

Bahçe Bitkilerinde Meristem Kültürü Tekniği ve Başarıyı Etkileyen Faktörler

Vedat ŞENİZ*

Funda DEMİREL**

ÖZET

Meristem kültürünün esası; meristemin birkaç yaprak taslağı ile birlikte, binoküler mikroskop altında izole edilip, uygun bir gıda ortamına yerleştirilerek geliştirilmesidir. Bahçe bitkilerinde bu tekniğin kullanılmasıyla bitkiler hızlı üretilmektedir. Ayrıca meristemleri oluşturan hücreler genetik olarak stabil olduğundan, rejenere olmuş bitkiler donör bitkiye genetik olarak eş olmaktadır. Genetik stabilite özellikle deneysel materyalde çok istenir ve çok gereklidir. Meristem kültürünün en önemli uygulaması patojenden, özellikle virüsten ari bitki üretimidir ve ayrıca bu gibi virüsten ari gemplazmlarının uzun süre muhafaza edilmesini de sağlar.

Bu avantajlardan dolayı bahçe bitkilerinde, özellikle son 20 yıl içerisinde yaygın olarak kullanılmaya başlanan meristem kültürü tekniğinde pek çok faktör başarıyı etkilemektedir. Bu faktörler; donör bitki, explant, çevresel şartlar (sıcaklık, ışık ve nem) kültür ortamı, büyümeyi düzenleyiciler, tuz konsantrasyonu, kültür kapları olarak sıralanabilir.

* Prof. Dr.; U.Ü. Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü.

** Araş. Gör.; U.Ü. Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü.

SUMMARY

Meristem Culture Technique in Horticultural Crops and Factors Affecting The Success

The basis of meristem culture is to isolate the meristem together with a few leaf primordia under binocular microscope and to place it into a suitable nutrient medium for development. Horticultural crops can be rapidly propagated using this technique. Moreover, because the cells that form the meristems are genetically stabil, the regenerated plants are genetically identical to the donor plant. Genetical stability is especially desirable and also essential with the experimental material. The most important application of the meristem culture is particularly the production of virus-free plants and it also ensures the long period storage of such virus-free germplazms.

Many factors affect the success in meristem culture technique which has been widely used in horticultural crops because of the advantages mentioned above. These factors are; donor plant, explant, environmental conditions (temperature, light and humidity), culture medium, growth regulators, salt concentration and culture containers.

GİRİŞ

Bugün "bitki doku kültürü" terimi, geniş anlamda bütün bitkilerin ister tek bir hücreden, isterse bir doku veya organdan olsun, aseptik koşullar altında *in vitro*'da yetiştirilmesi için kullanılmaktadır (Biondi ve Thorpe 1978, Hess 1984, Gönülşen 1987). Bu nedenle yöntemin diğer adları "mikro üretim" veya "aseptik kültür" dür. Embriyo, meristem, kallus, protoplast kültürleri gibi çeşitli kültür tiplerini ayırt etmek mümkün olduğu için "bitki doku kültürü" tabiri, farklı aseptik kültür şekillerini kapsayan genel bir ifade olarak kullanılmaktadır (Gönülşen 1987, Mengüç 1988).

Bu tekniğin; üretimi güç olan bitkilerin daha kolay üretilmesini, yeni ıslah edilmiş çeşitlerin hızla arttırılmasını ve istenen çeşitlerde üretimin yıl boyunca sürekli yapılmasını sağlamak şeklinde bazı avantajları vardır. Doku kültürünün "mikro üretim" safhaları uygun indeksleme ve explant kurma teknikleri ile kombine edildiği zaman, bu teknik sayesinde çok fazla miktarda, bilinen hastalıklardan arı sağlıklı ve bir örnek bitki üretimi yapmak mümkündür (Zimmerman 1981). Bunların yanında bu yöntem sayesinde dokular röntgen ışınlarından geçirilerek mutasyonlar elde edilebilmekte, bitki genetik ıslah kaynağı materyalinin uzun süreli muhafazaya alınmasını sağlamakta, anterlerden haploid bitkilerde elde edilebilmektedir (Mengüç 1988, Şeniz 1990).

