

Odunsu Bitki Türlerinde İn-vitro Aşılama-I (Anaç, Kalem, Aşı Tekniği)*

Hakan YILDIRIM¹, Nazan ÇALAR², Ahmet ONAY², Hüseyin KARLIDAĞ¹, Tuncay KAN¹

ÖZET: İn-vitro aşılama, aksenik kültür koşullarında minyatür aşı kalemlerinin aşılmasını kapsayan ve diğer tekniklere nazaran en son vejetatif çoğaltım tekniklerinden biridir. Bu yöntem, sürgün ucu kültürü ve aşılamanın bazı sınırlayıcı özelliklerinin üstesinden gelmekle birlikte, her iki metodun avantajlarını da bir arada bulundurmaktadır. İlk uygulandığı zamanlarda bazı meyve tür ve çeşitlerindeki virüs ve benzeri endojen patojenlerin eradikasyonu için geliştirilen in-vitro aşılama, bitki gelişim ve fizyolojisinin farklı alanlarında çeşitli odunsu bitki türlerinde hızla gelişmiştir. Bunlar birçok odunsu türlerin olgun genotiplerinin klonal çoğaltımında bir ön koşul olarak fizyolojik rejuvenasyonu ve aşıda uyumsuzluğu da kapsamaktadır. Sonuç olarak in-vitro aşılama, yoğun olarak kullanılan ve diğer vejetatif çoğaltım metodlarında bulunan olumsuzlukların üstesinden gelebilmek için daha çok düşünülmesi ve kullanılmayı hak eden orijinal ve tecrübe gerektiren bir tekniktir. Doku ve hücreler arasındaki genetik benzerlik ve farklılıkların ayrıntılı incelenmesine imkan sağlamaktadır. Bu çalışmanın amacı, 1970'li yıllarda turuncgillerde virüsten ari bitki üretimi amacıyla başlayan in-vitro aşılama çalışmalarının günümüze kadar nasıl bir süreçten geçtiği ve özellikle meyve türlerinin de dahil olduğu odunsu bitki türlerinde bitki ıslahı ve çoğaltımı amacıyla ne tür çalışmaların yapıldığının ortaya çıkarılması ve belli bir düzende sunulmasıdır.

Anahtar Kelimeler: Aşılama, in-vitro, kalem

In vitro Micrografting of Woody Plant Species-I (Rootstock, Scion, Grafting Technique)

ABSTRACT: In vitro micrografting is a propagation technique, involving the grafting of relatively miniature cuttings under axenic culture conditions and it is one of the recent developed propagation techniques compared to other conventional vegetative propagation techniques. This method overcomes some of the limitations of shoot tip culture and grafting, while it also keeps together the advantages of both methods. Micrografting was applied for the eradication viruses and pathogens from some fruit species and cultivars during the first application period, but later, the technique was further developed on various woody plant species in different research areas of plant physiology and development. These includes physiological rejuvenation and incompatibility grafting as a prerequisite for the clonally propagation of mature genotypes of many woody species. Consequently, in vitro micrografting is used in large scale propagation and an original technique which needs experience by overcoming the disadvantages of other propagation technique. It also enables to examine in detail the genetic similarities and differences between the tissues and cells. The aims of this study were (1) to review how micrografting studies passed a process from 1970s until today, first started to obtain virus-free plants from citrus; (2) to reveal what kind of work has been presented particularly on the plant breeding and propagation of the woody plant species, including the type of fruit breeding and reproduction and (3) and to present those studies in a specific order.

Key words: Grafting, in-vitro, scion

* VII. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi (25-29 Ağustos 2015 Çanakkale)'nde poster bildiri olarak sunulan ve özeti yayınlanan makalenin bir kısmıdır.

¹ İnönü Üniversitesi , Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri, Malatya, Türkiye

² Dicle Üniversitesi , Fen Fakültesi, Biyoloji, Diyarbakır, Türkiye

Sorumlu yazar/Corresponding Author: Hakan YILDIRIM, hakan.yildirim@inonu.edu.tr

GİRİŞ

İn vitro aşılama 1970'li yılların başlarında ağırlıklı olarak farklı meyve türlerinde öncelikli olarak turunçgillerde (Murashige et al., 1972; Navarro et al., 1975) başlayan daha sonra sert çekirdekli meyve türlerinde (Colin and Verhoyen, 1976) ve yumuşak çekirdeklielerde (Alskief and Villemur, 1978) ve nihayetinde süs bitkilerinin de (Creze, 1984) içerisinde bulunduğu odunsu bitki türleriyle devam eden virüs eliminasyonu için geliştirilen ve diğer tekniklere göre nisbeten yeni bir vejetatif çoğaltım tekniğidir. Bu teknik sonraki zamanlarda yoğun olarak sahil çamı (Tranvan and David, 1985), boylu mazı (Misson and Giot-Wirgot, 1985), sekoya (Monteuuis, 1986) gibi odunsu bitki türlerinde seçilmiş olgun genotiplerin fizyolojik gençleşmesi işlemlerinde kullanılmıştır. İn vitro aşılama, genellikle 100 µm'den 1-2 cm'ye kadar değişen uzunluktaki küçük aşı kalemlerinin aşılmasına imkan tanımakla birlikte, arazi koşullarındaki anaçların kesim yerlerinde görülen kararma ve bazı fungus ırklarının zararından dolayı düşük olan aşı tutma oranının artırılmasını sağlamaktadır. Bazı türlerde sürgün uçları, sürgün ucu meristemi olarak sınırlandırılmıştır. Sürgün ucu meristemi ise apikal uç yanında bir kaç yaprak primordiyasını içermekle birlikte türlere göre değişiklik gösterebilmektedir.

