

Araştırma Makalesi

## Odun Çeliklerinin Mikroskopik İnceleme ve Görüntülenmesinde Farklı Boyama Tekniklerinin Kullanımı Üzerine Araştırmalar

Hakan Engin<sup>1\*</sup> 

Fatih Cem Kuzucu<sup>1</sup> 

Zeliha Gökbayrak<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, 17100/Çanakkale.

\* Sorumlu yazar: hakanengin@comu.edu.tr

### Öz

Farklı boya maddeleri çeşitli hücre tipleri ve bileşenleriyle tepkimeye girerek kendilerine özgü renk özelliklerini ortaya çıkarırlar. Asma kesitlerinde doğal renk farklılıkları birbirine oldukça yakındır. Bundan dolayı asmalarda kök oluşumunun ve dal dokularında yüzey ve iç özellikleri göstermek için konsantrasyonu arttırmanın en iyi yolu boyamadır. Bu nedenle asma çeliklerinden kök teşekkülünde hücre ve doku düzeyleri üzerine ayırt edici bilgilerin sağlanması ve doğru tanımlamaların ortaya konulabilmesi amacıyla, bu çalışma kapsamında farklı boyama maddeleri ve bunların karışımları incelenmiştir. Çalışma kapsamında asma kesitlerine yapılan boyama uygulamaları Toluidine blue O, Aniline blue, Safranin O, Bromophenol blue, Methyl green, Basic fuchsin, Giemsa stain, Fast green FCF ve Carmin'dir. Bu uygulamalardan Toluidine blue O, Safranin O, Bromophenol blue, Fast green FCF ve Aniline blue boyamaları hücre ve doku düzeyleri üzerine etkili sonuçlar ortaya koymuştur. Ayrıca incelenen çift boyama yöntemlerinden Safranin O + Bromophenol blue ve Bromophenol blue + Fast green FCF'den başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Her iki çift boyama yönteminin de asmalarda gövde ve kök kesitlerinin mikroskop altında incelenmesinde kullanılmasının uygun olduğu ve gelecekte yapılacak çalışmalarda kullanımının tavsiye edilebileceği kanaatine varılmıştır. Ayrıca boyanan kesitlerin yüzeyindeki renklemelerin ve keskinliğin mikroskop altında görüntüleme ve fotoğraflamasının iyileştirilmesi için tarafımızdan 'halka ışık' yöntemi geliştirilmiştir. Halka ışık, numunenin tamamı üzerine beyaz ışık, sarı ışık ve her iki ışık yoğunluğunu farklı oranlarda kullanarak aydınlatma olanağı sunmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Kesit, asma, boyama, doku, gövde, kök

### Research on the Use of Different Staining Techniques in Microscopic Examination and Imaging of Wood Cuttings

#### Abstract

Different stains react with various cell types and cell constituents and reveal their unique color properties. Natural color differences in grapevine sections are very close to each other. Therefore, staining is the best way to increase the contrast of grapevine root formation and cane tissues to show surface and internal features. For this purpose, different stains and their different mixtures were studied in order to provide a clear definition by providing distinctive information on cell and tissue levels in grapevine cuttings. Stains applied to grapevine sections are Toluidine blue O, Aniline blue, Safranin O, Bromophenol blue, Methyl green, Basic fuchsin, Giemsa stain, Fast green FCF and Carmin. Among these applications, Toluidine blue O, Safranin O, Bromophenol blue, Fast green FCF and Aniline blue stains showed effective results on cell and tissue levels. In addition, successful results were obtained from the double staining methods used in Safranin O + Bromophenol blue and Bromophenol blue + Fast green FCF. Both double staining methods are recommended for examining grapevine cane and root sections under a microscope. Ring light has been developed by us to improve the coloration and sharpness on the surface of the stained sections under the microscope and their photography. The ring light offers the opportunity to illuminate the entire sample by using white light, yellow light and both light intensities in different proportions.

**Keywords:** Sections, grapevine, stains, tissue, stem, root

## Giriş

Anatomik ve morfolojik çalışmalar, organizmaların biyolojilerinin belirlenmesinde ve bunların oluşum mekanizmaları hakkında önemli bilgiler sağlamıştır. Günümüzde farklı bitki türlerinde gövde dokularının mikroskobik ve anatomik özelliklerini incelemek için geliştirilmiş birçok teknik kullanılmaktadır. Geliştirilen tekniklerin bazılarının geçmişi çok eski tarihlere dayanmaktadır (Gartner ve Heinrich, 2010). Bitki kök ve gövdelerinin hücrel ve dokusal şekillenmesine ilişkin bilgilerimizi geliştiren ve hücrel ve biyokimyasal süreçlere yeni bir bakış açısı sağlayan teknikler halen geliştirilmeye devam etmektedir (Engin ve Gökbayrak, 2023). Boyama yöntemlerine ait teknikler önceleri ahşap malzemeleri korumak için kullanılmıştır. Sonrasında araştırmacılar bu teknikleri bitki anatomisi hakkında bilgi sahibi olmak için kullanmaya başlamışlardır. Boyama tekniği, 1877 yılında Ehrlich tarafından safraninin kullanılmasıyla başlamış ve bitki dokularının tanımlanmasında boyama yöntemlerinin kullanılabilmesi ifade edilmiştir (Smith, 1915; Bracegirdle, 1986).

Boyama mekanizmaları ve yöntemleri üzerine birçok araştırma yapılmıştır (Berlyn ve Miksche, 1976; Horobin, 1982; Gahan, 1984; Schweingruber, 1990; Ruzin, 1999; Horobin ve Kiernan, 2002). Bitkilerin kök ve gövde dokularının çoğunluğunda doğal renk farklılıkları çok azdır. Bundan dolayı bu tip dokuların yüzey ve iç özelliklerini göstermek için çok az konsantrasyon mevcuttur. Bu şekilde bir numunenin az konsantrasyonunu arttırmanın en iyi yolu boyamadır. Ayrıca bitki türüne ve incelenecek dokulara uygun boyama yöntemlerinin seçimi ile hücre ve doku düzeyleri üzerine ayırt edici bilgiler sağlayarak net bir tanımlama ortaya konulabilir. Araştırmacıların çalışılan materyale ait uygun boyama tekniğini uygulamadan önce mekanizmasını net bir şekilde anlaması gerekir. Ayrıca örnekler hazırlanırken kullanılan alet ve kimyasal maddeler, sert odun dokusunun yumuşatılması ve sabitlemesi için kullanılan yöntemler, ince kesitlerde temizleme ve kurutma boyama sonucunu etkileyebilir (Arık ve Altındışli, 2020).

Günümüzde mikroskop altında örneklerin incelenmesini sağlayan yöntemlere ek olarak yeni yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Çünkü dokular arasındaki doğal renk farklılıklarının çok az olduğu sert ve odunsu yapıdaki kök ve dal dokularında daha kolay ve doğru incelemeler yapılmasına olanak sağlayan yeni ve etkili boyama tekniklerinin geliştirilmesi bu dokular hakkındaki mevcut literatürün geliştirilmesine katkı sunacaktır. Farklı boya maddeleri değişik hücre tipleri ve bileşenleriyle tepkimeye girerek kendilerine özgü renkleri ortaya çıkarır. Hücreler içindeki farklı bileşenleri vurgulamak için farklı boyama yöntemleri kullanılmalıdır (Engin ve Gökbayrak, 2023). Ayrıca hücre duvarlarını ve bileşenlerini vurgulamak amacıyla dokular yarı saydam hale getirilebilir ve mikroskobik düzeyde görüntülemeyi bozan pigmentlerin ve fenolik bileşiklerin hücrelerden uzaklaştırılması sağlanabilmektedir. Bu amaçla, özellikleri birbirlerinden farklı ve ticari olarak temin edilebilen boyama maddeleri örneğin Toluidine blue O (Merck), Safranin O (Sigma-Aldrich) gibi kimyasallar ve reaktifler kullanılmaktadır.

