

ASMA AŞILARINDAN KESİT ALMADA MİKRO-DALGA (MİKRO-WAVE) YÖNTEMİNİN UYGULANMA İMKANLARI

Fikri BALTA⁽¹⁾

Rüstem CANGI⁽¹⁾

M Atilla AŞKIN⁽²⁾

(ARAŞTIRMA MAKALESİ)

ÖZET: Bu araştırmada, asma aşılarından kesit almada klasik parafin tekniğiyle, ülkemizde bahçe bitkilerinde yapılacak anatomik çalışmalar için oldukça yeni olan Mikro-dalga yöntemi karşılaştırılmıştır. Mikro-dalga fırında muamele gören aşı parçacıklarından, daha kısa sürede ve amaca uygun kesitler alınmıştır.

UTILIZING POSSIBILITIES THE MİKRO-WAVE METHOD IN SECTIONING THE GRAPE GRAFTS

ABSTRACT: In this study, Mikro-wave method which is a new technique in sectioning for anatomical investigations in the horticulture plants in Turkey was compared with the classic paraffin method on the grape grafts. Finally suitable sections for purpose from the graft portions treated with the Mikro-wave method were taken in shorter time than the classic technique.

GİRİŞ

Bahçe bitkileriyle ilgili olarak yürütülen anatomik çalışmalarda kesitlerin daimi preparat haline getirilmesinde en çok kullanılan ve kabul gören yöntem, parafin yöntemidir (1). Fakat bu yöntemde, incelenen materyalin parafinle doyurulmasının uzun zaman gerektirmesi (2, 3), önemli bir dezavantajdır. Ayrıca bu yöntemde, parafinle doyurma işlemleri ve doyurma süresi, materyalin yapısına bağlı olarak değişebilir.

Ülkemizde, bahçe bitkileri preparasyon tekniği uygulamalarında yeni ve hızlı bir yöntem olan Mikro-dalga (Mikro-Wave) yönteminin, preparat

(1) Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, 65080 VAN

(2) Ege Üniversitesi, Ödemiş Meslek Yüksekokulu, Ödemiş / İzmir

kahitesini bozmadan preparasyon suresini onemli olcude kisalttiğı bildirilmektedir (1, 4). Bununla birlikte, bu yontemden faydalanılarak kestane (*Castanea sativa Mill.*) aşı örneklerinden de amaca uygun, enine ve boyuna kesitlerin alındığı kaydedilmektedir (5).

Bu çalışmada, asma aşılarından kesit almada Mikro-dalga yontemini uygulayabilme imkanları araştırılmıştır.

MATERYAL VE YONTEM

Araştırma, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümüne ait kontrollü aşılama odaları ile bölüm laboratuvarında yürütülmüştür.

MATERYAL

Rupestis du Lot Amerikan asma anacı ve bunun üzerine aşılanan İskenderiye Misketi üzüm çeşidi çalışmada materyal olarak kullanılmıştır. Aşılar yapıldıktan sonra, aşı bölgelerinden kesilen küçük parçacıklara yapılan muameleler Imperial marka Mikro-dalga (Mikro-Wave) fırında yapılmış, kesitler Rotary Mikrotomla alınmış ve preparatların incelenmesi ve fotoğraf çekimi için de Olympus BH-2 fotomikroskop kullanılmıştır. Ayrıca, Mikro-dalga fırında yapılan muameleler için, çeşitli alkol ve ksilol çözeltileri ile sert doku parafini kullanılmıştır.