İn vitro sürgün ucu meristem kültürü, özellikle virüsten kaynaklanan endojen kontaminasyonlu materyallerden temiz materyal üretimi için kullanılır. Aynı zamanda klonal anaçların kullanılması yoluyla olgun genotiplerin fizyolojik olarak geliştirilmesini sağlamaktadır (Hackett, 1985; Monteuuis, 1989). Kullanılan nisbeten daha küçük sürgün ucu eksplantı patojenlerin daha etkili eliminasyonunu sağlarken, kültürdeki başarı şansının azalmasına neden olmuştur. Bununla birlikte sürgün ucu meristem kültürü çalışmaları çok sayıda odunsu bitki türünde başarısızlıkla sonuçlanmıştır (George, 1993). Bunun temel nedeninin; türlere göre kullanılan doku kültürü besi ortamlarının uygun olmaması ve yaşlı donör bitkilerden alınan eksplantların besi ortamına karşı hassasiyetlerinin olduğu bildirilmektedir (Monteuuis, 1987a). İn vitro aşılama bu sınırlamalara karşı alternatif bir teknik olarak uygulanmakta olup; in vitro üretilen anaçların yapay besi ortamına göre daha doğal olması nedeniyle başarı şansını arttırmaktadır. İn vitro

aşılama bitkiler daha farklı amaçlar için dış koşullara aktarılabilirken; mikroçoğaltım veya aşılama işlemleri için in vitro koşullarda damızlık bitki olarak sağlıklı sürgün üretimi için muhafaza edilmeleri mümkün olabilmektedir.

Bu çalışmanın amacı, 1970'li yıllarda turunçgillerde virüsten ari bitki üretimi amacıyla başlayan in vitro aşılama çalışmalarının günümüze kadar nasıl bir süreçten geçtiği ve özellikle meyve türlerinin de içinde bulunduğu odunsu bitki türlerinde in vitro aşılama için kullanılan anaç ve kalem özelliklerinin belirlenmesi ve ayrıca aşılama tekniğiyle ilgili yapılan çalışmaların bir araya getirilmesi ve bunun için ne tür çalışmaların yapıldığı ve nasıl uygulandığının ortaya çıkarılması ve belli bir düzende sunulmasıdır.

KULLANILAN MATERYALLERİN ÖZELLİKLERİ

1. Anaç

İn vitro aşılama genellikle aynı türe ait aşı kalemi ve anaçları kullanılırken, çok nadiren farklı türlerin anaçları da kullanılabilir. Ladin çeşitleriyle ilgili yapılan çalışmalarda aynı ya da farklı türlere yapılan aşılamaalarda aşı başarısında önemli farklılıkların olmadığı bildirilmiştir (Ponsonby and Mantell, 1993). Anacın ne olduğuna bakmaksızın kültür ortamının akselik koşullarda uygun şekilde ayarlanması gerekmektedir. Bazı araştırmacılar tarafından farklı anaç üretim sistemleri kullanılmış olup, sıvı besi ortamları (Gebhardt and Goldba, 1988), daha iyi kültür başlatma için filtre kağıtları (Murashige et al., 1972; Huang et al., 1988) üzerinde durulmuştur. Perlit ve vermikulit ortamları tam sıvı besi ortamlarına göre kök sistemi için daha rahat ortamlar olduğu bildirilmiştir (Tranvan and David, 1985; Monteuuis, 1987). Torf ve polypropilen lifler ve selülozik tamponlar da farklı araştırmacılar tarafından kullanılmıştır (Deogratias et al., 1986; Dumas et al., 1989; Ewald and Kretzschmar, 1986). Katı besi ortamlarıyla kıyaslandığı zaman bu tampon sistemlerinin en önemli avantajı anacın kök sistemine zarar vermeden aşılamanın rahatlıkla yapılması ve kültür kaplarından kolayca çıkarılabilmesidir.

Anacın gelişim devresi ve büyüklüğünün turunçgiller, şeftali, sekoya, ladin, sandal ağacı gibi odunsu türlerde mikroaşıda başarıyı etkilediği bildirilmiştir. Beyaz çam ağacının aşılamaında

kullanılmak üzere üretilecek anaçlar için embriyo kültürünün kullanılmasının aşı başarısı ve bitki gelişim açısından iyi sonuçlandığı bildirilmiştir (Goldfarb et al., 1992). Bazı meyve türlerinde de tohumdan kotiledonlar ayrıldıktan sonra ekilen materyalden üretilen genç anaçlar kullanılmıştır. Sekoya ağacında ise in vitro üretilen anaç sürgünler üzerine mikroaşılama yapıldıktan sonra köklenme ortamına aktarıldığı bildirilmektedir (Huang et al., 1992a).