Bu araştırmada, asma çeliklerinde kök oluşumunun morfolojik ve anatomik bir yaklaşımla incelenmesine yönelik yapılacak çalışmalarda kullanılacak boyama ve görüntüleme yöntemleri geliştirilmeye çalışılmış ve bu yöntemler arasındaki farklılıklar sunulmuştur.

## Materyal ve Yöntem

### Boyama İşlemi Uygulanacak Kesitlerin Hazırlanması

Boyama uygulamalarına geçmeden önce numune alımı, yıkama ve temizleme, sabitleme ve saklama, yumuşatma ve kesit alma işlemleri yapılmıştır. Araştırmada kullanılan bitkisel materyal 5BB (*Vitis berlandieri x Vitis riparia*) asma anacıdır. Bu anaca ait bir yaşlı dal örnekleri (4-5 cm uzunluğunda ve yaklaşık 1 cm çapında) kış dinlenme döneminde alınarak polietilen poşetler içerisinde +2°C'deki soğuk hava deposunda muhafaza edilmiştir. Daha sonra dikim için hazırlanan çelikler köklendirme ortamına (2:1 torf:perlit) alınmıştır. Çeliklerde kökler oluşuktan sonra (8 hafta) bazal kısımları 3-6 cm uzunluğunda kesilerek numuneler hazırlanmıştır.

Temizleme ve yıkama işlemi incelenecek materyalin doku tipi ve boyutları göz önüne alınarak yapılmıştır. Yıkama işleminde musluk suyu kullanılmıştır. Örnekler yıkandıktan sonra içerisinde saf su bulunan cam kaplar içerisinde temizleme işlemi gerçekleştirilmiştir.

Sabitleme ve saklama işleminde örneklerin doku yapısını ve hücrelerini bozulmadan en iyi koruyacak kimyasal madde karışımının kullanılması önemlidir. Bu amaçla genellikle farklı iki sabitleme ve saklama yöntemi kullanılmaktadır (Engin ve Gökbayrak, 2023). Birincisi, FAA (Formaldehit,

Alkol ve Asetik asit)'dir. İkincisi, Kopenhag karışımıdır (Etanol, Saf su, Gliserol). Asma numuneleri içerisinde FAA (Formalin %10, etanol %50 ve glasiyel asetik asit %5) bulunan kahverengi şişelerde oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Yumuşatma, incelenen numuneler göz önüne alındığında önem taşımaktadır. Aşırı yumuşatılmış veya yeterince yumuşatılmamış örneklerden iyi kesitler elde etmek zordur. Asma örneklerinde çalı ve ağaç türlerinde etkinliği kanıtlanmış ana yumuşatma olarak da bilinen kaynatma yöntemi kullanılmıştır (Schubert ve ark., 1999).

Kesit alma, başarılı mikroskopik incelemeler için büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla, klasik sürgülü yarı otomatik mikrotom Reichert Jung (Almanya) kullanılmıştır. Alınan kesitlerin kalınlığı ortalama 80-190 µm'dir. Bu şekilde ince kesitler elde edebilmek için çok keskin bıçaklar kullanılmış ve bu bıçaklar sık sık değiştirilmiştir. Mikrotom bıçağı ayarlandıktan sonra örneklerin yüzeyine %98 Etanol damlatılmış ve ıslak sulu boya fırçası yardımıyla örnek üzerindeki fazlalıklar alınarak bıçak kaydırılmıştır. Bu işlem, bıçağın temas noktasının ıslanmasını ve kesilen kısmın bükülmesini engellemek amacıyla her numunede uygulanmıştır.

Boyama işlemine geçilmeden kesitler %98 etanol içeren petri kaplarına alınmıştır. Alınan kesitler mikroskop altında incelenerek mikrotom bıçağının kesici ucundan gelebilecek iz ve çatlaklara karşı kontrol edilmiş ve bu tip örnekler boyama testine alınmamıştır.

### Boyama

Kesitlerin boyanmasında genellikle üç farklı uygulama şekli kullanılmaktadır. Birincisi, boyama solüsyonlarının doğrudan kesit üzerine damlatılmasıdır. Hazırlanan boya solüsyonlarıyla doldurulmuş pipetler kullanılır. İkincisi, petri kabında hazırlanan çözeltiye batırılır. Üçüncüsü, kesitler bir çözeltiden diğerine aktarılır (Engin ve Gökbayrak, 2023).

### Boyama Maddeleri

Araştırmada kullanılan bazı malzeme ve ticari olarak temin edilebilen boyama maddelerinin listesi Çizelge 1'de verilmiştir. İncelenecek numunenin yapısına göre boyama solüsyonları (Şekil 1), ihtiyaç duyulan miktar ve şişe boyutları gibi faktörler değişkenlik göstermektedir. Tüm çözeltiler etiketlendikten sonra bozulma göstermeyecekleri ortamlarda saklanmıştır.

Çizelge 1. Ticari olarak temin edilebilen boyama maddeleri ve hazırlanmasında kullanılan bazı kimyasal ve malzemeler.

Table 1. Commercially available stains and some chemicals and materials used in their preparation.

Boyama Maddeleri			
Kullanılan Boyalar	Üretici Firma	Hazırlama Solüsyonu	Malzemeler
Toluidine blue O	Merck	Saf su	Kronometre (boyama süresi için)
Aniline blue	Sigma-Aldrich	Saf su	Filtre kâğıdı (fazla boya için)
Safranin O	Sigma-Aldrich	Etil alkol	Lam ve lameller (farklı boyutlarda)
Bromophenol blue	Carlo-Erba	Saf su	Eldivenler
Methyl green	Sigma-Aldrich	Saf su	Farklı boyutlarda devetüyü fırçalar
Basic fuchsin	Sigma-Aldrich	Etil alkol	Şişeler ve petri kapları
Giemsa stain	Sigma	Etil alkol	Hassas terazi
Fast green FCF	Sigma-Aldrich	Saf su	Erlen ve beherler
Carmin	Merck	Saf su	Kilitli kaplar

### Boyama İşlemi

Kesit boyamalarında farklı araştırmacıların uyguladıkları çeşitli yöntemler vardır (Lancelle ve ark., 1986; Fields ve ark., 1997; Anderson ve Bancroft, 2002; Bond ve ark., 2008; Hackle, 2015; Hackle ve ark., 2015). Çalışmamızda kesitlerinin boyanmasında asma örneklerinin yapılarına göre tarafımızdan geliştirilen yöntemler kullanılmıştır.

### Toluidine blue O (TOB) Boyama

TBO, hücrelerin farklı kimyasal bileşenlerine farklı tepki veren ve çok renkli bir örnekle sonuçlanan katyonik, polikromatik bir boyadır. TBO, pektik asit gibi karboksilatlı polisakkaritlerle reaksiyona girerek morumsu, lignin ve tanenler gibi polifenolik maddelerle yeşilimsi mavi veya parlak mavi ve nükleik asitlerle morumsu veya yeşilimsi mavi renk verir (Fields ve ark., 1997). Bu çalışmada Toluidine blue O doğrudan kesitlere 3 dakika boyunca uygulanmıştır. Sonrasında filtre kâğıdı kullanarak fazla boya uzaklaştırılmış ve ardından kesitlerin yüzeyi saf suyla yıkanmıştır. Bu işlem kesitlerin kenarlarında fazla boya kalmayınca kadar (2-3 kez) tekrarlanmıştır. Son olarak kesitlerin üzerine bir damla saf su eklenmesiyle kesitler mikroskop altında incelemeye hazır hale getirilmiştir.

#### **Aniline blue (AB) Boyama**

Aniline blue (AB), diphenylamine blue, China blue ya da soluble blue olarak da isimlendirilir. Su mavisi bir renk oluşturur. Uygulandıktan sonra sarı-yeşil bir renk görünen, suda çözünür bir boyadır (Anderson ve Bancroft, 2002). Jewell (1958) tarafından çamlardaki pas mantarlarını ayırt etmek için kullanılmıştır. AB boyasının uygulanması için petri kabında % 0.5'lik çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiye kesitler 5-10 dakika batırılmıştır. Filtre kâğıdı kullanarak fazla boyası çıkarılan kesitlerin yüzeyi saf suyla yıkanarak mikroskop altında incelenmiştir.

