

## BITKİ DOKULARINDA MİKOPLAZMA BENZERİ ORGANİZMA (MLO)'LAR İÇİN ÖZELLEŞTİRİLMİŞ ELEKTRON MİKROSKOP TEKNİĞİ

Serap AÇIKGÖZ (1)

**ÖZET :** *Mikoplazmalar (Mollicutes), çabuk deforma olmaları ve belirli bir şekillerinin olmayışı nedeniyle tanımlanmalarında fazla büyümeli elektron mikroskoba ihtiyaç vardır. En faydalı ve kullanışlı model transmission elektron mikroskop (TEM)'dur ve görülmek istenen yapıya bağlı olarak örneklerin hazırlanış şekli değişir. Mikoplazmalar bitkilerin floem iletim demetlerinde bulunduğu için sağlıklı floem dokularını incelemek için uygulanan elektron mikroskop tekniği ile mikoplazma benzeri organizma (MLO)'lar tarafından enfekteli bitkiler için kullanılan TEM tekniği benzerdir. Anlatılan işlem farklı türlerden alınan değişik bitki parçalarında MLO çalışmaları için başarıyla kullanılan örneklerden birisidir.*

### GİRİŞ

Bitkilerde hastalık yapan MLO'lar 100-1000 nm arasında değişen boyutlara sahip olup (Van der Want, 1972), hayat devreleri süresince şekil, boyut ve iç yapıları açısından değişim gösterirler (Sinha ve Palwal, 1969). Bu küçük mikroorganizmaların ultrastruktural özellikleri ancak elektron mikroskop ile incelenebilir. Ancak hücre duvarına sahip olmayan MLO'ların elektron mikroskopisi için fiksasyon ve boyama işlemleri sırasında dağılmaları, karışmaları veya uzayarak bozulmaları mümkündür (Maramorosch ve ark. 1970). Bu gibi etkileri en aza indirmek için özelleştirilmiş transmission elektron mikroskop tekniği (TEM) kullanılmaktadır.

### Bitki Örneklerinin Seçilmesi

MLO'lar genellikle bitkilerin iletim demetlerinde bulunurlar ve çoğu floemle sınırlanmıştır (Hull, 1972). Floem içeren herhangi bir bitki parçasının (gövde, yaprak, kök) MLO ihtiva etmesi olasıdır. Bazı bitkilerde MLO'lar baştanbaşa tüm bitkide nisbeten eşit

---

(1) Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Erzurum.

olarak yayılmış olmasına rağmen bazılarında belirli noktalarda lokalize olmuşlardır. MLO'ları inceleyebilmek için öncelikle uygun dokuların seçilmesi gerekir. Örneğin öldüğü sarılık hastalığı ile enfekteli palmyelerde MLO'ların sadece olgunlaşmamış yaprak sapı temelinde yoğun olarak bulunduğu bildirilmiştir (Thomas, 1979). Şayet örnek alınacak doku sınırlı değilse odunsu dokulardan daha kolay fikse edilebilen ve daha iyi gömülebilen genç özsu dokular tercih edilmelidir.

Belirli bir türde MLO'ların bulunduğu doku daha önce saptanmamış ise, bu türün bitkilerinin farklı kısımlarından örnekler alınarak incelenmelidir. Herşeyden önce zaman ve emek tasarrufu sağlamak için cadı süpürgesi ve sarılık gibi belirtilerin sadece MLO'lar tarafından oluşturulmadığı dikkate alınarak, diğer fungus, kene ve herbisit zararı anormallikleri gibi muhtemel nedenler elemine edilmelidir.

### **Tarladan Örneklerin Toplanması, Taşınması ve Fiksasyonu**

Hayvan dokuları ile karşılaştırıldığında bitki dokularında ultrastruktural değişmelerin çok hızlı olduğu görülür. Bunun başlıca nedeni su kaybıdır. Bu nedenle yaprak, gövde ve köklerin parçaları bitkiden koparıldıktan sonra hemen fikse edilmelidir. Çünkü bitkinin intrasellüler boşlukları hava ile dolabilir. Bu içteki havayı ve basıncı azaltmak için doku kısa bir süre fiksatif solusyonu içinde yüzdürülür (Glauert, 1975).

