

Geliş Tarihi : 17.07.2000

## Cevizlerde Embriyonik Dokulardan Hızlı Parafin Yöntemiyle Kesit Alınması

Tarık YARILGAÇ<sup>(1)</sup>

Hüdaî YILMAZ<sup>(1)</sup>

M.Atilla AŞKIN<sup>(2)</sup>

**Özet:** Bu çalışmada cevizlerde (*Juglans regia* L.) çimlenme sonrası gelişen embriyonik dokular üzerine erken dönemlerde yapılan aşılarda anatomik ve histolojik gözlemlerini yapabilmek için daha kısa sürelerde süratle kesit alabilme imkanı sağlayan mikro-dalga fırın ile hızlı parafin yönteminin uygulanabilirliği üzerinde durulmuştur. Özellikle canlılıklarını koruyan yongalı göz aşılarda örnekleri, küçük parçalar haline getirilmiş ve mikro-dalga yöntemine tabi tutulmuştur. Parafine doyurulan parçaların kesitleri, Rotary mikrotomla 12-15 mikron kalınlığında alınmıştır. Bu yöntemin uygulanmasıyla 1-2 gün gibi çok kısa sürelerde çalışmaların sonuçlandırıldığı gözlenmiş ve bu tür araştırmalarda da rahatlıkla kullanılabilceği belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Ceviz, mikro-dalga, aşılama, embriyonik doku, preparasyon tekniği

### Sectioning of Embrionic Tissues of Walnut by the Method of Fast Paraffin

**Abstract:** In this study; it was aimed to investigate the applicability of paraffin method with microwave, supplying opportunity for fast sectioning in order to monitor histological and anatomical structure of grafting made in early stages of embryonic tissues growing after germination, on walnut (*Juglans regia* L.). Especially the samples of alive bud grafting were sliced into small pieces and treated with the microwave method. The sections from pieces saturated with paraffin were taken by microtom in dimensions of 12-15 micron. The results suggested that the microwave method is easier to use and more time-saving than the classical one.

**Key words:** Walnut, microwave, grafting, embryonic tissue, preparation technique

#### Giriş

Çeşitli meyve türlerinde farklı amaçlara yönelik yapılan, anatomik ve histolojik incelemeler gerektiren araştırmalarda, farklı türlerin çiçek, meyve, tohum sürgün gibi değişik bitki dokularından kesitler alınmasına ve incelenmesine imkan veren teknikler kullanılmaktadır. Kullanılan bu tekniklerle değişik bitkiler üzerinde yapılan aşılama çalışmalarında da anatomik ve histolojik olarak bitkilerin aşı bölgeleri dönem dönem incelenebilmekte olumlu veya olumsuz faktörler ortaya konulmaya çalışılmaktadır (Moore ve Walker, 1981).

Parafin yöntemi, günümüzde bu tür amaçlar için kullanılan ve kesitlerin daimi preparat haline getirilmesinde sıkça başvurulan tekniklerin başında gelmektedir (Aşkın ve ark., 1995). Ancak kesit alınacak ve incelenecek farklı türlerde, parafin yöntemiyle dokuların kesit almaya elverişli hale getirilmesi çok kısa süreler de mümkün olmamakta hatta özellikle sert dokularda bu klasik yöntemde materyalin parafine doyurulması uzun bir zaman alabilmektedir (Tekintaş, 1988; Balta, 1993; Yarılgâç, 1993; Aşkın ve ark., 1995). Bunun yanında parafine doyurma işlemlerinin uzunluğu materyalin dokusuna bağlı olarak da değişiklik gösterebilmektedir. İşte bu bakımdan

değişik bitki dokularından kesit alma sürelerini kısaltacak tekniklerin kullanımı önem kazanmaktadır.

Aşkın ve ark. (1995) Bahçe Bitkileri preparasyon tekniği uygulamalarında mikro-dalga tekniğinin, sonuca ulaşırma da yeni ve hızlı bir yöntem olduğunu, preparatlarda bozulmaya neden olmadan preparasyon süresini kısalttığını bildirmişlerdir. Bu çalışmalara ilaveten Balta ve Aşkın (1995), Balta ve ark. (1996) ceviz, asma ve kestane gibi sert dokulara sahip türlerde yapılan aşılama çalışmalarından kesitler alınmasında, mikro-dalga yönteminin başarılı sonuçlar verdiğini belirlemiştir.