#### **Safranin O (SO) Boyama**

Safranin O anatomik incelemelerde kullanılan klasik bir boya olup suda veya alkolde çözünerek kırmızı renk oluşturur. Bu boya odunlaşmış hücreleri ve yapıları boyamak için rutin olarak kullanılmaktadır (Bond ve ark., 2008). Çalışmamızda SO boya sulu çözeltisi kullanılmadan önce kalıntıları gidermek için 2 kez filtrelenmiştir. SO etkili bir boya olduğu için kesitlerdeki fazla boya etil alkol kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Uygulamamızda %1'lik SO kullanılmıştır (%1'lik SO çözeltisi, 100 mL saf su içinde 0.7 g SO ve 100 mL %90'lik etilalkol içinde 1 g SO).

#### **Bromophenol blue (BB) Boyama**

Bromophenol blue farklı ortamlarda sarıdan mora değişen bir boyama maddesi olmakla birlikte, aynı zamanda endüstriyel boya olarak da kullanılmaktadır. Selüloza bağlanma eğilimi olan regresif bir boyadır ve suda veya alkolde çözünür (Camarero ve ark., 2010). Çalışmamızda BB boyası doğrudan kesitlere 5 dakika boyunca uygulanmış ve daha sonrasında filtre kâğıdı kullanılarak fazla boya uzaklaştırılmıştır. Bu aşamadan sonra kesitlerin yüzeyi saf suyla 2 kez yıkanmış ve kesitlerin üzerine bir damla saf su eklenerek mikroskop altında incelemeye hazır hale getirilmiştir.

#### **Methyl green (MG) Boyama**

Methyl green (MG), nükleik asitlere bağlanan bazik bir boyadır. MG, DNA'yı boyar ancak özel bir DNA boyası değildir. Tüm hücrelerde tek başına kullanıldığında hemen hemen her şeyi, özellikle de pektoselülozik duvarı boyamaktadır (Anderson ve Bancroft, 2002). Çalışmada MG boya uygulaması için petri kabında % 0.2'lik çözelti hazırlanmış ve kesitler hazırlanan bu çözeltiye 10 dakika batırılmıştır. Filtre kâğıdı kullanarak fazla boyası uzaklaştırılan kesitlerin yüzeyi saf suyla yıkanarak mikroskop altında incelenmiştir.

#### **Basic fuchsin (BF) Boyama**

Basic fuchsin (BF), rosaniline, magenta II, pararosaniline ve fuchsine den oluşan floresan bir boyadır (Selvakumar ve ark., 2002). BF boyamanın aside dirençli basillerin tespiti için kullanılması onaylanmış olduğu ve Ziehl Neelsen boyama yönteminde yaygın olarak kullanıldığını ifade etmişlerdir. Çalışmamızda BF solüsyonu, 50 ml etil alkol (%95) içinde 0.5 g BF olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltiye kesitler 10 dakika batırıldıktan sonra fazla boyası uzaklaştırılan kesitlerin yüzeyi saf suyla yıkanarak mikroskop altında incelenmiştir.



Şekil 1. Araştırmada kullanılan boyama maddeleri a) Toluidine blue O, b) Aniline blue, c) Safranin O, d) Bromophenol blue, e)Methyl green, f) Basic fuchsin, g) Giemsa stain, h) Fast green FCF, i) Carmin.  
Figure 1. Staining substances used in the research a) Toluidine blue O, b) Aniline blue, c) Safranin O, d) Bromophenol blue, e)Methyl green, f) Basic fuchsin, g) Giemsa stain, h) Fast green FCF, i) Carmin.

#### **Giemsa stain (GS) Boyama**

Giemsa stain (GS) methylene blue, eosin ve azure karışımıdır. GS genellikle ticari olarak temin edilebilen Giemsa tozundan hazırlanır ve alkolde çözünür (Osipov ve Andreyan, 2014). Çalışmamızda GS solüsyonu, 100 ml etil alkol (%90) içinde 0.8 g GS olarak hazırlanmıştır.

#### **Fast green FCF (FG) Boyama**

Fast green FCF, yaygın olarak kullanılan karşıt bir boyadır. Su ve alkolde çözünür. Progresif bir boya olan FG boyamada, kesit istenen yoğunluğa ulaşana kadar boyanana boyama solüsyonuna batırılır. FG ile boyama yaparken, kesitler fazla solüsyona maruz bırakıldığında eşit olmayan boyamaya neden olabilir (Rauter ve Zufa, 1972). Bu çalışmada kesitler FG solüsyonuna batırılarak hazırlanmıştır. İki kez filtrelenmiş FG solüsyonu (100 ml %90 alkol hacminde 0.5 g toz FG) kullanılmıştır.

#### **Carmin (C) Boyama**

Carmin, cochineal böceğinden elde edildiğinde ‘cochineal’ olarak da adlandırılır. Kırmızı özlü alüminyum bileşenlerinden elde edilen parlak kırmızı renkte bir boyadır (Dapson, 2007). Araştırmamızda doğal kırmızı ve özel kod adı C.I. 75470 olan seri %1'lik çözeltisi kullanılmıştır.

#### **Safranin O (SO) ve Bromophenol blue (BB) Boyama**

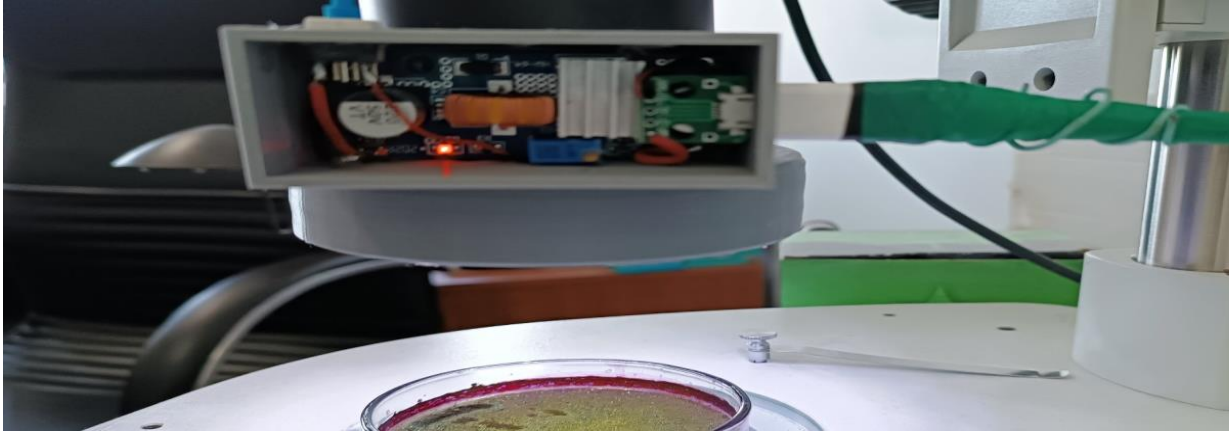
Saf su ile üç kez yıkanan kesitler %96 etanolde 1/1 oranında 10 dakika bekletildikten sonra 1g/L SO solüsyonunda 20 dakika bekletilmiş ve ardından fazlalıkları uzaklaştırmak için 3 kez saf suda durulama işlemi yapılmıştır. %0.75'lik BB çözeltisine (%10 gliserol ve %10 asetik asit içeren) 25 dakika daldırılmıştır. Filtre kâğıdı kullanarak fazla boyası çıkarılan kesitler tekrar saf suda üç kez durulanmıştır. Kesitlerin üzerine bir damla saf su eklenerek mikroskop altında incelemeye hazır hale getirilmiştir.