Bununla birlikte, her doku kültürü tipi yukarıda sayılan konuların yalnızca bir veya birkaçını elde etmemizde bize yardımcı olmakta ve tüm bitkilerde olumlu sonuç vermemektedir. Burada bahçe bitkilerinde "meristem kültürü" ve kültürde başarıyı etkileyen faktörler üzerinde durulacaktır.

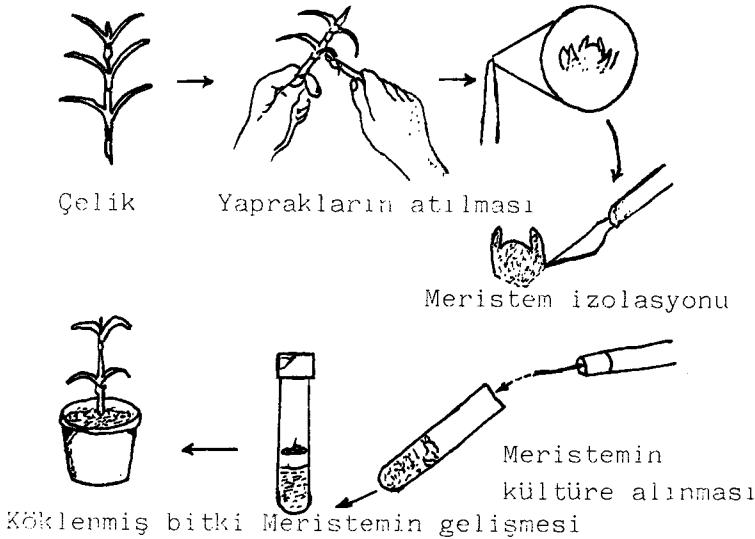
MERİSTEM KÜLTÜRÜ

Meristem, devamlı olarak bölünebilme yeteneğine sahip hücrelerin oluşturduğu dokulardır. Bu dokular sayesinde, bitkiler yeni hücre ve organlar kazanarak büyürler (Gönülşen 1987). Hayvanlarda organ oluşumu belirli bir zaman içerisinde sınırlanmıştır. Halbuki bitkilerde teorik olarak bütün hayat süresince devam eden bu olay, meristem diye adlandırılan özel küçük hücre kitlelerinin varlığıyla garanti altına alınmıştır (Başaran 1988).

Meristem dokuları, bitkide bulundukları bölgelere göre; apikal (uç), interkalar (ara) ve lateral meristemler olmak üzere başlıca üç grup altında toplanabilmektedir (Gönülşen 1987).

Apikal meristem genellikle bir sürgünün en ucunda lokalleşmiş, kubbe şeklinde bir doku olup, çapı yaklaşık olarak 0.1 mm ve uzunluğu da 0.25-0.30 mm'dir (Kantha 1981).

Meristem kültürünün esası; meristemin birkaç yaprak taslağı ile birlikte, binoküler mikroskop altında izole edilip, uygun bir gıda ortamına yerleştirilerek geliştirilmesidir (Şekil: 1) (Gönülşen 1987).



Şekil: 1
Meristem kültürü uygulaması

Meristem ve altındaki dokuların kullandığı meristem kültürü, son 20 yıl içerisinde yaygın olarak kullanılmıştır. Bahçe kültürü endüstrisinde bu tekniğin kullanılmasıyla bitkiler hızlı üretilenmiştir. Ayrıca meristemleri oluşturan hücreler genetik olarak stabildir, rejenere olmuş bitkiler donör bitkiye genetik olarak eş olmaktadır. Genetik stabilite özellikle, deneysel materyalde çok istenir ve çok gereklidir. Meristem kültürünün en önemli uygulaması patojenden, özellikle virüsten ari bitki üretimidir ve ayrıca bu gibi virüsten ari germplazmalarının uzun süre muhafaza edilmesini de sağlar (Kartha 1981).