Turunçgillerde in vitro üretilen fideler anaç olarak kullanılmadan önce birkaç gün karanlık ortamda bulundurulması tavsiye edilmektedir (Navarro et al., 1975). Ayrıca besi ortamına bitki büyüme düzenleyicilerinin ilave edilmesinin farklı meyve türlerindeki aşı başarısını artırdığı bildirilmektedir (Jonard et al., 1987).

2. Aşı Kalem

a. Tür - çeşit etkisi: İn vitro aşılama başarıları, tür ve çeşitler arasında farklılık göstermektedir. İğne yapraklı bitki türlerinde mikroaşılama teknik ve yöntemleri başarılı bir şekilde geliştirilmiş olmakla birlikte (Monteuuis, 1986, 1994), tik ağacı ve okaliptus türlerinde aynı araştırmacılar benzer çalışmalarla henüz bir gelişme sağlanamadığını bildirmektedirler. Mavi ladinin 'Koster' çeşidiyle %43 mikroaşılama başarısı sağlanırken, Avrupa Ladininde aşı kaleminin hazırlanması sırasında dokularda meydana gelen kararmadan dolayı aşı tutma oranının %7 olduğu bildirilmektedir (Ponsonby and Mantell, 1993). Fıstık çamı, sahil çamı ve badem bitkilerinin aynı yaştaki mikroaşılı bitkilerindeki sürgün gelişimleri arasında önemli farklılıkların bulunduğu bildirilmektedir (Dumas et al., 1989; Cortizoe et al., 2004; Yıldırım ve ark., 2013). Sürgün ucu aşılamanın bazı turunçgillerde farklı anaç-kalem kombinasyonları kullanılarak yapıldığı bildirilmiştir (Edriss and Burger, 1984; Kapari-Isaia et al., 2002). Şaraplık üzüm çeşitlerinde anaç ve çeşitlerde yapılan farklı kombinasyonlarda in vitro aşılama fazla bir farklılık görülmezken, in vivo yapılan aşılamaalarda büyük farklılıkların olduğu görülmüştür (Pathirana and McKenzie, 2005).

b. Kalem tipi: Aşı kalemi olarak genellikle sürgün ucu kullanımı tercih edilmektedir. Kalem büyüklüğü araştırmacılara ve türlere göre 0.1 mm'den 2-3 cm'ye kadar değişiklik göstermektedir. Örneğin

sekoya ağacının 100 yaşındaki bitkilerinden alınan 0.4 mm büyüklüğündeki sürgün ucu meristemleriyle elde edilen aşı başarısının %35 olduğu bildirilmektedir (Monteuuis, 1986). Ladin ve göknar ağaçlarında 0.1-0.25 mm uzunluğundaki meristemlerden %50 aşı başarısı elde edilmiştir (Monteuuis, 1994). 140 Yaşındaki Avrupa Karaçam ağacından alınan 0.3-0.5 mm büyüklüğündeki meristemlerden %69 aşı tutma oranının elde edildiği bildirilmiştir (Ewald and Kretschmar, 1996). Kaju fıstığında yapılan bir in vitro aşılama çalışmasında 1-2 cm uzunluğunda kullanılan sürgün uçlarından %60-80 aşı tutma oranı elde edilmiştir (Mnoney and Mantell, 2001). Khalafalla ve Daffalla (2008) tarafından Senegal Akasya'sında 1.5-3.0 cm uzunluğundaki aşı kalemleri kullanılarak %70-90 arasında değişen mikroaşılama başarısı elde ettiğini bildirmiştir. Kiraz ağacı ve 20 yaşındaki *Garcinia indica* (Kokum) ağaçlarında sırasıyla 0.4-1 mm ve 0.5-1 cm uzunluğunda sürgün kullanımının mikroaşılama için uygun olacağı bildirilmektedir (Deogratis et al., 1986; Chabukswar and Deodhar, 2006). Hem gençleştirme hem de bitki sağlığı amacıyla aşı kalemi büyüklüğünün uygun şekilde düşürülmesi gerekmektedir. Aşılama yapılacak aşı kaleminin; bitki türü, uygulayıcılara (aseptik koşullar altında hızlı ve dikkatli bir şekilde aşı kalemini hazırlama ve aşığı yapma) ve kullanılan mikroaşılama tekniğine göre 0.1-0.2 mm büyüklüğünde uygun ve yeterli olabilmektedir. Akasya mangium bitkisinde aşı kalemi büyüklüğünün 0.4-0.8 mm'den 0.2 mm'ye düşürülmesinin aşı tutma oranının azalmasına neden olduğu bildirilmiştir (Monteuuis, 1996). Örneğin Sekoya ağacında 0.2-0.3 mm büyüklüğünde sürgün ucu meristemleriyle elde edilen aşı başarısı %23 olurken, 0.4-0.5 mm'lik sürgün uçlarıyla %61 aşı tutma oranının elde edildiği bildirilmektedir (Monteuuis, 1987b). Turunçgil türlerinde yapılan çalışmalarda 0.4-0.7 mm aşı kalemleriyle %47 aşı başarısı sağlanırken, 0.05-0.1 mm'ye düşürülen aşı kalemleriyle elde edilen aşı başarısının %1.8 gibi çok düşük oranlarda gerçekleştiği bildirilmektedir (Navarro et al., 1975). Aynı durum elmanın da içinde bulunduğu bir çok odunsu bitki türünde benzer şekilde cereyan etmiştir. Kamelya bitkisinde aşı kalemi büyüklüğünün 8 mm'den 3-5 mm düşürülmesinin aşı başarısının %67'den %8'e düşmesine neden olmuştur (Creze, 1984). Bazı sert çekirdekli meyve türlerinde 0.4 mm'den daha küçük aşı kalemlerinden herhangi bir aşı başarısı elde edilemezken, 0.4-0.6 mm