### Bromophenol blue (BB) ve Fast green FCF (FG) Boyama

İki kez saf su ile yıkanan kesitler %50 etanolde 5 dakika bekletildikten sonra %0.75'lik BB (%10 gliserol ve %10 asetik asit içeren) solüsyonunda 10 dakika bekletilmiş ve sonrasında fazla boyayı uzaklaştırmak için saf suda üç kez durulanmıştır. İkinci boyama için ise bu kesitler 10 dakika FG solüsyona (%100 alkol içeren 50 ml'de 0.5 g FG) daldırılmıştır. Oda sıcaklığında kurutulan numuneler üzerine bir damla saf su eklenerek mikroskop altında incele yapılmıştır.

### Görüntüleme ve Fotoğraflama

Boyanan kesitlerin görüntülenmesinde ve fotoğraflanmasında LC20-Bundle LCmicro yazılım programı (Olympus Corp., Japonya) kullanılmıştır. Boyama uygulaması yapılan kesitlerin incelenmesi Olympus SZX7 (Olympus Corp., Japan) stereomikroskop ve Olympus CX-41 (Olympus Corp., Japan) ışık mikroskobu altında yapılmıştır. Her iki mikroskoba da bağlanabilir özelliğe sahip dijital mikroskop kamerası (Olympus LC20) ile kesitlerin görüntülenmesi ve fotoğraflarının bilgisayara aktarılması sağlanmıştır. Kesitlerin fotoğrafları bilgisayara aktarıldıktan sonra, görüntülerin istenen özellikleri keskin bir şekilde gösterdiğinden emin olmak için dijital dosyalar anlık kontrol edilmiştir. İstenilen özellikte olmayanların yeniden fotoğrafları çekilmiştir. Stereomikroskop altında görüntüleme ve fotoğraflama doğrudan petri kapları içerisinde yapılmıştır. İncelenen örneklerin yüzey özelliklerinin daha belirgin bir şekilde fotoğraflanmasını sağlamak için bazı kesitler kısmen saf suya batırılmıştır. Daha ince ve küçük kesitler stereomikroskoptan daha iyi bir çözümüleme gücüne sahip olduğundan ışık mikroskobu altında incelenmiştir. Kesitlerin incelenmesinde uygun ışıklandırma sağlanmasının yanı sıra gölgeleme yaratarak istenilen yapılar ön plana çıkarılabilmektedir. Bundan dolayı kesitlerin görüntülenmesinde ve fotoğraflamasında numunenin tamamı üzerinde eşit bir aydınlatma sağlanması önemlidir. Bu amaçla tarafımızdan stereomikroskoba monte edilebilen 'halka ışık' geliştirilmiştir (Şekil 2).

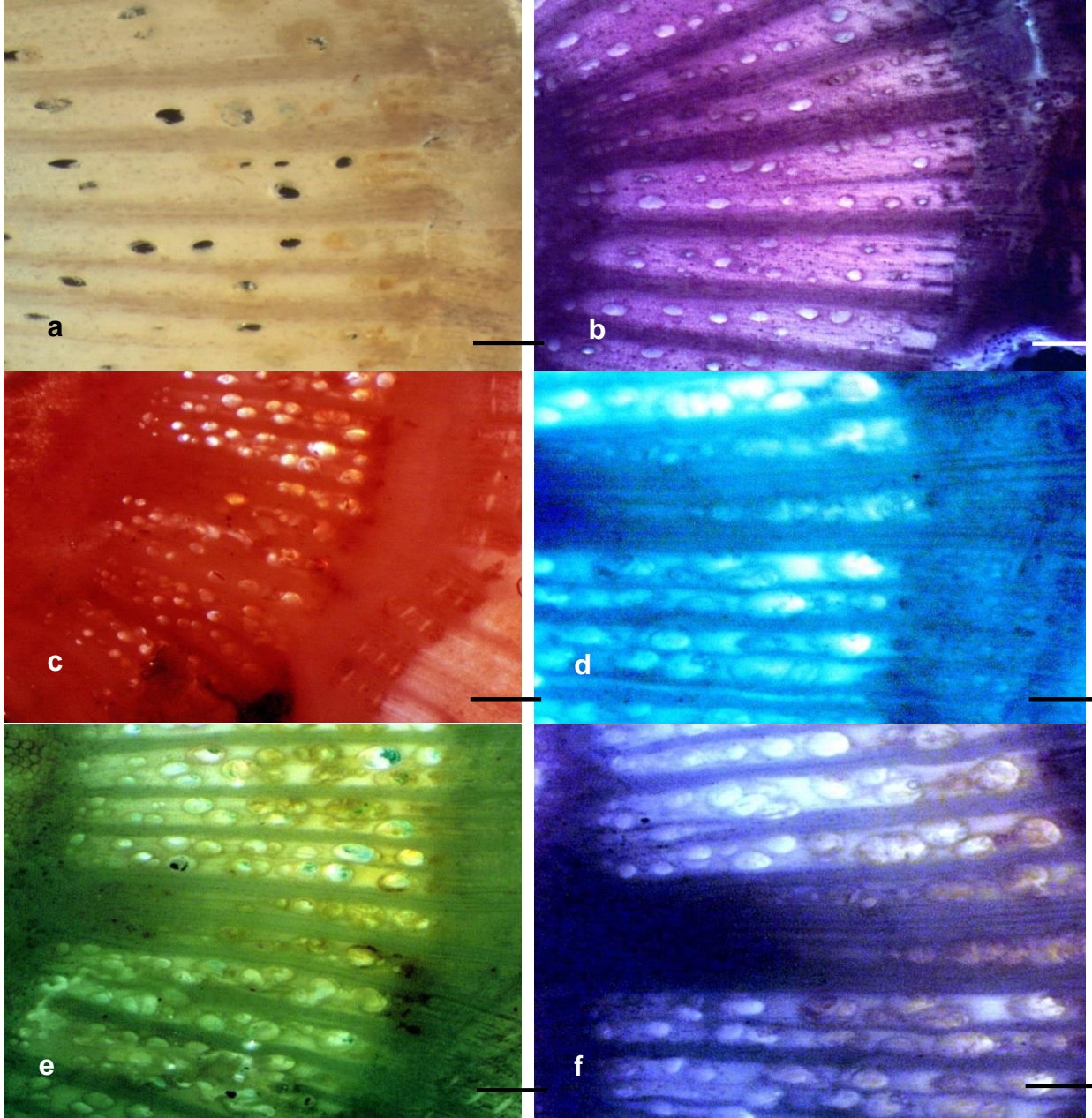


Şekil 2. Tarafımızdan geliştirilen, mikroskop altında sarı ve beyaz ışık aydınlatma sağlayan halka ışık modeli.  
Figure 2. The ring light model developed by us, providing yellow and white light illumination under the microscope.

Halka ışık, boyanan kesitlerin stereomikroskop kullanarak görüntüleme ve fotoğraflamasında numunenin tamamı üzerinde eşit bir aydınlatma olanağı sunmaktadır. Bunun yanı sıra, beyaz ışık, sarı ışık ve her iki ışık yoğunluğunu farklı oranlarda kullanarak numunelerin aydınlatılması sağlanmaktadır.

### Bulgular ve Tartışma

Asma dal dokularında ve dal üzerinde şekillenen köklerde doğal renk farklılıkları çok azdır (Şekil 3a). Bundan dolayı asmalarda kök oluşumunun ve dal dokularının yüzey ve iç özellikleri göstermek için konsantrasyonunu arttırmanın en iyi yolu boyamadır. Bu amaçla asma çeliklerinden kök oluşumunda hücre ve doku düzeyleri üzerine ayırt edici bilgiler sağlayarak net bir tanımlama ortaya koyabilmek için farklı boyama maddeleri ve bunların kullanıldığı farklı karışımlar üzerinde çalışılmıştır. Bu çalışmada Toluidine blue O (TOB), Safranin O (SO), Bromophenol blue (BB), Fast green FCF (FG) ve Aniline blue (AB) boyamaları kesitlerde hücre ve doku düzeyleri üzerine etkili sonuçlar ortaya koymuştur (Şekil 3 b,c,d e,f).