YONTEM

a) Aşıların yapılması ve örneklerin hazırlanması

Aşılar, omega aşı tekniğiyle yapılmış ve kontrollü aşılama şartlarına maruz bırakılmıştır. Amaca göre, aşılamadan sonra çeşitli aralıklarla aşı bölgelerinden örnekler alınmış ve Mikro-dalga uygulamasına kadar % 70'lik etil alkol veya FAA içerisinde fikse edilmiştir. Mikro-dalga uygulamasına geçmeden önce aşı örnekleri, aşı kaynaşma bölgelerini kapsayacak şekilde, ayrıca enine ve boyuna kesitler alınacak şekilde keskin jilet vardımıyla küçük parçacıklara bölünmüştür. Bu parçacıklara b, c ve d alt başlıklarında açıklanan metodlar uygulanmıştır.

b) Klasik parafin yonteminin uygulanması

Kesilen parçacıklara uygulanan işlemler Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Parafin metoduyla örneklerle sırayla uygulanan muameleler

Muamele sırası	Muameleler	Süre
1	% 70 etil alkol	5 saat
2	% 80 etil alkol	5 saat
3	% 90 etil alkol	1 saat
4	Saf etil alkol	2 saat
5	3 kısım saf alkol + 1 kısım ksilol	2 saat
6	2 kısım saf alkol + 2 kısım ksilol	2 saat
7	1 kısım saf alkol + 3 kısım ksilol	2 saat
8	Ksilol	2 saat
9	Ksilol hacminin 1/3'ü kadar sert doku parafini ilavesi	1 gün
10	Örneklerin 62-63 °C'deki Etüvde doyurulması	2 ay

c) Etüvde 1 ay bekletilen örneklerin Mikro-dalga fırında muamelesi

Yukarıda, b alt başlığında belirtilen işlemler 9. aşamaya kadar yürütülmüş ve 10. aşamada ise örnekler Etüvde sadece 1 ay doyurulmuştur. Daha sonra, parafinle doyurulan bu örneklere % 40 güç'te (4. kademe) çalıştırılan Mikro-dalga fırında 1'er dakikalık aralıklarla olmak üzere toplam 45 dakikalık muamele yapılmıştır. Ayrıca, muamele süresi kadar da soğutma uygulanmıştır.

d) Mikro-dalga (Mikro-Wave) yönteminin uygulanması

Araştırmada, klasik parafin yönteminde uygulanan işlem basamakları Mikro-dalga fırına modifiye edilerek, amaca uygun yöntem geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla öncelikle, hem materyalin dokusuna uygun olarak hem de Mikro-dalga fırında muamele sırasında çözeltilerin ısınma durumlarına uygun olarak, çeşitli muamele sayıları ve süreleri denenmiştir. Daha sonra, bu şekilde parafine doyurulan örneklerden kesit alınıp alınmadığı kontrol edilmiştir. Mikro-dalga fırını çalıştırırken, alkol serileri için % 30 güç (3. kademe), diğer seriler için ise % 40 güç (4. kademe) kullanılmıştır. Sonuç olarak, parçalanmadan kesit almaya cevap veren muamele sayıları ve süreleri tespit edilmiş ve Çizelge 2'de sunulmuştur.

Çizelge 2. Asma aşılardan kesit almada Mikro-wave yönteminin uygulanışı

İşlem Sırasına Göre Muameleler	Muamele Sayısı	Muamele Ortamı	Muamele Süresi	Soğutma Süresi
1. Alkol Serileri				
% 80'lik Etil Alkol	5	Mikro-dalga*	1.5 dak	1-2 dak.**
% 96'lık Etil Alkol	5	Mikro-dalga	1.5 dak	1-2 dak.
Saf Etil Alkol	6	Mikro-dalga	1 dak	1-2 dak.
2. Alkol ve Ksilol Serileri				
Etıl alkol (hacim)+Ksilol (hacim)				
3 + 1	10	Mikro-dalga	1 dak	1-2 dak.
2 + 2	12	Mikro-dalga	1 dak	1-2 dak.
1 + 3	15	Mikro-dalga	1 dak	1-2 dak.
Saf Ksilol	13	Mikro-dalga	1 dak	1-2 dak.
3. Ksilol ve Parafin Serileri				
Ksilol (hacim)+Parafin (hacim)				
5 + 1	10	Mikro-dalga	1 dak	1-2 dak.
5 + 2	10	Mikro-dalga	1 dak	1-2 dak
5 + 5	15	Mikro-dalga	1 dak	1-2 dak.
2 + 5	15	Mikro-dalga	1 dak	1-2 dak.
1 + 5	20	Mikro-dalga	1 dak	1-2 dak.
Parafin	25	Mikro-dalga	15 dak	1-2 dak.