büyükliğindeki aşı kalemleriyle daha iyi aşı başarısı elde edildiği görülmüştür (Colin and Verhoyen, 1976). Antepfıstığının Siirt çeşidiyle ilgili Onay ve ark., (2004) tarafından yapılan bir çalışmada; sırasıyla 2-4 mm ve 4-6 mm uzunluğundaki aşı kalemlerinden %56.7 ve %79.2 aşı başarısı sağlanırken, 0.5-1 mm ve 0.5 mm uzunluğundaki aşı kalemleriyle elde edilen aşı tutma oranlarının %27.2 ve %0 olarak çok düşük cereyan ettiği bildirilmektedir. Bazı turunçgil türlerinde sürgün uçlarına yapılan ön uygulamalarla aşı başarısının %100 olarak elde edildiği bildirilmektedir (Jonard et al., 1987). Farklı badem çeşitleriyle ilgili olarak yapılan bir çalışmada, kullanılan 4-8-15 mm uzunluğundaki aşı kalemlerinden elde edilen aşı başarıları arasında bir farklılık görülmezken, aşı kaleminin küçülmesiyle birlikte 28 günlük kültür periyodundan sonra gelişen sürgün gelişiminin de azaldığı bildirilmektedir (Yıldırım ve ark., 2010).

c. Donör bitkinin yaşı: İn vitro aşılama başarısı üzerine aşı kaleminin alındığı donör bitkinin yaşının etkisiyle ilgili olarak birkaç türde bazı çalışmalar yapılmıştır. Sahil çamı bitkisinde 2-3 aylık bitkilerden ve 11 yaşındaki ağaçtan alınan 5-7 mm uzunluğundaki sürgün uçlarıyla yapılan mikroaşılama çalışmalarında birbirine yakın sonuçlar alınırken sırasıyla %43 ve %45 başarının elde edildiği bildirilmiştir (Tranvan and David, 1985). Monteri çamı bitkisinde aşılama sonrası sürgün gelişimi bakımından genç bitkilerin yaşlılara göre daha iyi olduğu bildirilirken, aşı tutma oranları bakımından donör bitki yaşının önemli olmadığı görülmüştür (Fraga et al., 2002). Ewald ve ark., (1991), tarafından Avrupa Ladini ağaçlarında 11, 19 ve 55 yaşlarındaki bitkilerin mikroaşılama başarısını benzer oranda etkilediğini bildirmiştir. Şemsiye ağacı bitkisinde in vitro aşılama işleminden sonra yaşayan aşı kalemi oranı bakımından 2 yaşlı donör bitkilerin 11 yaşlı ağaçlara göre daha iyi olduğu bildirilmiştir (Detrez, 1994). Akasya magnium bitkisinde 0.3-0.4 m'lik sürgün uçlarıyla yapılan mikroaşılama başarısının genç bitkilerde %52, olgun ağaçlarda %46 olduğu; ancak in vivo koşullarda bu başarının %49 ve %0 olarak gerçekleştiği bildirilmiştir (Monteuuis, 1995b).

d. Fizyolojik koşullar: İn vitro aşılama başarısı ve aşı kaleminin gelişimi üzerine en önemli etki donör bitkilerden eksplant alma zamanına aittir. Elma'da yapılan bir çalışmada Kasım-Mart ayları

arasında alınan materyallerle yapılan aşı başarısı %10 iken, Mayıs ayında %70 olmuş, sonraki zamanlarda Haziran ayından Ekim ayına kadar başarının her ay %10 oranında düştüğü bildirilmiştir (Huang and Millikan, 1980). Antepfıstığının Siirt çeşidiyle ilgili ana bitkilerden alınma zamanlarına göre elde edilen başarının Nisan %70, Haziran %80 olduğu, bunun aksine Şubat ayı içerisinde alınan eksplantlardaki aşı başarısının %10 olduğu bildirilmiştir (Onay ve ark., 2004). Fıstık çamı ve monteri çamı bitkilerde yapılan aşılama çalışmalarında mevsimsel değişim açısından en iyi aşı başarısı bitkilerin kış dinlenme periyodunda alınan eksplantlarından elde edilmiştir (Fraga et al., 2002; Cortizo et al., 2004). Dinlenme halindeki sürgünlerde daha iyi aşı başarısı sağlanan türler olmakla birlikte; bunun aksine aktif gelişme döneminde daha iyi sonuç veren türlerde bulunmaktadır. Şeftalide ilk mikroaşılama çalışmalarında aşı başarısı ortalama %14 olurken, eksplant alınan donör bitkilerin içinde buldukları fizyolojik durumun önemli olduğu ve özellikle Haziran ayında alınan materyallerdeki başarının daha iyi olduğu bildirilmiştir. Bunun nedeninin ise aktif dönemde bulunan bitki bünyesindeki oksin metabolizması ve peroksidaz aktivitesinden kaynaklandığı öne sürülmüştür (Poessel et al., 1980; Jonard, 1986). Elma, kiraz, hindistan eriği, şemsiye akasya, antepfıstığı, kokum gibi belli bazı türlerde yapılan çalışmalarda in vitro mikroçelik kullanımının, in vivo çelik kullanımından daha iyi olduğu bildirilmiştir (Detrez, 1994; Chabukswar and Deodhar, 2006).