MERİSTEM KÜLTÜRÜNDE BAŞARIYI ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Donör Bitki

Donör bitkinin fizyolojik dönemi meristematik explantın davranışı üzerine oldukça fazla etkilidir. Örneğin, olgun *Tectona grandis* (Hint meşesi) ağaçlarından alınan sürgün uçları genç ağaçlardan alınanlara oranla farklı konsantrasyonlarda büyümeyi düzenleyicilere ihtiyaç göstermiştir (Styer ve Chin 1983).

Kartha (1981) ve Gönülşen (1987)'nin bildirdiğine göre karanfil meristemleri, erken ilkbahar ve sonbaharda bitkilerden alındığı zaman kışın ve yazın alınınlardan daha uzun yaşamaktadır. Soğanlar ve soğanımsı gövdelerden (corm) dinlenme periyodunun sonlarında meristem alınması en iyisidir.

Belirli dinlenme periyotları olan bitki türleri için en iyi sonuçlar, explantlar bunların dinlenme periyotları sonunda alındığında elde edilmiştir (Hu ve Wang 1983).

Donör bitki üzerindeki tomurcukların konumu da önemlidir. Kuşkonmaz pençesinin dip tomurcukları tepe yanındaki tomurcuklardan çok daha hızlı gelişmiştir. Bektaşı üzümü (*Ribes* sp.)'nün sadece terminal tomurcuklarından başarılı olarak kültür yapılmıştır. Gövdenin orta bölümünden alınan axillary gül tomurcukları, tepe veya gövdenin dip kısmına yakın tomurcuklardan çok daha hızlı gelişmiştir (Styer ve Chin 1983).

Explant

Tüm explantlar sürgün uçlarından oluşmuştur. Fakat, bunlar ölçü ve yaprak primordia sayısı bakımından farklılık gösterir.

Çok küçük explantlar kullanıldığında yaprak primordiasının bulunması bir explantın gelişme kabiliyetini belirler. Ravent için, iki-üç primordial yapraklı uç alınması esastır. Daha küçük uçlar gelişemez (Hu ve Wang 1983).

Bununla birlikte, amaç viral enfeksiyon eliminasyonu olduğu zaman rejenere olabilecek çok küçük meristemler kullanılmalıdır. Karanfilde çoğunlukla 0.2 ve 0.5 mm arasındaki uçlar virüsten ari bitkiler üretmektedir (Hu ve Wang 1983, Styer ve Chin 1983).

Alınan explantın sterilizasyon işlemi de başarıyı etkiler. Genelde yaygın olarak kullanılan yüzey dezenfektanı sodyum hipoklorittir (NaClO). Bitki parçaları genellikle 5-15 dak kadar sodyum hipokloritin (% 0.5-0.75 NaClO) % 10-15'lik bir solüsyonu içine batırılır. Konsantrasyon daldırma süresine göre arttırılıp, azaltılabilir. Doku zararlanması ve hücre ölümü yüksek konsantrasyonlardan kaynaklanabilir (Hu ve Wang 1983).

Diğer kullanılan yüzey dezenfektanları kalsiyum hipoklorit ve mercury klorit içerir. Bunlar NaClO'ya benzer konsantrasyonlarda kullanılır. Tüm dezenfeksiyon kuvvetine karşın bazı türlerde bulaşma güçlük yaratır. Bunun nedeni, bazı içsel mikroorganizmalardır. Bunlar, explant dokusu içine sığınmışlardır. Bazıları yavaş gelişir veya gizlidir ve birkaç subkültürde görünür olmaktadır (Hu ve Wang 1983).