Tarladan örnek toplandıktan hemen sonra işlemlerin yapılacağı laboratuara getirilip fikse edilecekse, bu arada oluşabilecek ultrastruktural değişmeleri en aza indirmek için bitkiden büyük bir kısım kesilmeli ve mümkün olduğu kadar soğukta saklanmalıdır.

Tarladan örnekler toplanır toplanmaz fiksasyon yapıp daha sonra işlemlerin yapılacağı farklı bir laboratuara götürülebilir. Bunun için örnekler 5 mm x 5 mm x 1 cm boyutlarında kesilir ve ilk fiksasyon için aldehit buffera atılır. Fiksasyon +40C de 12-18 saat, oda sıcaklığında (20oC) 3-4 saat sürer. Örnekler postalanacaksa veya uzakta bir laboratuara götürülecekse +40C de 0.1 M buffer içinde tutulmalıdır. Örnekler laboratuara ulaştığı zaman taze aldehit fiksatifinde tüm gece refikse edilir.

1 mm<sup>3</sup> doku bloğu için 1-3 ml fiksasyon solusyonu yeterlidir. İlk fiksasyon solusyonu genellikle 0.02-0.1 M bufferda (pH:7) % 2-6 glutraldehit ihtiva etmelidir. Fiksasyonlara oda sıcaklığında başlanır ve 1-3 saat sürer. Odunsu dokular için bu süre 24 saatten fazla olmalıdır. Fikse edildikten sonra bloklar +40C'ye alınır. İlk fiksasyondan sonra bloklar her obje başına 2-3 ml buffer solusyonunda 4 kez yıkanır (Robbinson ve ark. 1987).

Bazı örneklerle yapılan çalışmalarda fiksatiflerde ve uygulama yöntemlerinde bazı farklılıklar vardır. Robinson ve ark., (1987) sitoplazmik detayları koruyabilmek için aldehit fiksatiflerinde değişiklik yapmışlar ve ilk fiksasyonda potas veya cacodylate bufferde % 2-6 gluteraldehit tavsiiye etmişlerdir. Norris ve McCoy (1983) MLO'ları incelerken maksimum penetrasyon için collidine buffer önermişlerdir. Ayrıca cacodylate buffer kullanıldığı taktirde fiksatife 1-3 M CaCl<sub>2</sub> ilave edilmesi ve osmotik basıncı ayarlamak için ise tuz veya sakkaroz ilave edilmesi gerektiğini bildirmişlerdir.

Son fiksasyonda osmium tetroksit kullanılır ve ilk fiksasyonda kullanılan buffer ile devam edilir. Aldehit ve osmium tetroksit fiksasyonlarının her ikisinde süreleri oda sıcaklığı ve soğukta yapılmasına göre değişir. Örneğin oda sıcaklığında gluteraldehit ile 1,5-4 saat, osmium tetroksit ile 1-2 saat fiksasyon yapılır. Her araştırmacı fiksasyon süresi ve sıcaklığını kendi yöntemine göre farklı önermektedir.

### **İşlemler**

1. MLO enfekteli bitki metaryali temin edilir. Bu bitkiden büyük bir parça veya bitki küçük ise tamamı alınır.

2. Küçük cam bir kaptaki biraz parafin eritilir ve cam kabın dibinde ince bir tabaka oluşması için soğutulur. Bu parafin yüzey bitki dokusunu kesmeyi kolaylaştıracak ve bıçağın keskinliğini devam ettirecektir.

3. Doku 1 cm<sup>3</sup>'lük kısımlar halinde kesilir ve hemen cam kap içindeki aldehit fiksatifine daldırılır.

4. Kesmek için keskin bıçak kullanılır ve herbir kesitin dış yüzeyinin tahminen 1 mm'si kesip atılır. Örnekler müteakip diğer tüm kesitler tamamlanmaya kadar tamamıyla fiksatife daldırılıp bekletilir. Tüm örneklerin son boyutları aşağı yukarı 1x1x0.5 mm olmalıdır. Örnekler gömüldükten sonra doku istikametleri fark edilebilsin diye floem yönüne dik olan kısım uzun hazırlanır.