Mikroaşıda elde edilen başarının, aslında bitkinin gelişme durumuna göre bir dalgalanma gösterdiği yapılan bazı çalışmalarda bildirilmektedir. Örneğin Jonard ve ark. (1983), tarafından yapılan bir çalışmada aşılama öncesinde bitkileri zeatin ön uygulaması yapılarak aşı kaleminin ve aşı başarısının artırılmasının sağlandığı bildirilmiştir. Oldukça spesifik bir örnek olarak turunçgillerde Jonard ve ark. (1987), aşı kalemlerini BA-2,4D ve GA₃ ile destekli MS besi ortamında tamamen karanlık ortamda 5 gün beklettikten sonra aşılama 2 gün önce 16/8 fotoperiyoda tabi tutularak aşılamanın yapıldığı bildirilmektedir. Yapılan uygulamalardan özellikle kinetin, 2,4 D veya kombinasyonlarının aşı tutma oranını arttırdığını bildirmiştir. Farklı araştırmacılar bu uygulamaları farklı turunçgil anaç ve kalemlerinde de uygulamışlardır (Edriss and Burger, 1984; Burger, 1985).

3. Aşılama Tekniği

Bitki türlerine göre ve değişen başarı oranlarıyla daha klasik aşılama prosedürleri yanında farklı in vitro aşılama teknikleri de kullanılmaktadır (Hartman et al., 1997). İn vitro kabukaltı aşısı tekniği; aktif gelişen 2-3 mm uzunluğundaki sürgün ucu meristemini kesilerek in vitro üretilmiş anaçlara aşılmasını içermektedir. Kaju fıstığında aşımın epikotil veya hipokotil üzerine yapılması arasında bir farklılık görülmediği (%70 ve %63), fakat hipokotil aşılama yönteminin epikotile göre daha iyi geliştiği görülmüştür (Mnoney and Mantell, 2001). Anaç hipokotilleri üzerinde bulunan aksiler tomurcukların temizlenmesi iyi bir anaç-kalem uyumu için önemli bir koşuldur. Epikotil aşılarda ise sürgünün tamamen dikkatlice temizlenmesi gerekir. Sürgün ucu meristemi ve sürgün uçları ladin çeşitleri (Ponsonby and Mantell, 1993) ve Douglas Göknarı'nda (Monteuuis, 1995a) kotiledonların arasına gelecek şekilde aşılandığı bildirilmiştir. Sahil çamı gibi bazı reçineli bitki türlerinde dokunun yarılmasına gerek olmayıp; epikotil üzerine yatay bir kesik açılıp yerleştirilmesi yeterlidir. Üstten dilcikli aşılanmanın aksine kabukaltı aşılama yönteminde kalem gelişimini teşvik etmek için ve anaçla arasındaki rekabeti önlemek için aşı yerinin üst tarafında anaçta gelişen sürgünlerin temizlenmesi gerekir.

İN vitro dilcikli aşılanma başlangıçta (Murashige et al., 1972; Navarro et al., 1975) tarafından geliştirilmiş olup, sonradan geniş yapraklı türlere (Alskief and Villemur, 1978; Jonard et al., 1983; Deogratis et al., 1986) ve iğne yapraklı türlere (Monteuuis, 1994) başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Turunçgillerde bazı araştırmacılar tarafından kesilen anaçların epikotil üzerine aşı kaleminin yerleştirildiği yere bağlı olarak aşı tutma oranlarının farklı olduğu bildirilmiştir. Bu işlem sonradan bazı turunçgillerde pratik hale getirilerek epikotil alt kısmına ters T aşısına dönüştürülerek uygulanmıştır. Senegal akasyasında epikotil üzerine yapılan aşılanmanın aşı uyumu kalitesinin epikotille kıyaslandığı zaman histolojik açıdan daha iyi olduğu gözlenmiştir (Palma et al., 1997).

İN vitro yarma aşı daha pratik olmakla birlikte; sürgün ucu "V" şeklinde her iki tarafından 20-30°lik açıyla kesilir. Bu uygulama büyüklüğü 0.3 mm ile 3 cm arasında olan bütün aşı kalemlerine uygulanabilir. Kullanılan anaçların tepesi kesildikten sonra oluşturulan

yarık kısmına yerleştirilir. Bu yöntemle yapılan aşılama Hindistan eriğinin anaçları üzerine 0.5-1 cm uzunluğundaki sürgün uçları aşılandığında yaşama oranının %90 olduğu ve geleneksel aşılama yöntemlerinde görülen dip sürgünü riskinin ortadan kaldırıldığı bildirilmektedir (Dahthu et al., 2004). Üzüm çeşitlerinde in vitro yarma aşımının anatomik ve morfolojik çalışmaları sırasında anaç ve kalem arasındaki mekanik bağlantının önemli ilk adım olduğu görülmüştür (Hartmann et al., 1997). Aşılamadan bir hafta sonra kallus oluşumunun meydana geldiği ve kayıp yaşanmadığı bildirilmiştir. Aşıdan 8-12 saat sonra anaç ve kalem vasküler dokuları arasında ilk kaynaşmanın sağlandığı, 20-30 gün sonra ise aşılar tutmanın meydana geldiği bildirilmektedir (Cantos et al., 1995).