Çevresel Şartlar (Sıcaklık, Işık ve Nem)

Yetiştirme çevresi, yetiştirme ortamı dışındaki tüm çevresel faktörleri içerir. En önemlilerinden ikisi inkubasyon sıcaklığı ve ışık rejimidir. Genellikle 24°-26°C gibi değişmez bir inkubasyon sıcaklığı kullanılır (Kantha 1981, Hu ve Wang 1983, Styer ve Chin 1983, Gönülşen 1987). Inkubasyon sıcaklığı 28°C üzerine çıkarıldığında su, bitkiler ve kapların duvarlarında kondanase olmaya eğilim gösterir ve bu bitki gelişimini sınırlar (Hu ve Wang 1983). 17°C gibi daha düşük sıcaklıklar *Asparagus plumosus* gibi bitkiler için uygundur (Styer ve Chin 1983).

Değişim gösteren gündüz: gece sıcaklığına bazı bitkiler ihtiyaç gösterebilir. Asma (*Vitis* spp.) gibi bazı türler ile özellikle sıcaklığa, çöl iklimine adapte olmuş bitkilerde durum böyledir (Hu ve Wang 1983, Styer ve Chin 1983).

Uzun fotoperiyotlar (12-24 h/gün) bazı istisnalar ile birlikte dormansinin inhibe edilmesi ve *in vitro*'da gelişmeyi arttırmak için kullanılmaktadır. En yaygın kullanılan fotoperiyot rejimi 16 saat gündüz ve 8 saat gecedir (Hu ve Wang 1983). Işık intensitesi genellikle 1-10 klx'tür. Yüksek polyfenol içeren explantlar için ışık doku kahverengileşmesini uyardığından, ışık intensitesini 1 klx'ün altına düşürme ve karanlıkta inkubasyon istenir. Bazen bitkilerin serada daha uzun süre yaşayabilme kabiliyetini arttırmak için toprağa transfer edilmenden önce daha yüksek ışık intensitesinde (10 klx gibi) inkubasyonu yapılır. Bununla birlikte yüksek ışık intensitesi kök gelişmesini engellemektedir (Styer ve Chin 1983).

Hava nemi, inkubasyon esnasında nadiren kontrol edilir. Çoğunlukla % 70 olacak şekilde, % 60-80 arasında nem ayarlanır (Hu ve Wang 1983).

Kültür Ortamı

Meristemlerin % 0.6-0.8 agar ile sertleştirilmiş besin ortamı üzerinde başarılı bir şekilde kültürü yapılmaktadır (Kantha 1981, Styer ve Chin 1983). Fa-

kat, orkide gibi bitkilerden alınan meristemler ortama fazla miktarda fenolik bileşikler salgırlar. Öyle ki, sonuçta hücre zehirlenmesi meydana gelir. Bu gibi durumlarda veya pigmentlerin explantdan ortam içine salgılandığı durumlarda, sıvı bir ortamın kullanılması, periyodik aralarla kültür ortamı değiştirildiği için tercih edilebilir (Kartha 1981).

Kültür ortamının pH'sının da kültürdeki meristemleri etkilediği belirlenmiştir. Genellikle pH'nın 5.6-5.8 olduğu asidik bir ortam meristemlerin çoğunun gelişmesine uygundur (Kartha 1981).

Meristem kültüründe kullanılan tüm ortamlar genelde pek çok temel bileşiklere sahiptir. Hemen hemen tüm ortamlar, tipik olarak % 1-3 arasındaki konsantrasyonlarda, karbon kaynağı olarak sakkaroz içermektedir (Styer ve Chin 1983).

Çeşitli araştırmacılar tarafından hazırlanmış ve onların adları ile anılan gıda ortamları vardır: Murashige ve Skoog, White, Gautheret, Nitsch, Hildebrandt ve ark., Heller, Reinert ve White, Gamborg ve ark., Schenk ve Hildebrandt ortamları bunlardan bazılarıdır (Hu ve Wang 1983, Styer ve Chin 1983, Gönülşen 1987). Farklı bitkilere ait hücre, doku ve organların gelişmesini sağlayacak tek bir gıda ortamı yoktur. Bütün gıda ortamları farklı makro, mikro inorganik bileşikler ile organik bileşiklerden oluşur (Gönülşen, 1987).