5. Örnekleri 1-2 ml aldehit fiksatifi içeren cam test tüplerine aktarırken odundan yapılmış çubuk kullanılır. Son fiksatifin hacmi örneklerin hacminden en az beş kez fazla olmalıdır. Bütün birbirini izleyen solusyon değişimleri aynı tüp içinde, pipet ile eski solusyon alınıp, yenisi ilave edilerek yapılır. Tüplerin üzeri, solusyon değişimi yapıldığı zaman hariç mantar ile kapalı tutulur.

6. Aldehit fiksatifi içindeki örnekler buzdolabında dondurulmadan, bütün gece (20 saatten fazla) bırakılır.

7. Şayet örnekler fiksatifte batmamışlarsa, tüplerden tüp mantarları çıkarılarak hafif bir vakum uygulanmalıdır. Yüksek basıncı (vakum) uygulanmamalıdır.

8. İlk aldehit fiksasyonundan sonra aşağıdaki program takip edilmelidir (Norris ve McCoy, 1983).

Solusyon	Zaman	Sıcaklık
0.1 M s-collidine buffer ile 4 kez yıkanır	Herbiri 15'er dk.	+4oC (Buzdolabı sıcak.)
Bufferda % 2'lik osmium tetroksit ile boyanır	5-6 saat	+4oC
0.1 m buffer ile yıkanır	30 dakika	+4oC
Saf su ile 2 kez yıkanır	Herbiri 30'ar dk.	+4oC
% 0.5'lik Urany asetat ile boyanır	Tüngerce	+4oC
Saf su ile 4 kez yıkanır	Herbiri 15'er dk.	+4oC
% 25, 50,75,95,100 ethanolda dehidre edilir.	Herbiri 10'ar dk.	+4oC
% 100 acetonda dehidre edilir	15 dakika	20oC (Oda sıcaklığı)
% 100 acetonda dehidre edilir.	30 dakika	20oC

İnfiltrasyon işlemi: Atılabilir plastik kaptaki Spurr' resin hazırlanır. Diğer bir kaptaki resin-aceten karışımı hazırlanır ve cam tüplere örnekler ilave edilmeden önce karıştırılır.

% 25 resin/% 75 aseton karışımı 2-3 saat 20oC

% 50 resin/% 50 aseton karışımı 2-3 saat 20oC

% 75 resin/% 25 aseton karışımı Bütün gece 20oC

% 100 resin (2-4 ken) aseton karışımı Herbiri 12 saat 20oC

Kuru gömme fırında % 100 resine örneklerle taşınır. 70 oC'de 18-24 saat polimerize edilir. Gerekliyse bir basınç fırını kullanılır (10-15 Lb/in<sup>2</sup>). Bloklar 3 günden fazla fırında bırakılır.

### **Kesitlerin Alınması**

1. Ultramikratom için örnekler uygun tutucular üzerine konur. Daha fazla floem hücrelerini inceleyebilmek için dokular enine kesilmelidir.
2. Örnekler 1 ile 4 gm kalınlığında ultramikratomda kesilir ve kesitler cam mikroskop lamında, faz kontrastta direk olarak veya iletim demetlerini ayırt edebilmek için % 1'lik toluidine mavi ile boyadıktan sonra incelenir.
3. Maksimum floem elde edecek şekilde örnekler ayarlanır ve kesilir.
4. İncelenecek örnekte MLO'ların var olup olmadığı araştırılacaksa materyalden 0.5 x1 mm kesit alınır. MLO'ların membran yapısı incelenecekse ultrathın kesitler gereklidir.
5. 100 mesh'lik formvar kaplı gridlerde örnekler toplanır.
6. % 0.5'lik urany asetat ile 15 dakika ve kurşun sitrat ile 5 dakika boyanır. Her boyamadan sonra yıkanır.
7. Kesitler elektron mikroskopta incelenir.