18 yaşındaki Doğu Ladini ve 15 yaşındaki Douglas Göknarı ağaçlarında yapılan mikroaşılama çalışmalarında kabukaltı aşısının dilcikli aşılamadan daha etkili olduğu görülmüştür (Monteuuis, 1994; 1995a). Bu bulgular aynı zamanda bazı sert çekirdekli meyve türlerinde 0.4-0.6 m uzunluğundaki sürgün uçlarıyla ve antepfıstığı, badem ve kaju fıstığında uygulanma imkanı bulmuştur (Colin and Verhoyen, 1976; Onay ve ark., 2004; Yıldırım ve ark., 2010; Yıldırım ve ark., 2013). Bunun aksine *Acacia magnium* ve *Picea* gibi farklı süs bitkisi türlerinden yarma aşı tekniğinin kabukaltı aşı tekniğinden daha etkili olduğu bildirilmiştir (Monteuuis, 1996; Ponsoby and Mantell, 1993).

Ekleme aşı tekniği farklı araştırmacılar tarafından uygulanmış olup; Gabherdt and Cooldba, (1988) tarafından bazı sert çekirdekli türlerinde aşı uyumu karakterleriyle ilgili bir kısım çalışmalar için uygulanmıştır. Ancak bu metodun kullanımı oldukça sınırlı kalmıştır.

Dilcikli ve yarma aşı tekniklerinde aşılamadan önce anaçların kesik yüzeylerine DİECA, PVP ve askorbik asit uygulamasının bazı meyve türlerinde meydana gelen doku bozulmalarının önüne geçtiği bildirilmiştir (Mosella-Chancel et al., 1980). Ayrıca şeftali gibi farklı meyve türlerinde ve kamelya bitkisinde steril su damlaları, vitamin-şeker-besin maddesi ve büyüme maddeleri ihtiva eden jel bloklarının kullanımıyla in vitro aşılanmanın geliştirildiği bildirilmiştir (Creze, 1984; Chimot-Schall et al., 1986). Sahil çamı ağacında %0.8 gliserin içeren ve agar bulunduran küçük jeloz bloklar kullanılmıştır (Tranvan and David, 1985).

Bununla birlikte aşılama öncesinde aşı noktasına veya aşı kalemlerine yapılan dış uygulamaların bazı ibreli ağaç türlerinde faydasız olduğu bildirilmiştir. Anaç ve kalem arasındaki bağlantıyı güçlendirmek için farklı araştırmacılar tarafından parafilm, silikon halka, alüminyum folyo kullanıldığı; ancak 0.5 cm'den daha küçük anaçlar için bunun pratik olmadığı bildirilmiştir (Corizo et al., 2004; Fraga et al., 2002). Son yıllarda hünnap, sekoya ve avrupa ladini benzeri farklı bitkilerde aşılama sonrası 1-3 hafta kadar karanlık ortamda bekletilmelerinin sürgün ucu meristem aşılarda başarı oranını arttırdığı bildirilmiştir (Monteuus, 1994; Danthu et al., 2002a).

SONUÇ

İn vitro mikroaşılama, in vitro sürgün ucu ve/veya sürgün ucu meristemleriyle birlikte aşılamanın avantajlarını bir araya getirirken; vejetatif çoğaltım

tekniklerinde bulunan uyumsuzluk ve hastalıklar gibi bazı sınırlamaların üstesinden gelmektedir. Başarı oranının oldukça düşük olmasının yanı sıra; zaman, ustalık ve beceri istemesi nedeniyle ticari boyuttaki kullanımı sınırlı kalmıştır. Geleneksel aşılama yöntemi için in vitro aşılama, anaç ve kalemin özelliklerine ilave olarak uyuşma ve kaynaşma hususunda çeşitliliğin artmasını sağlamaktadır.

Araştırmacı ya da uygulayıcıların tecrübesi ve el becerisi bazı farklılıkların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. İn vitro aşılama yöntemiyle hem hastaliksız bitki üretimi hem de gençleşmenin sağlanması bakımından bu yöntem en etkili vejetatif çoğaltım tekniğidir. Anaçların kalem üzerine olan etkisinin tam olarak ortaya çıkarılması ve kalemle arasındaki ilişkinin yani hücre ve dokular arasındaki fizyolojik ve genetik ilişkinin ortaya çıkarılması açısından da büyük öneme sahiptir.