(*) Mikro-dalga fırın, alkol serilerinde % 30 güç'te (3. kademe), diğer seriler için % 40 güç'te (4. kademe) çalıştırılmıştır.

(**) Alkol ve ksilol çözeltileri mikro-dalga fırında öngörülen süreyle muamele sırasında çok çabuk ısındıkları için, başlangıçtaki uygulamalar dışında her bir mikro-dalga muamelesinden sonra en az muamele süresi kadar soğutma yapılması herhangi bir tehlikeye neden olmamak için önemli ve zorunludur.

Çizelge 2'de görüldüğü gibi aşı bölgelerinden elde edilen parçacıklar, Mikro-dalga fırında sırasıyla çeşitli alkol, alkol-ksilol ve ksilol-parafin serilerinden geçirilmiştir. Muameleler esnasında, örnek kapları ve sıvıları çok çabuk ısındıkları için, muamelelerden sonra en az muamele süresi kadar

soğutma yapılması, herhangi bir tehlikeli duruma neden olmamak için önemli ve zorunlu görülmüştür.

e) Örneklerin parafin bloklara yerleştirilmesi ve kesitlerin alınması

Üç farklı yöntemle muamele gören ve sonuçta parafine doyurulan aşı örnekleri, enine ve boyuna kesitler alınacak biçimde parafin bloklara gömülmüştür. Daha sonra bu bloklar, rotary mikrotoma yerleştirilerek enine ve boyuna kesitler alınmıştır. Ardından kesitler, yaklaşık 45 °C'lik sıcak su banyosunda açılmışlardır.

f) Kesitlerin boyanması

Dokuların boyanmasında Çizelge 3'de gösterilen işlem aşamaları takip edilmiştir.

Çizelge 3. Kesitlerin safraninle boyanmasında takip edilen işlem basamakları

İşlem Basamağı	Muameleler	Süre
1	3 kısım ksilol + 1 kısım saf etil alkol	8 dak
2	2 kısım ksilol + 2 kısım saf etil alkol	8 dak
3	1 kısım ksilol + 3 kısım saf etil alkol	8 dak
4	Saf etil alkol	1 dak
5	% 90 etil alkol	4 dak
6	% 80 etil alkol	4 dak
7	% 70 etil alkol	4 dak
8	% 1'lik safranin	30 dak
9	Çeşme suyunda yıkama	1-2 dak
10	% 0.5'lik pikrik asit	1-2 dak
11	Birkaç damla amonyak damlatılmış % 96'lık etil alkol	1-2 dak
12	% 96'lık etil alkol	10 sn
13	1 kısım ksilol + 1 kısım saf etil alkol	15-20 sn
14	Birkaç damla ksilol damlatılmış saf etil alkol	2-3 sn
15	Ksilol'e alma ve Kanada balzamu ile kapama.	

g) Kesitlerin incelenmesi

Kesitlerin incelenmesinde ve fotoğraf çekiminde, Olympus BH-2 marka fotomikroskop kullanılmıştır.