Ortama çoğunlukla ilave edilen organik maddeler, tiamin, nikotik asit ve pyridoksin vitaminleri, glycine amino asit ve M-inositol'dür. B5 ortamı vitaminleri, MS ortamındakiler kadar geniş kullanılmaktadır. Daha mükemmel bir vitamin formülasyonu Staba tarafından geliştirilmiştir. Bununla birlikte Staba vitaminlerinden biri olan riboflavin bazı türlerde kök oluşumunu engellemektedir. Hindistan cevizi sütü gibi organik maddeler de ortama ilave edilerek kullanılmıştır. Diğer ilave edilen organik maddelerden, aktif kömürün elma sürgünlerinin kök oluşumunu arttırdığı belirtilmekle birlikte, bu Japon eriklerinde (*Prunus salicina*) köklenmeyi engellemektedir (Styer ve Chin 1983).

Büyümeyi Düzenleyiciler

Uygun bir sitokinin ve oksin dengesi tüm bitkilerin rejenerasyonu için gereklidir. *In vitro*'da gelişen sürgünler tarafından az miktarda sitokinin sentezlenebilirken, kökler sitokinin biosentezinin asıl yeridir. Meristem, sürgün ucu ve tomurcuk explantlarının büyüme ve gelişmeyi destekleyecek yeterli içsel sitokinine sahip olması olası değildir (Kartha 1981, Hu ve Wang 1983, Mantell ve ark. 1985). Bu nedenle Safha I (kültürün oluşturulması)'de kullanılan ortamların çoğuna bir sitokinin ilave edilir. Çoğunlukla 3 sitokinin kullanılır. Bunlar kinetin (KIN), N⁶-benzyladenine (BA) ve N⁶-(2-isopentenyl)-adenine (2iP)'dir. BA, meristem, sürgün ucu ve tomurcuk kültürleri için en etkili olanıdır ve bunu KIN ta-

kip eder. 2iP az sıklıkta kullanılmaktadır. Bir bitkide etkisiz olan sitokinin diğere etkili olabilir. Örneğin, 2iP *Ericaceae* bitkileri için uygun olan sitokininidir (Hu ve Wang 1983).

Oksin sürgün gelişimi için ihtiyaç duyulan diğer bir hormondur. Genç sürgün uçları oksin biosentezinin aktif bir yeri olduğundan, özellikle aktif olarak gelişmekte olan bitkilerden alınmış sürgün ucu explantları kullanıldığında Safha I ortamında dışsal oksine her zaman ihtiyaç yoktur. Dinlenme halindeki tomurcuklar ile 0.4 mm veya daha az uzunluktaki meristemler sürgün gelişmesi için yeterli içsel oksin üretmeyebilir. Bu gibi durumlarda, dışsal oksin ilavesine ihtiyaç vardır. IAA, IBA, NAA ve 2,4-D en çok kullanılan oksinlerdir. IAA, dört oksin arasında en zayıfıdır ve yüksek IAA-oksidad aktivitesine sahip dokular ve ışık tarafından inaktive olur. Bununla birlikte IAA etkili olduğu zaman organ oluşumu üzerine minimum zararı gösterir. Bunun aksine, 2,4-D en kuvvetlisidir. Kallus oluşumunu uyarır. Bu nedenle NAA, meristem, sürgün ucu, tomurcuk kültürleri için çoğu zaman rutin olarak kullanılan oksindir (Hu ve Wang 1983).

Gibberellin çok az ortamda bulunur. Buradan anlaşılan, bu hormonun pek çok explant tarafından yeterli miktarda sentezlendiğidir (Hu ve Wang 1983).

Sitokinin Safha II, axillary sürgün çoğalımında sürgünlerin apikal dominansisini kırmak ve yaprak koltuklarından lateral tomurcukların dallanmasını arttırmak amacıyla kullanılmaktadır. Genelde, BA axillary sürgün çoğalımını uyaran etkili sitokinin olarak bilinir, bunu azalarak KIN ve 2iP takip eder (Hu ve Wang 1983).

