method. It was observed that the Mikro-wave method resulted in shorter time by the classic technique. This new technique was recommended for similar anatomical studies regarding horticulture.

LİTERATÜR KAYNAKLARI

1. Aşkın, M.A., 1989. Ege Bölgesinde Düzenli Meyve Vermeyen Bazı Kayısı Çeşitleri Üzerinde Biyolojik Araştırmalar (Doktora Tezi). *Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir*
2. ———, O. Dolgun ve T. Yarılguç., 1995. Bahçe Bitkileri Preparasyon Tekniği Uygulamalarında Yeni Hızlı Bir Yöntem. *II. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, Adana. Cilt 1 (Meyve):282-286.*
3. Balta, F., 1993. Fındığın Aşı İle Çoğaltılması ve Aşı Kaynaşmasının Anatomik ve Histolojik Olarak İncelenmesi Üzerine Araştırmalar (Doktora Tezi). *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.*
4. ———, T.Karadeniz, F.E. Tekintaş and S.M. Şen, 1993. Investigations on anatomical and histological development of the graft formation in Chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Proceedings of The International Congress on Chestnut, Spoleto, Italy. s: 231-234*
5. Cirik, M.N. ve R. Güncan, 1992. Farklı İki Ekolojide Bazı Zeytin Çeşitlerinin Çiçek Tomurcuğu Gelişimi. *Türkiye 1. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, İzmir. Cilt 1 (Meyve): 175-178.*
6. Dolgun, O., 1995. Bahçe Bitkileri Preparasyon Tekniği Uygulamalarında Mikro Dalga Işınlardan Yararlanabilme İmkanları Üzerinde Araştırmalar (Yüksek Lisans Tezi). *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.*
7. Korkmaz, Y. ve R. Gülcen, 1992. Bazı Meyve Türlerinde Tohum Taslağı ve Embriyo Kesesi Gelişimi. *Türkiye 1. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, İzmir. Cilt 1 (Meyve): 475-478.*
8. Simons, R.K. and M.C. Chu, 1985. Graft Union Characteristics of M.26 Apple Rootstock Combined with 'Red Delicious' Strains-Morphological and Anatomical Development. *Scientia Horticulturae, 25:49-59.*
9. Vardar, Y., 1987. Botanikte Preparasyon Tekniği. *Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi, No:1, Uygulama Kitabı, Bornova-İzmir, 61 s.*