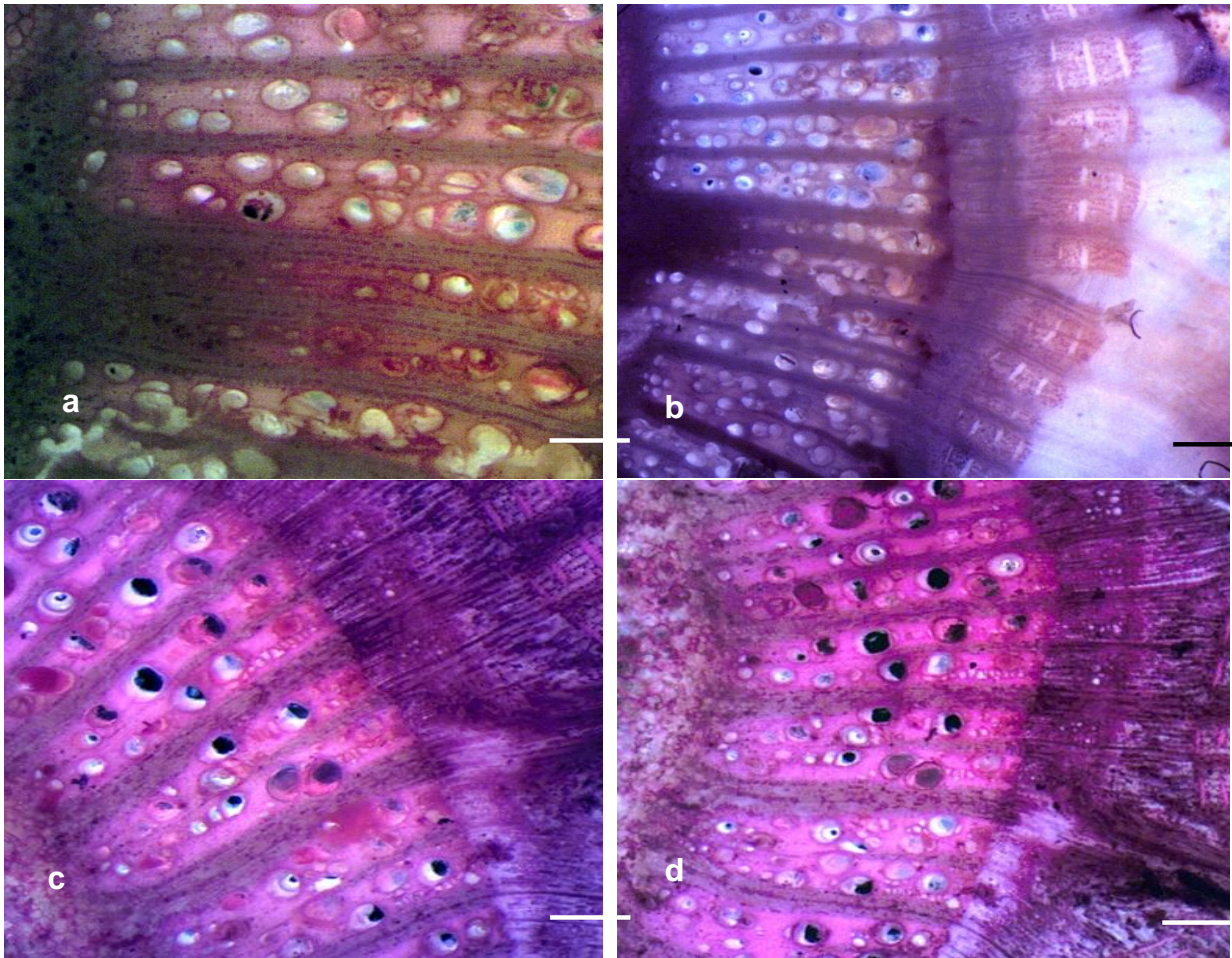


Şekil 3. Asma çeliklerinden alınan kesitlerde kök oluşumunun hücre ve doku düzeyleri doğal ve boyanmamış (a) ve boyama uygulaması yapılan Toluidine blue O (b), Safranin O (c), Bromophenol blue (d), Fast green FCF (e) ve Aniline blue (f) Ölçek çubuğu=300µm.

Figure 3. Cell and tissue levels of root formation in sections taken from grapevine cuttings, natural and unstained (a) and stained Toluidine blue O (b), Safranin O (c), Bromophenol blue (d), Fast green FCF (e) and Aniline blue (f) Scale bar=300µm.

TOB incelenen numunelerde (çapı 5mm küçük) en iyi sonucu veren boyama yöntemlerinden biri olarak belirlenmiştir (Şekil 4 a,b). Dokuların farklı bileşenlerine tepki vermekte ve kesitlerde renk farklılıkları oluşturmaktadır (Foglia ve ark., 2022). TOB'un lignin ve tanenler gibi polifenolik maddelerle yeşilimsi parlak mavi, nükleik asitlerle morumsu yeşilimsi mavi ve pektik asit gibi karboksilatlı polisakaritlerle reaksiyona girerek morumsu bir renk oluşturduğu bilinmektedir (Fields ve ark., 1997). Dolayısıyla asma kesitlerinde TOB boyamada ortaya çıkan renkler hücrelerin yapısı ve duvarları hakkında da bilgi verebilmektedir. Odunlaşmış dal kesitlerinde ikincil duvarlara sahip hücreler genellikle mavi görünüm almıştır. Öz bölgesindeki hücreler, yeşilimsi mora boyanmıştır. Daha ince kesitlerde kırmızımsı mor daha belirgindir.

SO su ve alkolde kolaylıkla çözülebilen ve oluşturduğu kırmızı renk ile dal anatomilerinin incelenmesinde odunlaşmış yapıları boyamada kullanılmaktadır (Galigher ve Kozloff, 1971; Ruzin, 1999; Fabien ve ark., 2020). SO incelenen kesitler üzerinde etkili bir kırmızı renk oluşturmuştur. SO solüsyonunda bekleme süresi uzadığında bu etki daha da artmıştır. SO boyamada kesitlerden fazla boyanın çıkarılması gereklidir. Aksi durumda çok yoğun kırmızı renk dokuları ayırt etmeyi zorlaştırmaktadır. Bu amaçla SO boyama yapılan kesitler mikroskop altında incelenmeden önce alkolle durulanmalıdır. Aşırı SO boyamasını engellemek için kesitlerin çözeltide bekleme süreleri azaltılabilir. Kesitlere uygulanan SO (%1'lik SO çözeltisi, 100 ml saf su içinde 0.7 g SO ve 100 ml %90'lik etilalkol içinde 1 g SO) içerisinde %1'lik SO çözeltisi etkili ve çift boyamalarda da kolaylıkla kullanılabilir özelliktedir. Fakat tekrarlanan uygulamalarda mutlaka filtrelenmelidir. Aksi durumda çökelti oluşturmaktadır. İncelenen asma kesitlerinde SO tek başına kullanılması durumunda etkili sonuçlar vermemiştir (Şekil 3c). SO ile karşıt bir boya (BB) kullanılmasının, asma kesitlerinin dokuları arasında ayırım yapmayı sağladığı saptanmıştır (Şekil 5). Çalışmamızın bu sonucu, BB boyamanın kullanılması gereken karşıt boyalar arasında bulunabileceğini göstermiştir.