Dışsal oksinler axillary sürgün çoğalımını uyarmaz, fakat normal bir gelişme için ihtiyaç vardır. Oksinlerin mümkün rollerinden biri, axillary sürgün uzaması üzerine yüksek sitokinin konsantrasyonunun gizli etkisini önlemek ve normal sürgün gelişimini ayarlamaktır (Hu ve Wang 1983).

Safha III'ün amacı, Safha II veya bazı durumlarda Safha I'de oluşmuş sürgünlerde ve oluşmuş tam bitkilerden adventif köklerin rejenerasyonudur. Köklenmenin başlaması, yüksek oksine, düşük sitokinin oranıyla olmaktadır. Safha II'den elde edilen sürgünlerde yeterli artık sitokinin bulunur; bu nedenle Safha III ortamında ya az, ya da hiç sitokinine gerek duyulmaz (Hu ve Wang 1983).

Genç sürgünler, oksin üretiminin zengin bir kaynağı olduğundan, çoğu türlerde, Safha III ortamına oksin ilavesi gerekmez. Oksin konsantrasyonu çok yüksek olduğu zaman kallus oluşacaktır ki, bu normal kök gelişmesini engeller. Safha III'de çok yüksek bir oksin konsantrasyonunun istenmemesinin diğer bir sebebi kök başlangıcından sonra "kök uzama" fazı esnasında oksin konsantrasyonuna çok hassas olma ve yüksek konsantrasyon tarafından bunun engellenmesidir. Sürgünler 4-8 gün kadar oksin içeren bir "kök oluşturma ortamında" kültürü yapıldıktan sonra, oksin bulunmayan "kök geliştirme ortamına" transfer edilir. Bu işlem kallus oluşumunu etkili bir şekilde önler ve % 95'lik bir köklenmeyle so-

nuçlanır. Devamlı oksinle temasta olan diğer kültürlerle karşılaştırıldığında, kök sayısında 3 katı bir artış görülmüştür (Hu ve Wang 1983).

Pennazio'ya göre, GA₃ patates meristem kültürlerinin köklenme yüzdesini arttırmaktadır. Diğer yandan Mosella Chanael ve ark., *in vitro*'da şeftali köklenmesinde GA₃'ün önleyici bir etkiye sahip olduğunu gözlemiştir (Hu ve Wang 1983).

Tuz Konsantrasyonu

B5, LS, MS ve NN ortamlarının tümü yüksek N, P ve K tuz ortamlarıdır. Bazen kökler bulunan hormonun tipi ne olursa olsun, yüksek tuz konsantrasyonunda oluşamamaktadır. Ortamdaki tuz konsantrasyonu standart sertliğin yarısına, 1/3 veya 1/4'ne düşürüldüğünde köklenme artmaktadır (Hu ve Wang 1983).

Kültür Kapları

Meristem kültürü için çoğunlukla cam kaplar kullanılmaktadır. Genellikle bunlar 10x12 cm büyüklüğündeki pyrex tüplerdir. Manihot meristemlerinin 120 ml'lik cam kavanozlarda bulunan 30 ml besin ortamı üzerinde kültürü yapıldığında sürgün oluşumunun gecikmesi ve bol kallus oluşumuna rağmen küçük tüplerde kültür yapıldığında minimal kallus oluşumu ile meristemlerden bitkicikler oluşmaktadır. Benzer olarak, *Gladiolus* meristemleri küçük tüplerde büyük tüplerdekenden daha iyi gelişmektedir (Kantha 1981).

SONUÇ

Son 20 yıl içerisinde meristem kültürü tekniği, bahçe bitkilerinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu durumda özellikle, tekniğin kullanılmasıyla bitkilerin hızlı üretilmesi, elde edilen bitkilerin donör bitkiye genetik olarak eş olması, patojenden, özellikle virüsten ari bitki üretimi ve ayrıca bu gibi virüs-ten ari gremlazmalarının uzun süre muhafaza edilmesi rol oynamıştır.