Mikro dalga fırınının temelinde ise; trioid vakum tüpüne alternatif olarak geliştirilen magnetronun yaydığı ışınların ısıtılmak istenen maddelerdeki atom ve moleküllerin var olan doğal titreşimlerini çok büyük değerlere yükselterek bir iç ısınması sağlaması yatmaktadır (Foster and Pickard 1987, Umar ve ark., 1990).

Bu çalışmada, literatürde, cevizlerde kotiledon aşılarda başarılı sonuçlar verdiğine dair bilgiler dikkate alınarak (Şen, 1986), cevizler de çimlenme sonrası gelişen genç dokulardan (embriyonik dokular) kısa sürede kesit alınabilme imkanları araştırılmıştır.

<sup>(1)</sup> Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü 65080-VAN

<sup>(2)</sup> Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü-İSPARTA

## Materyal ve Yöntem

Bu çalışma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümünde kontrollü şartlarda yürütülmüştür. Ceviz tohumları çimlendirilip sürgün gelişmeleri 15-40 cm olunca ve çapları 3-4 mm kalınlığına ulaşınca üzerlerine aşı yapılmıştır. Araştırma, çimlenme sonrası belirli dönemlerde kesitlerin alınarak doku farklılıklarının belirlenmesi şeklinde, aşı yapılan materyallerden 25. ve 43. günlerde alınan örnekler üzerinde sürdürülmüştür. Kesitler, Rotary mikrotomla alınmadan önce FAA (%70 Etil Alkol, 90 cc+Form Aldehit 5 cc+Clacial Asetik Asit 5cc) ortamında bekletilmişler, hemen sonra mikrodalga da muameleye tabi tutulmuşlardır. İyiye küçültülen parçalar parafinle doyurulmak amacıyla mikrodalga fırında, Çizelge 1'de görüleceği üzere, belirli aralıklarla uygulama altında tutulmuşlardır.

Çizelge 1. Mikro-Wave yönteminin kullanılarak parafin metoduna göre bitki örneklerine sırayla muamelelerin uygulanması

Muameleler	Muamele sayısı	Mikrodalga fırın ısıtma kademesi	Muamele süresi (dakika)	Soğutma süresi (dakika)
%70 Alkol	1	1	5	3
%70 Alkol	1	1	5	5
%80 Alkol	5	1	2	2
%90 Alkol	5	1	2	2
%96 Alkol	9	1	1.5	2
Alkol+Ksilol				
5 + 1	5	1	2	2
4 + 2	5	1	2	2
3 + 3	5	1	2	2
2 + 4	5	1	2	2
1 + 5	5	1	2	2
Ksilol	5	1	2	2
Ksilol	5	1	2	2
Ksilol+Parafin				
5 + 1	5	1	2	2
4 + 2	5	1	2	2
3 + 3	5	1	2	2
2 + 4	5	1	2	2
1 + 5	5	1	2	2
Saf Parafin	5	1	2	2
Saf Parafin	5	1	2	2

Çizelge 1'de görüldüğü gibi kesitlerin tam olarak parafine doyurulması için parçalar alkol, alkol+ksilol ve ksilol+parafin serilerinden geçirilerek mikro dalga fırının birinci çalıştırma kademesinde 1.5 dakika ile 5 dakika arasında muameleye tabi tutulmuşlardır. Mikrodalga fırınların ısıtma yöntemi gereğince su moleküllerinin birbirine sürtünmesi neticesinde oluşan yüksek ısı, özellikle örneklerin ısısının da yükselmesine ve dokulara zarar vermesine sebep olacağı için (Aşkın ve ark., 1999)

mikrodalgada tutulan ısıtma süreleri kadar dışarıda soğutma işlemi (5-8 °C)' de yapılmıştır.

Çizelge 1'de izlenen süreler doğrultusunda parafine çok kısa sürede doyurulan kesitler enine ve boyuna kesilebilecek şekilde parafin bloklara yerleştirilmiştir. Bloklar bir gün süresince buzdolabında 4°C'de bekletildikten sonra Rotary mikrotom yardımıyla 12-15 mikron kalınlığında olacak şekilde kesitler alınmıştır. Kesitler hemen sıcak su havuzuna (45-50 °C) aktararak düzgün hale gelmeleri sağlanmıştır. Buradan lamların yüzeylerine yumurta akı ve glicin karışımı sürülmüş, hemen sonra üstlerine bırakılan kesitlerin daha da gerginleşmesi için 2 saat kadar lamlar 60 °C' lik etüvde bekletilmiştir.