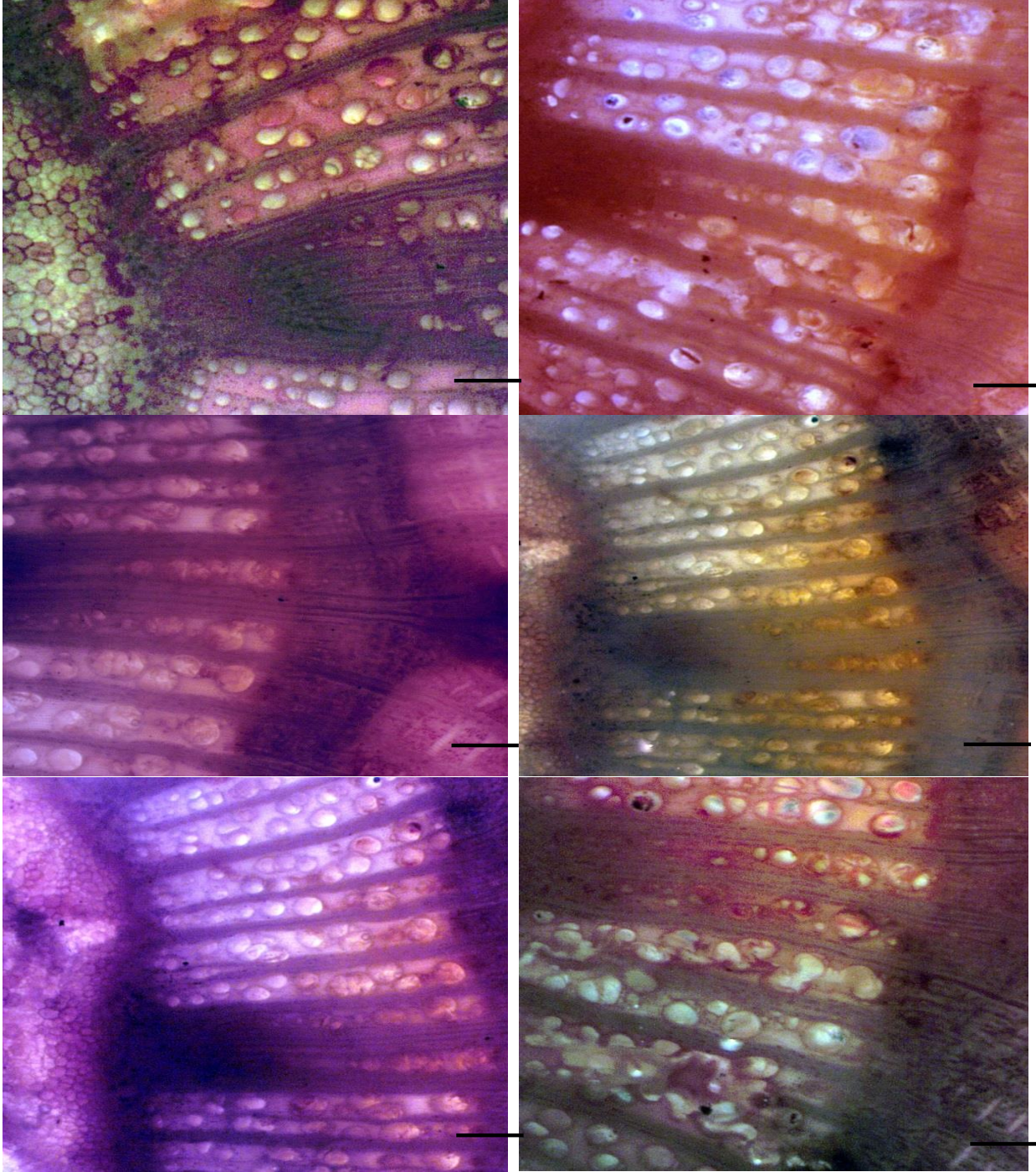
Şekil 4. Asma kesitlerinde kök oluşumunun hücre ve doku düzeyleri. a,b) Toluidine blue, c,d) Safranin O ve Bromophenol blue Ölçek çubuğu=300µm.

Figure 4. Cell and tissue levels of root formation in grapevine sections. a,b) Toluidine blue, c,d) Safranin O and Bromophenol blue Scale bar=300µm.

Karşıt boyalar üzerine yapılan çalışmalar incelendiğinde, Astra Blue ve Fast green FCF (FG)'nin en sık kullanılan karşıt boyalar olduğu görülmektedir (Micco ve Aronne, 2007). Karşıt boyalar ile ilgili olarak (Schwarze, 2007), SO ile boyamanın selülozun mevcut olup olmadığına bakılmaksızın lignini boyarken, AB ile boyamanın yalnızca lignin yokluğunda selülozu boyadığını ifade etmiştir. BB, selüloza afinitesi olan etkili bir boya olarak dikkat çekmiştir. Çalışmamızda SO ile karşıt bir boya olarak asma çeliklerindeki kök oluşumunun erken aşamalarını tanımlamada başarı ile



kullanılabileceği belirlenmiştir. SO, lignini boyarken, BB, yalnızca selülozu boyamış ve böylelikle dokular arasındaki ayırım ortaya konulabilmektedir (Şekil 5).



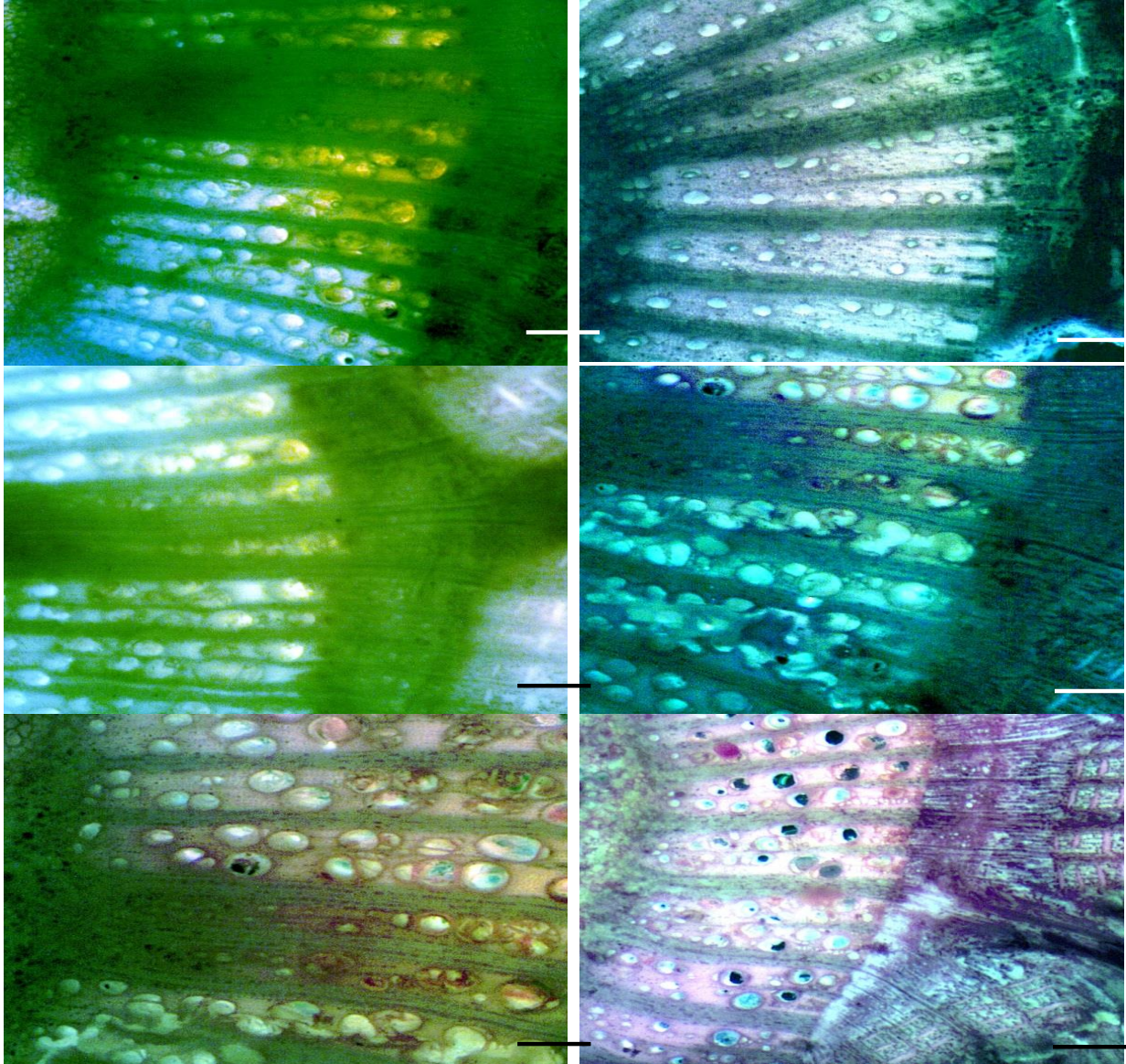
Şekil 5. Asma kesitlerinde kök oluşumunun hücre ve doku düzeylerine ait görseller. Safranin O ve Bromophenol blue çift boyama Ölçek çubuğu=300µm.