KAYNAKLAR

- Alskief J, Villemur P, 1978. Greffage *in vitro* d'apex sur des plantules décapitées de pommier (*Malus pumilla* Mill). Comptes Rendus Académie des Sciences, Paris, Serie D, 287: 1115-1118.
- Burger D W, 1985. Micrografting: a tool for the plant propagator. Combined Proceedings of International Plant Propagators' Society, 34: 244-248.
- Cantos M, Ale's G, Troncoso A, 1995. Morphological and anatomical aspects of cleft micrografting of grape explants *in vitro*. Acta Horticulturae, 388:135-139.
- Chabukswar M M, Deodhar M A, 2006. Restoration of rooting competence in a mature plant of *Garcinia indica* through serial shoot tip grafting *in vitro*. Scientia Horticulturae, 108: 194-199.
- Colin J, Verhoyen M, 1976. Micrografts with meristematic tissues, a possible technique to eliminate viruses from *Prunus* trees. Acta Horticulturae, 67:97-102.
- Cortizo M, Alonso P, Fernández B, Rodríguez A, Centeno M L, Ordás R J, 2004. Micrografting of mature stone pine (*Pinus pinea* L.) trees. Annals of Forest Science, 61: 843-845.
- Crézé J, 1984. Où en sommes-nous de la greffe d'apex de camellia. Jardins de France, Mars 1984: 104-105.
- Danthu P, Soloviev P, Touré M A, Gay e A, 2002a. Propagation végétative d'une variété améliorée de jujubier introduite au Sénégal. Bois et Forêts des Tropiques, 272: 93-96.
- Danthu P, Touré M A, Soloviev P, Sagna P 2004. Propagation of Ornamental Plants Vegetative propagation of *Ziziphus mauritiana* var. *Gola* by micrografting and its potential for dissemination in the Sahelian zone. Agroforestry Systems, 60: 247-253.
- Deogratias J M., Lutz A, Dosba F, 1986. Microgreffage d'apex de cerisiers (*Prunus avium* L.) multipliés *in vitro* en vue de l'élimination de trois types de particules virales. Fruits, 41: 675-680.
- Detrez C, 1994. Shoot production through cutting culture and micrografting from mature tree explants in *Acacia tortilis* (Forsk.) Hayne subsp. *Raddiana* (Savi) Brenan. Agroforestry Systems, 25: 171-179.
- Dumas E, Franclet A, Monteuis O, 1989. Microgreffage de méristèmes primaires caulinaires de pins maritimes (*Pinus pinaster* Ait.) âgés sur de jeunes semis cultivés *in vitro*. Comptes Rendus Académie des Sciences, Paris, 309 (III): 723-728.
- Edriss M H, Burger D W, 1984. *In vitro* propagation of *Troyer citrange* from epicotyl segments. Scientia Horticulturae, 23: 159-162.
- Ewald D, Kretzschmar U, 1996. The influence of micrografting '*in vitro*' on tissue culture behaviour and vegetative propagation of old European larch trees. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 44: 249-252.
- Ewald D, Putenikhin V P, Matschke J, 1991. Mikropfropfung adulter Koniferen. Allgemeine Forst-Zeitschrift, 17: 878-880.
- Fraga M F, Cañal M J, Aragonés A, Rodríguez R, 2002. Factors involved in *Pinus radiata* D. Don. micrografting. Annals of Forest Science, 59:155-161.
- Gebhardt K, Goldba H, 1988. Establishment, graft union characteristics and growth of *Prunus* micrografts. Physiologia Plantarum, 72: 153-159.
- George EF, 1993. Plant propagation by tissue Culture, 2nd Ed. Exegetics Ltd. Hardcover Part 1. The Technology. 574 pp.

