

KALKAN BALIĞINDA KIKIRDAK VE KEMİK BOYAMA YÖNTEMİ

İlhan AYDIN, Ercan KÜÇÜK– SÜMAE

Kıkırdak ve Kemik Boyama Tekniği

1927'den 1968'e kadar metilen mavisi ve toluidin mavisi, kıkırdak dokuları, alizarin red S, kemik dokuları boyamak, KOH ise dokuların şeffaflaştırılması için tavsiye edilmekteydi. Ancak daha sonraları, bu tekniklerin güvenilir sonuç vermediği düşünülmeye başlandı. 1971 yılında E.V. Simons ve J.R. Van Horn taze embriyonik civciv örneklerinde alician blue kullanımını önermiştir. Bu teknik bazı değişikliklerle birçok balık türünde mükemmel sonuçlar vermiştir. Bahsi geçen çalışmaları takiben 1976'da alician blue kullanarak formalin ile fiske edilmiş örneklerin kıkırdak dokularının boyanması tekniğini R.J. Wassersug uygulamıştır. 1977 yılında G. Dingerkus ve L.D. Uhler yukarıda bahsedilen tekniklerden de yararlanarak, kemik ve kıkırdak dokuyu izlemek istemişlerdir. Bunun için hem suda hem de karada yaşayan yüz civarında omurgalı (balık, sürüngen, kuş, memeli) örneği üzerinde çalışmışlar ve güvenilir sonuçlar elde etmişlerdir. Bu yöntem ile vücut temiz ve şeffaf, kıkırdak doku koyu mavi ve kemik doku koyu kırmızı renk almaktadır. Tripsin veya KOH örneğin şeffaflaşmasını ve dokulardaki aşırı mavi rengin uzaklaştırılmasını sağlamaktadır (1). Bu teknik 3 mm'den 500 mm'ye kadar tüm boylar için kullanılabilen fakat kullanılan solüsyonlardaki muamele süresi örnek boyuna bağlı olarak değişebilmektedir (2).

Kullanım Sahası

Kemik ve kıkırdak boyama tekniği balıklarda müze çalışmalarında ve özellikle de araştırma çalışmalarında kullanılmaktadır. Bu teknik balıkların kemiksi yapısını incelemekte, karşılaştırmalı anatomi, kıkırdak ve kemik dokuların incelenmesinde kullanılmaktadır (1). Bu yöntemler, yetiştiriciliğin ilk aşaması olan larva evresinin incelenmesinde özellikle anormalliklerin tespitinde kullanılabilir. Çene yapılarındaki bozuklukların neden olduğu beslenememe ve larva ölümlerinin birbiriyle ilişkisi incelenebileceği gibi, hava kesesi oluşumunun neden olduğu lordosisin de ortaya çıkarılabilmesinde kullanılabilir. Diğer taraftan ikili boyama tekniği, larva survey

çalışmalarının ardından yapılan tür tespitlerinde de vazgeçilmez yardımcı durumundadır.

Uygulanışı

Kalkan balığında kıkırdak dokuların boyanması için alician blue, kemik dokuların boyanması için alizarin red S kullanılmıştır. Dokuların saydamlaştırılmasında KOH, yağ dokularının uzaklaştırılmasında ise ksilen uygulanmıştır (3).

Formaline tabi tutulmuş örnekler; alician blue, KOH ve alizarin red S solüsyonu içerisinde farklı sürelerde tutularak her biri için gerekli olan bekleme süreleri tespit edilmiştir. Bu amaçla enstitümüzde yetiştirilen 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 günlük kalkan yavruları kullanılmıştır (Şekil 1).



Şekil 1. Kalkan balığı yavrusu

1) Numunenin formalin ile muamele edilmesi (fixation)

Yeni örnekler %10'luk formalin içinde 2-3 gün bekletilir. Daha önceden alkolde tutulmuş örnekler ise yeniden %10'luk formalin ile muamele edilir.