### **Tartışma**

Örnek alınan kısımlarda floem hücreler toplam alanın sadece çok küçük bir kısmını oluşturur. Özellikle MLO'ların popülasyonu düşük ise alınacak kesitlerde floem demetlerinin çok sayıda olması için uygun blok yüzleri incelenmelidir. 1000 mesh'lik gridler her iletim demetinin görülme şansını artırır. Formvar bu gridlerde kesitleri desteklemek için gereklidir;

MLO'lar tipik boyutları, ipliksi, elips, küresel gibi düzensiz yapıları ve hücre duvarlarının yokluğu gibi özellikleriyle, düşük büyütmede kolayca iletim demetleri boşluklarından ayrılabilir (Borges, 1972). Membran, ribozom ve DNA sarmallarını incelemek için ise daha yüksek büyütme kullanılmalıdır. İletim demetleri içerisinde MLO'ların ipliksi yapılarının 3 boyutlu formlarını ayırt etmek için ince seri kesitlerin alınması gerekmektedir (Waters ve Hunt, 1980).

MLO'lar genellikle yeni olgunlaşmaya başlamış ve olgunlaşmamış floemde bulunur. Bu floemler görünüş olarak MLO'lara benzeyen dejenere olmuş mitokondria ve boşluklar ihtiva eder. Böyle iletim demetleri parankimatik hücre olarak yanlış yorumlanabilir. Genç iletim demetlerinde veya parankimadaki boşluklar da ribozom veya ipliksi materyal ihtiva edebilir. Fakat onlar boyutları, DNA sarmallarının olmayışı ve ribozomların lokalize oluşu ile MLO'lardan ayrılabilir. Konukçu bitki orijinli ribozomlar

MLO ribozomlarından daha geniş ve pürüzlü, endoplazmik retikulum etrafındaki boşlukların iç yüzeyinde sıralanmıştır. MLO'lar üç membranlı yapıları ile dejenere mitokondrilerden ve keselerden ayırt edilebilirler.

#### KAYNAKLAR

- Borges, M. de Lourdes V. 1972. Mycoplasma and potato diseases. *Potato Res.* 15: 187-199.
- Glauert, A.M., 1975. Fixation, dehydration and embedding of biological specimens. Elsevier Nort Holland, Amsterdam, pp 1-207.
- Hull, R., 1972. Mycoplasma and Plant Diseases *Pans* 18 (2): 154-161.
- Maramorosch, K., R.R. Granados, H.Hirumi., 1970. Mycoplasma disease of plants and insects. *Adv. Virus Res.* 16: 135-193.
- Norris, R.C. and R.E. McCoy 1983. Specialised Electron Microscopic Techniques for Mycoplasma-like Organisms In Plant Tissue. Ed S. Rozin and J.G. Tully; *Methods in Mycoplasmaology.* Academic Press, Vol: 1. 63-69.
- Robinson, G.G., U. Ehlers., R. Herken., B. Herrmann, F.Mayer, F.W Schurmanr, 1987. *Methods of Preparation for Electron Microscopy.* Spinger-Verlag Berlin Heidelber, pp 1-190.
- Sinha, R.C., and Y.C. Paliwal 1969. Localization of a Mycoplasma-like Organism in Tissues of a Leafhopper Vector Phyllody Agent. *Virology* 40, 665-672.
- Thomas, D.L., 1986. Mycoplasma-like bodies associated With lethal dechines of palms in Florida. *Phytopathology* 69, 928-934.
- Van der Want J.P.H., 1972. Introduction to Plant Virology Ed J.A. de Box., *Viruses of potatoes and seed potato production.* Centre for Agricultural publishine. and Documentation Nagenningen Holand. 19-25.
- Waters, H., and P. Hunt, 1980. The in vivo three dimensional form of a plant mycoplasma-like organism by the analysis of serial ultrathin sections. *J. Gen. Microbiol.* 116, 111-131.