BULGULAR

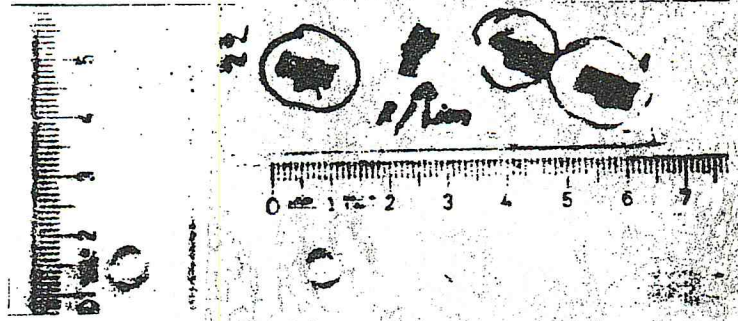
Klasik parafin yöntemi modifiye edilmesi sonucu, asma aşıları için geliştirilen ve Çizelge 2' deki işlem basamakları açıklanan Mikro-dalga yönteminin uygulanmasıyla, rotary mikrotomla 10-14 mikron arasında değişen enine ve boyuna kesitlerin alınması mümkün olmuştur. Ancak, klasik parafin yöntemiyle etüvde 2 ay bekletilen örneklerden alınan kesitler parçalanmış ve incelenmeye uygun bulunmamışlardır. Bunun yanında, klasik parafin yöntemiyle etüvde 1 ay bekletilen ve ardından Mikro-dalga fırında 45 dakika mikrodalga ışınlarına maruz bırakılan örneklerden ise, amaca uygun boyuna kesitler (12-18 mikron) alınabilmiş, fakat enine kesitlerde parçalanmalar gözlenmiştir.

Diğer yandan, sadece Mikro-dalga yöntemiyle doyurulan tüm parçacıklardan, aynı serilikte kesitler alınamamış ve zaman zaman kesitlerde parçalanmalar görülmüştür. Başka bir deyişle, bahsedilen yöntemi uygulamak suretiyle, mikrotomla seri şeritler halinde kesitler alınmasını, parçacıkların büyüklükleri ile bloklara enine ve boyuna yerleştirilme şekli etkilemiştir. Nitekim boyuna kesitler, enine kesitlere göre daha kolay ve daha seri bir şekilde alınabilmiştir. Ancak genel olarak, nadiren doku parçalanmaları gözlenmekle birlikte, aşı örneklerinden bozulma ve parçalanma olmadan amaca uygun kalitede ve yeterli sayıda homojen kesitler alınabilmiştir.

Mikro-dalga fırında aşı parçacıklarına uygulanan muameleler sırasında, dikkat edilmesi gereken ve çalışmada da üzerinde titizlikle durulan en önemli husus, hem örneklerin aşırı derecede ısınmalarına, parçalanıp bozulmalarına sebebiyet vermemek hem de herhangi bir tehlikeli duruma meydan vermemek için, uygun muamele sürelerinin tespiti olmuştur. Özellikle alkol ve ksilol çözeltilerinin kısa süre içerisinde çabucak ısınabildikleri gözlenmiştir. Sonuç olarak, uygun muamele süreleri saptanmıştır.

Şekil 1'de hazırlanan daimi aşı preparatlarındaki kesit büyüklükleri gösterilmiştir. Görüldüğü gibi, boyu 10 mm'yi aşan ve gerek kesit alma gerekse boyama aşamasında herhangi bir şekilde parçalanma göstermeden boyuna kesitler, bu yöntemle kolaylıkla elde edilebilmiştir. Alınan kesitlerin % 1'lik safraninle boyanmasıyla, aşı kaynaşmasının anatomik yapısı ve gelişimi kolaylıkla mikroskop altında incelenmiştir. Hatta ince kesitlerde, gerek aşı kaynaşma bölgesinde oluşan yeni dokular (Şekil 2 ve 3) gerekse kesitler