- Goldfarb B, McGill G E, Hackett W P, Monteuis O, 1992. *In vitro* culture and micrografting of White pine meristems. Proceedings of the International Plant Propagators' Society, 42: 412-414.
- Hackett W P, 1985. Juvenility, maturation and rejuvenation in woody plants. Horticultural Review 7: 109-155.
- Hartmann H T, Kester D E, Davies Jr F T, Geneve R L, 1997. Plant Propagation: Principles and Practices. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey. Sixth edition, 770 pp.
- Huang L C, Lius S, Huang B L, Murashige T, Mahdi E F M, Van Gundy R, 1992a. Rejuvenation of *Sequoia sempervirens* by repeated grafting of shoot tips onto juvenile rootstocks *in vitro*: A model for phase reversal of trees. Plant Physiology, 98: 166-173.
- Huang L C, Chen W L, Chiu D S, 1988. *In vitro* graft-enhanced nucellar plant development in the mono embryonic *Citrus grandis* L. Journal of Horticultural Science, 63: 705-709.
- Huang S, Millikan D F, 1980. *In vitro* micrografting of apple shoot-tips. Hortscience, 15: 741-743.
- Jonard R, Hugard J, Macheix J J, Martinez J, Mosella-Chancel L, Poessel J L, Villemur P, 1983. *In vitro* micrografting and its applications to fruit science. Scientia Horticulturae, 20: 147-159.
- Jonard R, 1986. Mikrografting and its applications to tree improvement, p. 31-48. In: Y.P.S. Bajaj (ed.). Biotechnology in agriculture and forestry. Vol 1. Trees I. Springer- Verlag, Berlin.
- Jonard R, Soedharma I, Villemur P, 1987. Analyse Olivier Monteuis. *In vitro* grafting of woody species 23 de l'influence de divers facteurs sur l'amélioration des réussites au microgreffage chez les agrumes. Comptes Rendus Académie des Sciences, Paris, 305 (2), (III): 45-49.
- Khalafalla M M, Daffalla H M, 2008. *In vitro* micropropagation and micrografting of gum arabic tree [*Acacia senegal* (L.) Wild] International Journal of Sustainable Crop Production, 3: 19-27.
- Kapari-Isaia T, Minas G J, Polykarpou D, Iosifidou E, Arseni S, Kyriakou A, 2002. Shoot-tip grafting *in-vitro* for the elimination of viroids and citrus psorosis virus in the local "Arakapas" mandarin in Cyprus. IN Proceeding fifteenth IOCV conference pp. 417-419), Riverside, CA: IOCV
- Misson J P, Giot-Wirgot P, 1985. Rajeunissement d'un clone de thuja en vue de sa multiplication *in vitro*. Annales AFOCEL, 1984: 187-197.
- Mnoney E E, Mantell S H, 2001. *In vitro* micrografting of cashew. Plant, Cell Tissue and Organ Culture, 66: 49-58.
- Monteuuis O, 1986. Microgreffage de points végétatifs de *Sequoiadendron giganteum* Buchholz séculaires sur de jeunes semis cultivés *in vitro*. Comptes Rendus Académie des Sciences, Paris, 302, (III):223-225.
- Monteuuis O, 1987a. *In vitro* meristem culture of juvenile and mature *Sequoiadendron giganteum*. Three Physiology, 3: 265-272.
- Monteuuis O, 1987b. Microgreffage du séquoia géant. Annales AFOCEL, 1986: 39-61.
- Monteuuis O, 1989. Maturation concept and possible rejuvenation of arborescent species. Limits and promises of shoot apical meristems to ensure successful cloning. In: Gibson G. L., Griffin A. R., Matheson A. C. (Eds). Breeding Tropical Trees: Population Structure and Genetic Improvement Strategies in Clonal and Seedling Forestry. Proceedings of the Conference IUFRO, Pattaya, Thailand, 28 November-3 December 1988: 106-118.
- Monteuuis O, 1994. Effect of technique and darkness on the success of meristem micrografting of *Picea abies*. Silvae Genetica, 43: 91-95.
- Monteuuis O, 1995a. Influence of the grafting technique on meristem micrografting of Douglas-fir. New Forests, 10: 267-273.
- Monteuuis O, 1995b. *In vivo* grafting and *in vitro* micrografting of *Acacia mangium*: impact of ortet age. Silvae Genetica, 44: 190-193.
- Monteuuis O, 1996. *In vitro* shoot apex micrografting of mature *Acacia mangium*. Agroforestry Systems, 34: 213-217.
- Mosella-Chancel L, Signoret P A, Jonard J, 1980. Sur la mise au point de techniques de microgreffage d'apex en vue de deux types de particules virales chez le pêcher (*Prunus persica* Batsch.). Comptes Rendus Académie des Sciences, Paris, 290: 287-290.
- Murashige T, Bitters W P, Rangan T S, Nauer E M, Roistacher C N, Holliday P B, 1972. A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free *Citrus* clones. Horticultural Science, 7: 118-119.
- Navarro L, Roistacher C N, Murashige T, 1975. Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus-free citrus. Journal of the American Society for Horticultural Science, 100: 471-479.
- Onay A, Pirinç V, Yildirim H, Basaran D, 2004. *In vitro* micrografting of pistachio (*Pistacia vera* L. cv. Siirt), Plant Cell, Tissue and Organ Culture 77: 215-219.
- Palma B, Vogt G F, Neville P, 1997. La microgreffe, une solution pour la multiplication *in vitro* de l'*Acacia senegal* (L) Willd? Annals of Forest Science, 54: 203-210.
- Pathirana R, McKenzie M J, 2005. Early detection of grapevine leafroll virus in *Vitis vinifera* using *in vitro* micrografting. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 81: 11-18.
- Poessel J L, Martinez J, Macheix J J, Jonard R, 1980. Variations saisonnières de l'aptitude au greffage *in vitro* d'apex de pêcher (*Prunus persica* Batsch). Relations avec les teneurs en composés phénoliques et les activités péroxydasiques et polyphénoloxidasiques. Physiologie Végétale, 18: 665-675.
- Ponsonby D J, Mantell S H, 1993. *In vitro* establishment of *Picea pungens* f. *glauca* and *Picea sitchensis* seedling rootstocks with an assessment of their suitabilities for micrografting with scions of various *Picea* spp. Journal of Horticultural Science, 68: 463-475.
- Tranvan H, David A, 1985. Greffage *in vitro* du pin maritime (*Pinus pinaster*). Canadian Journal of Botany, 63: 1017-1020.
- Yildirim H, Onay A, Süzerer V, Tilkat E, Özden-Tokatlı Y, Akdemir H, 2010. Micrografting of almond (*Prunus dulcis* Mill.) cultivars 'Ferragnes' and 'Ferraduel'. Scientia Horticulturae, 125: 361-367.
- Yildirim H, Akdemir H, Süzerer V, Özden Y, Onay A, 2013. *In vitro* Micrografting of almond cultivars Texas, Ferrastar and Nonpareil. Biotechnology & Biotechnological Equipment A&EB. 27(1):3493-3501.