Bu tekniğin kullanılmasında en büyük başarı otsu bahçe bitkileri türlerinde elde edilmiştir. Bu başarı kısmen apikal dominansının zayıf ve çoğu otsu bitkinin kuvvetli kök rejenerasyon kapasitesine, kısmen de sera ve fidancılık endüstrisindeki finansal desteğe bağlıdır. Odunsu türlerin mikro üretimi, otsu bitkilerle karşılaştırıldığında geride kalmıştır. Bu kısmen, odunsu çoğu türlerin dokusundaki polyfenolik bileşiklerin büyük miktarlarda bulunması ve kısmen de axillary tomurcukların dinlenme dönemini kırmanın güçlüğü nedeniyle.

Donör bitki, explant, çevresel şartlar (sıcaklık, ışık ve nem), kültür ortamı, büyümeyi düzenleyiciler, tuz konsantrasyonu, kültür kapları gibi pek çok faktör başarıyı etkilemekte olup, bunlar her bitkiye göre değişim göstermektedir.

KAYNAKLAR

- BAŞARAN, D. 1988. Bitki Doku Kùltürleri. Dicle Üniv. Fen-Edebiyat Fak. Biyoloji Bölümü, Ders Notları, Diyarbakır, s. 199.
- BIONDI, S. ve THORPE, T. A. 1978. Requirements for A Tissue Culture Facility. (Ed. Trevor A. Thorpe) Plant Tissue Culture Methods and Applications in Agriculture. Academic Press, Inc., Orlando, Florida 32887, 1-19.
- GÖNÜLŞEN, N. 1987. Bitki Doku Kùltürleri, Yöntemleri ve Uygulama Alanları. T.C. Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü. Yay. No: 78, Menemen-İzmir, s. 140.
- HESS, C.E. 1984. Biotechnology: Implications for Horticulture and Society. HortScience 19(5), October.
- HU, C.Y. ve WANG, P.J. 1983. Meristem, Shoot Tip and Bud Cultures (Chapter 5). (Ed. David A. Evans, William R. Sharp, Philip V. Ammirato and Yasuyuki Yamada) Handbook of Plant Cell Culture. Techniques for Propagation and Breeding. Vol. I, Macmillan Publishing Company, A Division of Macmillan Inc., New York, 124-177.
- KARTHA, K.K. 1981. Meristem Culture and Cryopreservation Methods and Applications. (Ed. Trevor A. Thorpe) Plant Tissue Culture. Methods and Applications in Agriculture. Academic Press, Inc., Orlando, Florida, 32887, 181-211.
- MANTELL, S.H., MATTHEWS, J.A. ve MC. KEE, R.A. 1985. Principles of Plant Biotechnology. An Introduction to Genetik Engineering in Plants. Blackwell Scientific Publications.
- MENGÜÇ, A. 1988. Doku Kùltürleri Yöntemleriyle Fide ve Fidan Üretim Teknikleri. Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı, Çanakkale Meyvecilik Üretme İstasyonu Müdürlüğü, Yay. No: 7, Çanakkale, s. 30.
- STYER, D.J. ve CHIN, C.K. 1983. Meristem and Shoot-Tip Culture for Propagation Pathogen Elimination and Germplasm Preservation (Ed. J. Janick) Horticultural Reviews Vol. 5, Avi Publishing Company, Inc., Westport, Connecticut, 221-265.
- ŞENİZ, V. 1990. Bahçe Bitkilerinin Islahı (Genişletilmiş II. Baskı). Uludağ Üniv. Zir. Fak. Ders Notları: 13, Bursa.
- ZIMMERMAN, R.H. 1981. Tissue Culture for the Practical Plant Propagator-State of The Art. Agricultural Research Service U.S. Department of Agriculture Beltsville, Maryland, 20705, 559-562.