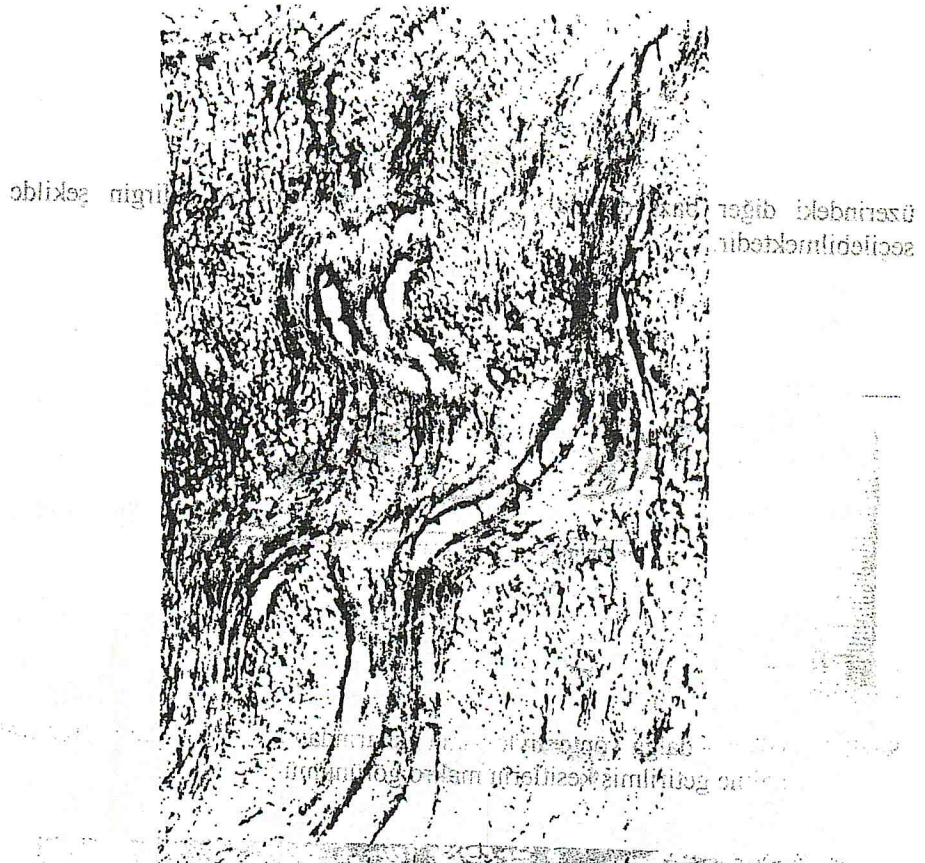
üzerindeki diğer bazı dokuların detayları (Şekil 4) çok belirgin şekilde seçilebilmektedir.



Şekil 1. Mikro - dalga yöntemiyle asma aşılardan alınan ve daimi preparat haline getirilmiş kesitlerin makro görünümü



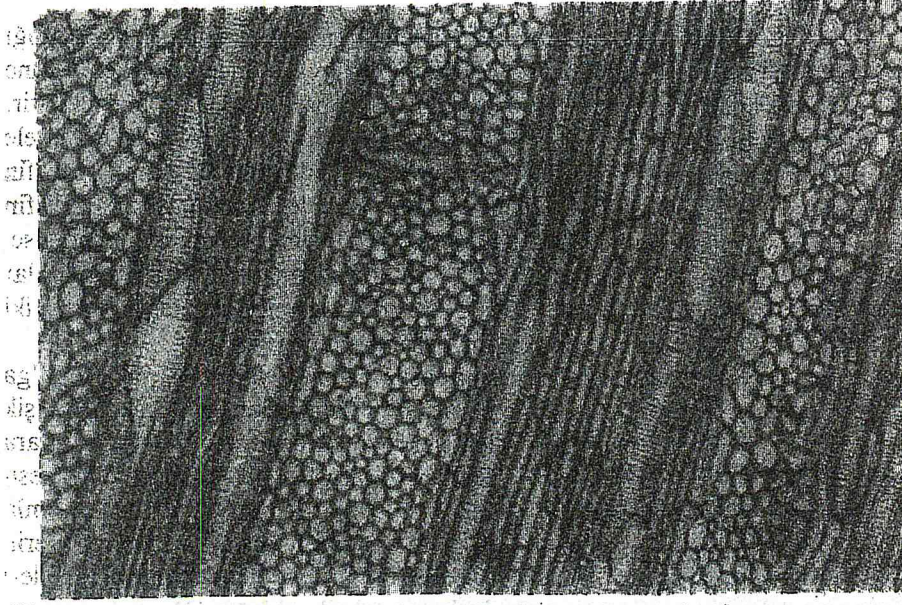
Şekil 2. Rupestris du Lot / İskenderiye Misketi aşı kombinasyonunda, aşı elemanlarının birleşme kısmından alınmış boyuna kesitte, aşı bölgesinde 22 gün sonra yeni dokuların durumu (Safranin, 4x10)