Etüvden alınan kesitlerin boyanmasında hemotoksilen kullanılmıştır. Çizelge 2'de hemotoksilen ile boyama safhaları ve süreleri verilmiştir.

Çizelge 2. Kesitlerin hemotoksilen ile boyanmasında uygulanan işlemler ve süreleri

Muamele	Muamele süresi (dakika)
Ksilol	15
Saf su	15
%96 lık alkol	15
%90 lık alkol	15
%80 lik alkol	15
%70 lik alkol	15
%50 lik alkol	15
%30 luk alkol	15
Çeşme suyu	15
Hemotoksilen	20
Çeşme suyu	3
Mordon	0.2
Çeşme suyu	2
%50 lik alkol	10
%70 lik alkol	10
%90 lık alkol	10
%96 lık alkol	10
Saf alkol	10
Saf Ksilol	15

Hemotoksileni hazırlamak için; 250 cc safsu + 2.5 cc asetik asit + 0.3 cc sülfürik asit + 7.5 g ferric amonyum sülfat karıştırılmış, daha sonra 1.5 g hemotoksuna 285 cc safsu ilave edilmiştir (Brooks ve Anderson, 1966). Rengin daha koyu hale getirilmesi için hemotoksilen birer dakika aralıklarla 2 defa mikro-dalga fırında ısıtılıp soğutulmuştur.

Hemotoksilenle boyama işlemi tamamlanınca kesitlerin üzerine az miktarda kanada balzamu dökülüp lamelle kapatılarak daimi preparat haline gelmeleri sağlanmıştır.

Kesitlerin incelenmesi ve fotoğrafların çekilmesi ise Olympus BH-2 marka mikroskopa yapılmıştır.

### Bulgular ve Tartışma

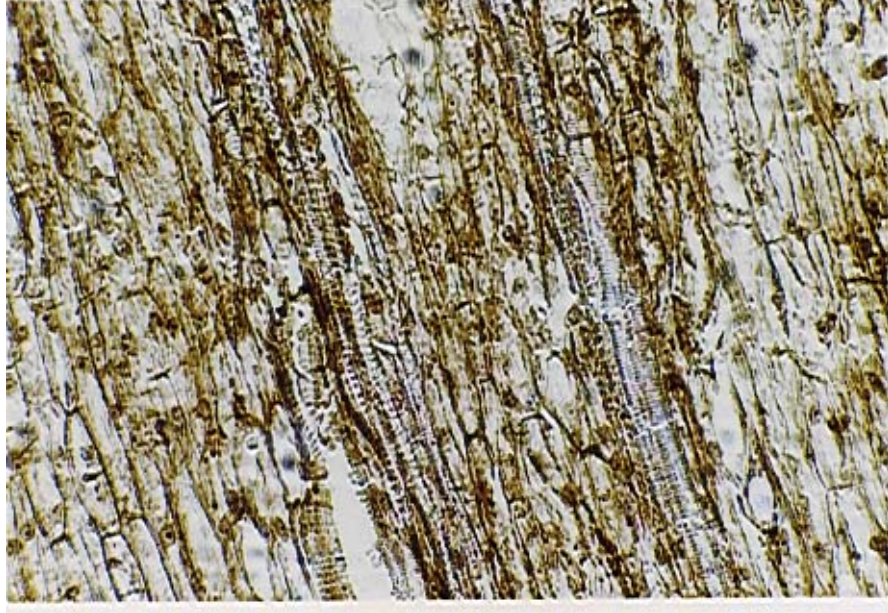
Bu araştırma neticesinde, anatomik çalışmaların kesit alınma safhasında en yaygın olarak bilinen ve kullanılan parafin yönteminin uzun zaman almasını önlemek amacıyla geliştirilen mikro-dalga yöntemi, Çizelge 1'de tarif edilen şekliyle uygulandığında, cevizlerde çimlenme sonrası genç dokular üzerine yapılan aşılardan ve genç dokulardan çok kısa sürelerde, anatomik ve histolojik incelemelere elverişli nitelikte kesitlerin alınabileceği tespit edilmiştir. Bu yöntem uyarınca parafine çok kısa sürede doyurulan ve bloklanan bitki parçalarından, Rotary mikrotom kullanılarak enine ve boyuna seri kesitler kolaylıkla alınabilmektedir. Bilindiği gibi klasik parafin yöntemine göre dokuların parafine doyurulması 2-3 ay alabilmektedir (İnce, 1989). Bu çalışma cevizlerde erken dönemlerde yapılmış olan aşıların yumuşak dokularında bile mikro-dalga fırın kullanarak hızlı parafin yöntemiyle kesit alınabilmesine imkan sağlamıştır. Parafin tekniği, kesit alma yöntemlerinden en çok kullanılanı olmakla birlikte (Aşkın, 1989; Vardar, 1987), uygulama alanı içerisinde olan mikro-dalga kullanılarak