Figure 5. Images of cell and tissue levels of root formation in grapevine sections. Safranin O and Bromophenol blue double staining Scale bar=300µm.

Çift boyama tekniği kavak (*Populus tremuloides* Michx.) ağaçlarının damarlarındaki hücre duvarı odunlaşmasını ortaya koymak için kullanılmıştır (Sutton ve Tardif, 2005). Odunsu yapıya sahip numunelerle yapılan çalışmalar çözeltide su (Srebotnik ve Messner, 1994) kullanılmasının dokuları yumuşattığını, alkol (Vazquez ve Meyer, 2002; Çalı ve Candan, 2011) kullanılmasının ise dokuları sertleştirdiğini göstermektedir. Çalışmamızda yer alan boyamalarda dokulardaki farklılıkları görselleştirmek için sulu ve alkollü çözeltilerde kullanılmıştır. Çift boyama tekniği uygulamalarında

kullanılan boya maddelerinden biri alkol, diğeri suda çözülmesi durumunda dokuların sertlik veya yumuşaklık durumları değışkenlik göstereceğinden kesit yüzeyindeki boyamalar etkilenebilir. Asma kesitlerinde uyguladığımız Safranin O ve Bromophenol blue çift boyama tekniğinde, odunlaşmış duvarların kırmızı renkte olması ve selüloz açısından zengin katmanın mavi renkte olmasıyla dokular net bir şekilde gözlemlenebilmiştir (Şekil 4 c,d).

FG karşıt bir boya olarak kullanıldığında iyi sonuçların alındığı diğeri bir boyadır (Şekil 6). Çalışmamız FG'nin tek başına kullanılmasının aksine çift boyamalarda kullanılması durumunda daha etkili olduğunu göstermektedir (Şekil 6).



Şekil 6. Asma kesitlerinde kök oluşumunun hücre ve doku düzeylerine ait görseller. Bromophenol blue ve Fast green FCF çift boyama Ölçek çubuğu=300µm.

Figure 6. Images of cell and tissue levels of root formation in grapevine sections. Bromophenol blue and Fast green FCF double staining Scale bar=300µm.

FG boyamada kesitlerin istenen yoğunluğa kadar boyama solüsyonuna daldırılması damlatmaya göre daha etkili olmuştur. Bu nedenle genellikle seyreltik bir solüsyona batırılarak zayıf bir FG çözeltisi (%1) tavsiye edilmektedir (Wegner ve ark., 2014).

Çift boyama uygulamamızda %0.75'lik BB (%10 gliserol ve %10 asetik asit) solüsyonu kullanılmıştır. BB çözeltisi gibi karşı boya hazırlanmasında veya uygulanmasında küçük farklılıklar bulunmaktadır (Schweingruber ve ark., 2006). Ayrıca kesitler üzerine AB çözeltisinin damlatılmasından sonra 60°C'de 10 saniye ısıtılması önerilmektedir (Chaffey, 2002). Çift boyama

işlemleri zor ve uzun zaman almaktadır. Bu işlemleri kolaylaştırmak için, hem SO ve BB hem de BB ve FG çözeltilerinin eşit oranda birleştirilerek 3-5 dakikalık bir boyama süresi ile kesitlerin eş zamanlı boyanması önerilmektedir. Bazı araştırmacılar bu yaklaşımı benimseyerek örneğin, %1 SO ile %1 AB çözeltilerini eşit oranda karıştırılarak 10 dakikalık boyama süresine sahip bir SO ve AB karışımı (40 mg SO ve 150 mg AB, 100 ml saf su ile 2 ml asetik asit) önermişlerdir (Werf ve ark., 2007). AB ile eş zamanlı boyama da kullanılan SO'nun yerine Basacryl Brillant Rot BG (10 mg Basacryl-Brillant-Rot BG (C.I.16), kullanılabileceği ve bunun SO'nun aksine çökelti oluşturmadığı da bildirilmektedir (Rapp ve Behrmann, 1998).

FG boyamalar kesit yüzeylerinden sızarak eşit olmayan boyamalara neden olmuştur. Hem alkol ile hazırlanan hem de su ile hazırlanan FG boyama solüsyonları asma kesitlerin çift boyama işlemlerinde kullanılabilir bulunmuştur. Özellikle daha kalın ve odunlaşmış asma çeliklerden alınan kesitlere uygulanan FG solüsyonlarında dokular net şekilde ayırt edilebilmektedir (Şekil 6). Araştırmamızda MG, BF, GS ve C boyama solüsyonların kullanılması durumunda kesitlerin yüzeylerinde çok yoğun renk oluşumlarının meydana geldiği görülmüştür. Fazla boyamadan kaynaklandığını düşündüğümüz bu durum, incelenen kesitlerde dokuların ayırt edilememesine yol açmıştır. Bundan dolayı çalışmamızda yer alan boya maddelerinin daha düşük oranlarda veya karşıt boya olarak kullanılması gerektiği sonucuna varılmıştır. AB asma kesitlerinde kullanılabilecek boyamalardan bir diğeridir. Özellikle keskin tonlardaki boyamalarla öne çıkmaktadır. İlk kullanımının ağaç mantarlarının belirlenmesinde olduğu ifade edilmektedir (Jewell, 1958). Kutscha ve Gray (1972) Köknar (*Abies balsamea* (L.) Mill.) kesitlerindeki dokularının şekillenmesiyle ilgili bir çalışmada ondan fazla boyama solüsyonunun test edildiğini ve AB kullanılarak çok iyi sonuçlar alındığını ifade etmişlerdir.

Farklı boyama maddelerini kullanarak yapılan araştırmalarda hücre duvarlarını ve lifleri başarılı bir şekilde boyamak için %1 SO ve AB içeren çift boyamaların kullanılması tavsiye edilmektedir (Schweingruber, 1990; Ruzin, 1999; Horobin ve Kiernan, 2002). Araştırmamızda kullanılan her iki çift boyama yönteminden de başarılı sonuçlar alınmıştır. Her iki çift boyama yönteminin de asma gövde ve kök kesitlerinin mikroskop altında incelenmesinde kullanılması tavsiye edilir. Gartner ve Schweingruber (2013) SO ve FG'in dal yapısının tanımlanmasında oldukça tatmin edici olduğunu ve hücre yapılarının görselleştirilmesinde AB kullanımını önermiştir. Ayrıca hücre yapılarını, yoğunlaşmalarını ve hücre duvarlarını keskin bir şekilde boyamak için AB, SO ve BP'nin birlikte kullanımları başka bir ifade ile üçlü boyamalar üzerine yeni çalışmalar yapılmalıdır. Farklı boyalar kullanarak farklı renklerde boyanan kesitlerin yüzeyindeki renklenmelerin ve keskinliğin mikroskop altında daha iyi görüntülemek ve fotoğraflamak için tarafımızdan 'halka ışık' geliştirilmiştir. Halka ışık, numunenin tamamı üzerine beyaz ışık, sarı ışık ve her iki ışık yoğunluğunu farklı oranlarda kullanarak kesit yüzeylerinde istenilen aydınlatma olanağı sunmaktadır.

### Sonuç ve Öneriler

Sonuç olarak boyama uygulamalarından Toluidine blue O, Safranin O, Bromophenol blue, Fast green FCF ve Aniline blue hücre ve doku düzeyleri üzerine etkili sonuçlar vermiştir. Araştırmamızda kullanılan çift boyama yöntemlerinden de Safranin O + Bromophenol blue ve Bromophenol blue + Fast green FCF dokuların belirgin bir şekilde boyanmasında oldukça etkili olmuştur. Bundan dolayı her iki çift boyama yöntemi de asma dal çeliklerinden adventif kök oluşumunun mikroskop altında incelenmesinde kullanılması önerilmektedir.