Şekil 3. Rupestris du Lot / İskenderiye Misketi aşı kombinasyonunda, boyuna kesitte aşı bölgesinde 22 gün sonraki kambiyal ve vasküler ilişki (Safranin, 4x10)

Şekil 2 ve 3 de, omega aşı ile aşılanan örneklerde, Rupestris du Lot/ İskenderiye Misketi aşı kombinasyonunda aşı elemanlarının boyuna birleşme bölgelerinden aşılamadan 22 gün sonra alınmış boyuna kesitte, aşı bölgesinde mevcut olan kallus dokusu ile gelişmekte olan yeni vasküler dokular görülmektedir.

Şekil 4'de ise, aynı boyuna kesidin farklı bir bölgesinden ksilem dokusu belirgin şekilde ayırdedilebilmektedir. Hatta kesit üzerinde, aşmanın ksilem dokusu içerisinde yer alan noktalı borular gibi ksilem elemanları net bir şekilde incelenebilmektedir.



Şekil 4. Rupestris du Lot / Iskenderiye Misketi aşı kombinasyonunda, Şekil 2'ye ait boyuna kesitten fotoğraflanan orjinal ksilem doku elemanları (Safranin, 10x10)

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bağcılıkta ve meyvecilikte aşılama çalışmalarında, kaynaşmanın anatomik ve histolojik yönden kolaylıkla incelenebilmesi ve dokuların belirgin bir biçimde ayırdedilebilmesi, ancak amaca uygun aşı kesitlerinin alınmasıyla mümkün olmaktadır. Bununla birlikte, bazı türlerde aşı yapılacak dokuların sert olmaları, bazan ince kesit alınabilmesini oldukça güçleştirebilmektedir. Ancak bu tip çalışmalarda, çeşitli dezavantajları olmakla birlikte, en çok rağbet gören teknik parafin tekniğidir (2, 6). Nitekim bu teknik, bahçe bitkileriyle ilgili gerek aşılama çalışmalarında kesit almada (7), gerekse çeşitli çalışmalarda (8; 9) günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bilhassa ince kesitlerin alınabilmesine imkan tanıyan bu teknikle (6), kesitler üzerindeki dokuların ayırdedebilmesi ve kesitlerin yorumlanabilmesi kolaylıkla mümkün olmaktadır. Ne var ki, bu teknikle özellikle sert dokuların parafinle doyurulabilmesi uzun zaman alabilmektedir (2, 3). Nitekim fındık aşılarında, parafin içerisindeki aşı parçacıklarının etüvde 2-3 bekletilmesiyle ancak

amaca uygun olan 12-20 mikron kalınlığında kesitlerin alınabildiği bildirilmektedir (3).

Araştırmada, Mikro-dalga yönteminin tek başına uygulandığı örneklerde, boyuna kesitler tüm örneklerde kolay ve ince alınırken, enine kesitlerin alınmasında bazı örneklerde dağılma ve parçalanmalar gözlenmiştir. Bu, aşmanın biraz pürüzlü ve lifli yapısından ileri gelebilir. Ancak, muamele sayılarının artırılması, belki bu durumu önleyebilir. Oysa, klasik parafin yönteminin uygulanmasıyla incelemeye uygun kesitler alınamamıştır. Parafin yöntemine ilaveten uygulanan 45 dakikalık mikrodalga ışın muamelesinde ise, ancak boyuna kesitler alınabilmiş (12-18 mikron), enine kesitlerde dağılmalar görülmüştür. Dolayısıyla tek başına Mikro-dalga uygulaması, diğer iki uygulamadan daha kısa sürede ve daha başarılı sonuç vermiştir.