2) Numuneden formalinin uzaklaştırılması (washing)

Küçük balıklar 2-3 gün havalandırılan suda bekletilir.

3) Kıkırdak boyama (cartilage staining)

- Kıkırdak dokuyu boyamak için aşağıdaki solüsyon hazırlanır: Alician blue: Glacial asetik asit: %96'lık Etanol = 1:1:4 oranında karıştırılır.
- Kağıtla kurutulmuş örnekler solüsyona batırılır.
- Örnekler her iki tarafta da kıkırdak doku görülene kadar (2 saat-1 gün) 25°C'lik ortamda muhafaza edilir.

4) Suyun alınması (dehydration)

Örnekler %50'lik etanol içine koyularak 25°C'de yaklaşık 2 gün bekletilir.

5) Dokuların yumuşatılması (maceration)

Etanolden çıkarılan örnekler saf su ile yıkanır ve %2-4'lük KOH içinde 25°C'de 2 gün (örneklerin omurgası görülene kadar) bekletilir.

6) Kemik boyama (bone staining)

- Kemik dokuyu boyamak için alizarin red S solüsyonu aşağıdaki gibi hazırlanır; Glacial asetik asit ile alizarin red doyurulur. Sonra glacial asetik asitli alizarin red; gliserol ve %1'lik Kloral hidrat, 1:2:12 oranında karıştırılır.
- Örnekler saf su ile yıkandıktan sonra %0,5'lik KOH çözeltisine koyulur ve üzerine alizarin red S solüsyonundan birkaç damla (çözeltinin rengi koyu mor olana kadar) damlatılır.
- Örnekler 25°C'de 2 saat (kemik doku kırmızıya boyanana kadar) bekletilir. Sonra temiz %0,5'lik KOH çözeltisinde 12 saat tutulur.

7) Suyun alınması (dehydration):

Örnekler 1-2 gün için %50'lik etanol içinde ve 25°C'de bekletilir.

8) Yağ ve ksilenin uzaklaştırılması

Eğer gerek görülürse yağı uzaklaştırmak için örnekler saf su ile yıkanır, % 100'lük ksilen içinde 0,5-2 saat bekletilir. Ksileni uzaklaştırmak için ise örnekler % 70'lik etanol içinde ve 25°C'de 1-2 gün tutulur.

9) Şeffaştırma (clearing)

Örnekler %96'lık etanol ve saf gliserinin sırasıyla 2:1, 1:1, 1:2 oranda karışımlarıyla 25°C'de ikişer gün bekletilir.

10) Saklama (preservation)

Örnekler çalışılana kadar oda sıcaklığında saf gliserin içine muhafaza edilir. Örnekte mantar ve bakteri oluşumunu önlemek için bir damla tymol ilave edilir (Şekil 2).



Şekil 2. Kemik ve kıkırdak boyama yöntemi uygulanmış kalkan balığı yavrusu

Teşekkür

Kıkırdak ve kemik boyama tekniğinin enstitümüzde kullanılabilmesi için, bizlere fikirleri ve uygulamadaki işbirliği ile destek sağlayan Japon uzman sayın Hiroshi Iwamoto'ya teşekkürü bir borç biliriz.

Kaynaklar

1. Dingerkus, G. and Uhler, L.D. 1977. Enzyme Clearing of Alician Blue Stained Whole Small Vertebrates for Demonstration of Cartilage, *Stain Technology*, 52, (4): pp.229-232
2. Potthoff, T. 1984. Clearing and Staining Techniques "In Ontogeny and Systematics of Fishes Special Publication 1 American Society of Ichthyologists and Herpetologists, Allen Pres, pp.35-37
3. Kawamura, K. and Hosoya., K. 1991. A Modified Double Staining Technique for Making a Transparent Fish-Skeletal Specimen Bulletin National Research Institute Aquaculture, 20: pp.11-18