hızlı parafin yöntemi ile sert dokularda bile bir çok başarılı sonuçların alındığı çalışmalar mevcuttur (Balta ve Aşkın, 1995; Balta ve ark., 1996). Üstelik mikrodalga fırında muamele gören materyallerin kesitlerindeki dokuların çok daha belirgin olduğu işaret edilmektedir (Balta ve Aşkın, 1995).

Kullanılan bu yöntemle, genç ceviz dokularından 1-2 gün içerisinde kesitlerin alınması mümkün olmuştur. Şekil 1'de, çimlenme sonrası genç dokular üzerine aşıların aşı bölgesinden alınmış bir enine kesit, Şekil 2'de ise çimlenmeden 8 gün sonra embriyonik kök kısmında farklılaşmakta olan primer vasküler dokular görülmektedir. Bu kesit üzerinde kallus, ksilem yeni kambiyum dokuları ile nekrotik alanlar kolaylıkla ayırt edilebilmektedir. Öte yandan fındık, ceviz, kestane, elma, kayısı, kiraz, armut türlerinin sert odun dokularından, tomurcuk ve dal explantlarından bu yöntemle kısa dönemlerde ince kesitlerin alınmasında başarılı sonuçlar verdiği bildirilmiştir (Balta ve ark., 1993; Balta ve Aşkın, 1995; Balta ve ark., 1996; Dolgun, 1995; McClelland ve ark., 1990).



Şekil 1. Genç bitkicikler üzerine yapılmış yongalı göz aşısından aşılamadan 43. gün sonra alınan enine kesitteki dokuların durumu (Hemotoksilen 4x10).



Şekil 2. Çimlenmeden 8 gün sonra Embriyonik kök kısmında farklılaşmakta olan vasküler dokular (Hemotoksilen 10x10).

Mikrotomla seri ve düzgün şekilde kesitler alınmasına parçaların büyüklükleri ile parafin bloklara yerleştirme biçimlerinin etkili olduğu, asma gibi pürüzlü ve lifli dokularda bu durumun kesit almayı zorlaştırdığı (Balta ve ark., 1996) bilgisinden hareketle; kesit alacağımız parçaların bloklanması önce, doku parçalanmalarını önlemek amacıyla, explantların 1-1.5 cm'yi geçmeyecek ebatlarda olmasına özen gösterilmiştir.

Araştırmada üzerinde durulması ve ihmal edilmemesi gereken bir diğer husus da, Çizelge 1'de de görüldüğü gibi, soğutma muameleleri teşkil etmiştir. Bu muamelelerde, örneklerin aşırı derecede ısınmalarının ve parçalanmalarının ve alkollerin fazla ısınmalarının önüne geçmek için, zorunlu olduğu belirlenmiştir. Hızlı parafin (mikro-dalga) yönteminde özellikle parafinin kaynama noktası ile yanma noktası birbirine çok yakın olması sebebiyle mikro-dalgalardaki ısıtma işlemine müteakip soğutma işlemi de çok dikkat etmek ve ısıtma sürelerini çok kısa aralıklarla fazlaca yapmak patlama tehlikesini önlemek açısından oldukça önemlidir.

Klasik parafin yönteminde uzun süre alan fiksasyon, dehidrasyon ve infiltrasyon safhalarının modifiye edilerek, cevizlerde özellikle genç bitki döneminde dokulara zarar vermeyecek şekilde, kısaltılmasına imkan veren mikro-dalga fırını yardımıyla hızlı parafin yönteminin kesit almada başarı ile uygulanabileceği ortaya konmuştur. Araştırma sonuçları, bu yöntemin tohum çimlenmesi ve müteakip gelişmeler ile ilgili çalışmalarda da kolaylıkla uygulanabileceğini göstermiştir.