Bu çalışmanın bir diğer önemli özelliği ise, ilk defa 'halka ışık' yönteminin uygulanmış olmasıdır. Tarafımızdan geliştirilen 'halka ışık' tekniği boyanan kesitlerin yüzeyindeki renklenmeleri ve keskinliği artırarak numunelerin mikroskop altında görüntüleme ve fotoğraflamasında başarıyı artırmıştır. Halka ışık tekniği, numunenin tamamı üzerine beyaz ışık, sarı ışık ve her iki ışık yoğunluğunu farklı oranlarda kullanarak aydınlatma olanağı sunmaktadır. Dolayısıyla gelecekteki çalışmalarda sadece asmada değil diğer bitki türlerinin kesitlerinde doku ve hücrelerin daha iyi bir şekilde görüntülenmesinde oldukça faydalı olacağı düşünülmektedir.

### Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

### Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

### Kaynaklar

- Anderson, G., Bancroft, J., 2002. Tissue processing and microtomy. In: Bancroft J, Gamble M. Theory and practice of histological techniques. Churchill Livingstone, London, pp 85–107.
- Arık, C., Altındışlı, A., 2020. The effects of fixation and staining methods in histological investigation on the grafted cuttings of grapevine. Journal of Agricultural Faculty of Gaziosmanpaşa University. 38 (1): 65-72.
- Berlyn, G.P., Miksche, J.P., 1976. Botanical microtechnique and cytochemistry. Iowa State University Press, Ames.
- Bond, J., Donaldson, L., Hill, S., Hitchcock, K., 2008. Safranin fluorescent staining of wood cell walls. Biotech. Histochem. 83: 161-171.
- Bracegirdle, B., 1986. A history of microtechnique: the evolution of the microtome and the development of tissue preparation. History of microscopy series. Science Heritage Ltd, Lincolnwood.
- Camarero, J.J., Olano, J.M., Parras, A., 2010. Plastic bimodal xylogenesis in conifers from continental Mediterranean climates. New Phytol. 185:471–480.
- Chaffey, N.J., 2002. Wood formation in trees: cell and molecular biology techniques. Taylor-Francis, New York.
- Çalı, Ö. İ., Candan, F., 2011. Bitki Anatomisi Uygulamaları Kitabı, Nobel Yayınları, 112 s., Ankara
- Dapson, R. W., 2007. The history, chemistry and modes of action of carmine and related dyes. Biological Stain Commission Biotechnic & Histochemistry. 82(45): 173187.
- Engin, H., Gökbayrak, Z., 2023. Microscopic analyzes on stem samples. New frontiers in agriculture, forest and water issues. 27: 533-549.
- Fabien, B., Coentrin, S., Laure, T., Sophie, B., Godfrey, N. 2020. A rapid and quantitative safranin-based fluorescent microscopy method to evaluate cell wall lignification. The Plant Journal. John Wiley & Sons Ltd.
- Fields, S.D., Strout, G.W., Russell, S.D., 1997. Spray-freezing freeze substitution (SFFS) of cell suspensions for improved preservation of ultrastructure. Micro Res Tech. 38: 315–328.
- Foglia, R., Landi, L., Romanazzi, G. 2022. Analyses of xylem vessel size on grapevine cultivars and relationship with incidence of esca disease, a threat to grape quality. Appl. Sci. 12: 1177.
- Gahan, P.B., 1984. Plant histochemistry and cytochemistry-an introduction. Academic Press, London.
- Galigher, A.E., Kozloff, E.N., 1971. Essentials of practical microtechnique. Lea & Febiger, Philadelphia.
- Gartner, H., Heinrich, I., 2010. Anatomie des cernes chez les plantes ligneuses en regions temperees et tropicales. In: Payette S, Filion L La Dendrochronologie: Principes, methodes et applications. Presses de Universite Laval, Quebec, 33–60.
- Gartner, H., Schweingruber, F.H., 2013. Microscopic preparation techniques for plant stem analysis. Kessel Publishing House, Germany.
- Hacke, U., 2015. Functional and ecological xylem anatomy. Springer International Publishing Switzerland. 133(15783):2-5.
- Hacke, U.G., Venturas, M.D., MacKinnon, E.D., Jacobsen, A.L., Sperry J.S., Pratt, R.B., 2015. The standard centrifuge method accurately measures vulnerability curves of long-vesselled olive stems. New Phytol. 205:116–127.
- Horobin, R.W., 1982. Histochemistry. Gustav Fischer, Stuttgart.
- Horobin, R.W., Kiernan, J.A., 2002. Conn's biological stains. BIOS Scientific, Oxford.
- Jewell, F.F., 1958. Stain technique for rapid diagnosis of rust in southern pines. For Sci. 4:42–44.
- Kutscha, N.P., Gray, J.R., 1972. The suitability of certain stains for studying lignification in balsam fir *Abies balsamea* (L.) Mill. Tech Bull 72. Life Sciences and Agriculture Experimental Station, University of Maine.
- Lancelle, S.A., Callahan, D.A., Hepler, P.K., 1986. A method for rapid freeze fixation of plant cells. Protoplasma. 131:153–165.
- Micco, V., Aronne, G., 2007. Combined histochemistry and autofluorescence for identifying lignin distribution in cell walls. Biotech Histochem. 82:209–216.
- Osipov, A., Andreyan, O., 2014. DNA comet Giemsa staining for conventional bright-field microscopy. International Journal of Molecular Sciences 15(4): 6086-6095.
- Rapp, A.O., Behrmann, K., 1998. Preparation of wood for microscopic analysis after decay testing. Holz als Roh und Werkstoff. 56:277–278.
- Rauter, R.W., Zufa, L., 1972. A rapid technique for the determination of *Cronartium ribicola mycelium* in white pine bark tissues. In: Biology of rust resistance in forest trees. Proc of a NATO-IUFRO Advanced Study Institute, USDA Forest Service, (Miscellaneous Publ No 1221), Washington DC, 387–392.
- Ruzin, S.E., 1999. Plant microtechnique and microscopy. Oxford University Press, New York.

- Schubert, A., Lovisolo, C., Peterlunger, E., 1999. Shoot orientation affects vessel size, shoot hydraulic conductivity and shoot growth rate in *Vitis vinifera* L. *Plant Cell Environ.* 22:197–204.
- Schwarze, F.W., 2007. Wood decay under the microscope. *Fungal Biol Rev.* 21:133–170.
- Schweingruber, F.H., 1990. Microscopic wood anatomy. Swiss Federal Institute for Forest, Snow and Landscape Research, Birmensdorf.
- Schweingruber, F.H., Börner, A., Schulze, E.D., 2006. Atlas of woody plant stems: evolution, structure, and environmental modifications. Springer, Berlin.
- Selvakumar, N., Ander, A., 2002. Inefficiency of 0.3% carbol fuchsin in ziehl-neelsen staining for detecting acid-fast bacilli. *Journal of clinical microbiology* 40(8): 3041-3043.
- Smith, G.M., 1915. The development of botanical microtechnique. *Trans Am Microsc Soc.* 34:71–129
- Srebotnik, E., Messner, K., 1994. A simple method that uses differential staining and light microscopy to assess the selectivity of wood delignification by white rot fungi. *Appl Environ Microbiol.* 60:1383–1386.
- Sutton, A., Tardif, J., 2005. Distribution and anatomical characteristics of white rings in *Populus tremuloides*. *IAWA J.* 26:221–238.
- Vazquez-Cooz I., Meyer, R.W., 2002. A differential staining method to identify lignified and unlignified tissues. *Biothech Histochem.* 77:277–282.
- Wegner, L., Sass-Klaassen, U., Eilmann, B., 2014. Micro-core processing a time and cost efficient protocol. Wageningen University.
- Werf, G.W., Sass-Klaassen, U., Mohren, G.M.J., 2007. The impact of the summer drought on the intra-annual growth pattern of beech (*Fagus sylvatica* L.) and oak (*Quercus robur* L.) on a dry site in the Netherlands. *Dendrochronologia.* 25:103–112.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution CC BY 4.0 International License.