Öte yandan, çalışmada asma aşaları için uygulanan Mikro-dalga yöntemi, meyve türleriyle ilgili gerek aşılama çalışmalarına, gerekse değişik amaçlı ve dokularda detaylı incelemeler gerektiren anatomik çalışmalara uyarlanabilir. Nitekim, kestane (*Castanea sativa* Mill.) aşılardan kesit almada esas olarak bu yöntemin uygulandığı ve aşılardan rotary mikrotomla 12-20 mikron kalınlığında alınan kesitler üzerinde anatomik incelemelerin yapıldığı bildirilmektedir (5). Bununla beraber, bu yöntemin bahçe bitkileri preparasyon tekniği uygulamalarında hızlı bir teknik olduğu (1) ve kayısı, kiraz, elma, armut gibi türlerin tomurcuk ve dal eksplantlarından kısa sürede ince kesitlerin alınmasında başarılı sonuçlar verdiği kaydedilmektedir (1, 4).

Sonuç olarak, Mikro-dalga (Mikro-Wave) yöntemi, aşılama ile ilgili çeşitli anatomik çalışmalarda, klasik parafin yöntemine bir alternatif olabilir. Çünkü, bu yöntemde mikrodalga ışınlar, örneklerle uygulanan fiksasyon, dehidrasyon ve infiltrasyon safhalarını kısaltmakta ve parafinin daha kısa sürede dokulara nüfuz etmesine imkan tanımaktadır (1). Böylece, aşılama çalışmalarında klasik parafin tekniğine göre daha çabuk sonuç ulaştırılmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Aşkın, M. A., O. Dolgun ve T. Yarılgaç., 1995. Bahçe Bitkileri Preparasyon Tekniği Uygulamalarında Yeni Hızlı Bir Yöntem. II. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, Cilt I (Meyve):282-286. 3-6 Ekim, Adana
2. Aşkın, M.A., 1989. Ege Bölgesinde Düzenli Meyve Vermeyen Bazı Kayısı Çeşitleri Üzerinde Biyolojik Araştırmalar. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü (Basılmamış Doktora Tezi), İzmir

3. Balta, F., 1993. Fındığın Aşı İle Çoğaltılması ve Aşı Kaynaşmasının Anatomik ve Histolojik Olarak İncelenmesi Üzerine Araştırmalar. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü (Basılmamış Doktora Tezi), Van.
4. Dolgun, O., 1995. Bahçe Bitkileri Preparasyon Tekniği Uygulamalarında Mikro Dalga Işınlardan Yararlanabilme İmkanları Üzerinde Araştırmalar. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü (Basılmamış Yüksek Lisans Tezi), Van
5. Balta, F., 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, October 20-23, Spoleto, Italy, 231-234.
6. Vardar, Y, 1987. Botanikte Preparasyon Tekniği. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi, No:1, Uygulama Kitabı, 61s, Bornova-İzmir,
7. 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.
8. Korkmaz, Y. ve R. Gülcan, 1992. Bazı Meyve Türlerinde Tohum Taslağı ve Embriyo Kesesi Gelişimi. Türkiye 1. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, Cilt I (Meyve): 475-478, 13-16 Ekim, Bornova-İzmir.
9. Cirik, M.N. ve R. Günçan, 1992. Farklı İki Ekolojide Bazı Zeytin Çeşitlerinin Çiçek Tomurcuğu Gelişimi. Türkiye 1. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, Cilt I (Meyve): 175-178, 13-16 Ekim, Bornova-İzmir.