#### Kaynaklar

- Aşkın, M.A., 1989. *Ege Bölgesinde Düzenli Meyve Vermeyen Bazı Kayısı Çeşitleri Üzerinde Biyolojik Araştırmalar* (Basılmamış Doktora Tezi), Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enst., İzmir.
- Aşkın, M. A., O. Dolgun ve T. Yarılgaç, 1995. Bahçe bitkileri preperasyon tekniği uygulamalarında yeni hızlı bir yöntem. *II. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi Bildiri Kitabı Cilt I (Meyve)* 282-286, Adana.
- Aşkın, M. A., E. Özeker ve O. Dolgun, 1999. Preparasyon tekniği çalışmalarında mikrodalga ışınımlardan yararlanma imkanları. *III. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi Bildiri Kitabı* 912-917, Ankara.
- Balta, F., 1993. *Fındığın Aşı ile Çoğaltılması ve Aşı Kaynaşmasının Anatomik ve Histolojik Olarak İncelenmesi Üzerine Araştırmalar* (Basılmamış Doktora Tezi). YYÜ Fen Bil. Enst., Van.
- Balta, F., T. Karadeniz, F.E. Tekintaş and S.M. Şen, 1993. Investigation on anatomical and histological development of the graft formation in Chestnut (*castanea sativa* Mill.) *Proceedings of The International Congress on Chestnut*, 231-234, Italy.
- Balta, F. ve M.A. Aşkın, 1995. Ceviz aşılarından kesit alınmasında mikro-dalga tekniğinden yararlanma imkanları. *Bahçe* 24 (1-2): 61-68.
- Balta, F., R. Cangi ve M.A. Aşkın, 1996. Asma aşılarından kesit almada mikro-dalga (mikro-wave) yönteminin uygulanma imkanları. *Yüzüncü Yıl Ün. Ziraat Fak. Dergisi*. 6(1):15-25.

- Brooks, R.M. and T.I. Anderson, 1966. *Plant microtechnique manual*. Dep. of pomology University of California.
- Dolgun, O., 1995. *Bahçe Bitkileri Preparasyon Tekniği Uygulamalarında Mikro Dalga Işınlardan Yararlanabilme İmkanları Üzerinde Araştırmalar*. Y.Y.Ünv. Fen Bil. Enst. (Basılmamış Y.Lisans Tezi), Van.
- Foster, K. R. and W.F. Pickard, 1987. Microwaves. *The risk of research nature* 330: 531-532.
- İnce, H., 1989. *Bitki Preparasyon Teknikleri*. Ege Ün. Fen Fak. Yayınları No:127
- McClelland, M.T., M.A.L. Smith and Z.B. Carothers, 1990. The effects of in vitro and ex vitro root initiation on subsequent microcutting root quality in three woody plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 23:115-123.
- Moore, R. and D.B. Walker, 1981. Studies of vegetative Compatibility-Incompatibility in Higher Plants. I. A structural study of a compatible autograft in sedum telephoides. *American Journal of Botany*, 68(6): 820-830.
- Moore, R.,1984. The role of direct cellular content in the formation of compatible autografts in sedum telephoides. *Annals of Botany* 54: 127-133.
- Tekintaş, F.E., 1988. *Cevizlerde (Juglans regia L.) Aşı kaynaşması ve Aşı ile İlgili Sorunlar Üzerinde Araştırmalar*. E.Ü.F.B.Enst.,Bahçe Bitkileri AB.D. (Yayınlanmamış Doktora Tezi), İzmir.
- Tekintaş, F.E., A. Tanrısever ve K. Mendilcioğlu, 1998. Cevizlerde Yama Aşının Anatomik ve Histolojik Yönden İncelenmesi Üzerine Araştırmalar. *Ege Ün. Ziraat Fak. Dergisi*, Cilt 25: 227-237.
- Şen, S.M., 1986. *Ceviz Yetiştiriciliği*. Eser Matbaası, 230 s., Samsun.
- Vardar, Y., 1987. *Botanikte preparasyon tekniği*. Ege Ün. Fen Fak. Kitaplar Serisi, No:1 Uygulama Kitabı, 61 s., Bornova-İzmir.
- Yarılgıç, T. ve M.A. Aşkın, 1993. Cevizlerde (Juglans regia L.) Embriyonik Bitki Dokularına Aşı Yapabilme Olanaklarının Anatomik ve Histolojik Yönden İncelenmesi Üzerine Araştırmalar. *Yüzüncü Yıl Ün. Ziraat Fak Dergisi*. 3/1-2: 263-280.
- Umar, M.H., H.U. Papuççuoğlu Ü. İnce ve S. Falakalı. 1990. Mikroelektromanyetik Dalgaların Histo elektroniğe Uygulanması. *Ege Ün. Tıp Fak. Dergisi* 28:1778-1780.