

8. CAN AKKAYAN

SERİ
SERIE B

CİLT
TOME XXIII

SAYI
FASCICULE I

1973

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ

ORMAN FAKÜLTESİ DERGİSİ

REVUE DE LA FACULTÉ DES SCIENCES FORESTIÈRES
DE L'UNIVERSITÉ D'ISTANBUL



ODUNSU MATERYALİN MİKROSKOP YARDIMI İLE İNCELENME TEKİNİĞİ

Yazan :

Prof. Dr. A. Yılmaz BOZKURT

G İ R İ Ő :

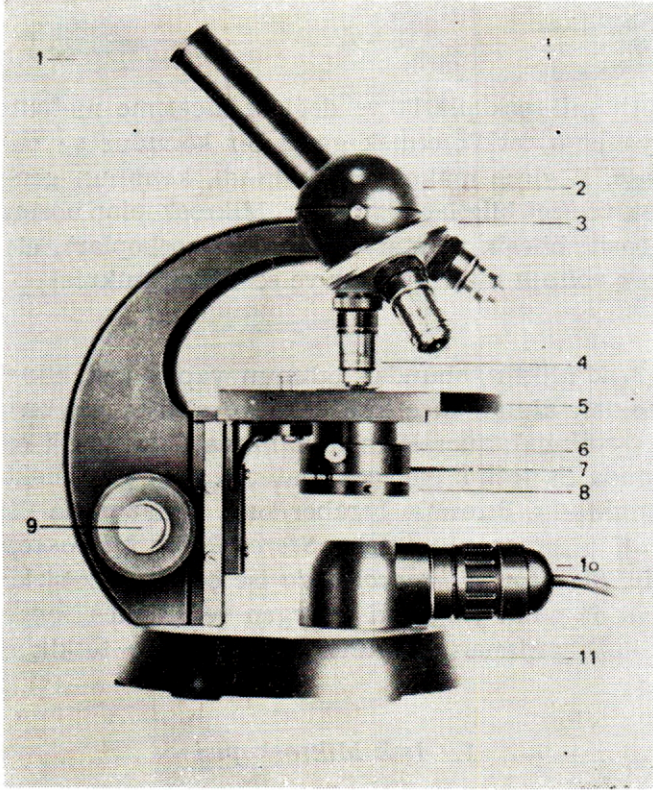
Çok çeşitli mikroskoplarla ve değişik inceleme metodları yardımı ile odunun yapısını tetkik etmek geniş bir konudur ve bu makalenin sınırlarını aşar. Böylece makalenin maksadı, konunun genel mahiyeti hakkında kısa ve özet bilgiler vermektir. Mikroskoplar normal ışık mikroskopları (basit, bileşik ve stereoskopik mikroskoplar), elektron mikroskop, yüksek voltajlı mikroskoplar ve scanning mikroskop olmak üzere çok çeşitlidir.

Normal Işık Mikroskopunda odunun yapısı genellikle boyanmış, odun dokusundan alınan ince kesitlerin veyahutta bir birinden ayrılmış (masere edilmiş) hücrelerin kullanılması ile tetkik edilmektedir. Her iki durumda da tetkik edilecek material ışığı geçirmekte ve alttan ısıtma yapılmaktadır. Bununla beraber kesit almadan da üstten ısıtma suretiyle şeffaf olmayan numuneler *Stereoskopik Mikroskop* ile incelenebilmektedir. *Elektron Mikroskopunda* ise çok ince kesitlerden yararlanılmakta, ya da odun yüzeyleri geçirgen ve «replica» adı verilen metod vasıtası ile hazırlanan numuneler yardımı ile tetkik edilebilmektedir.

1. Işık Mikroskopisi

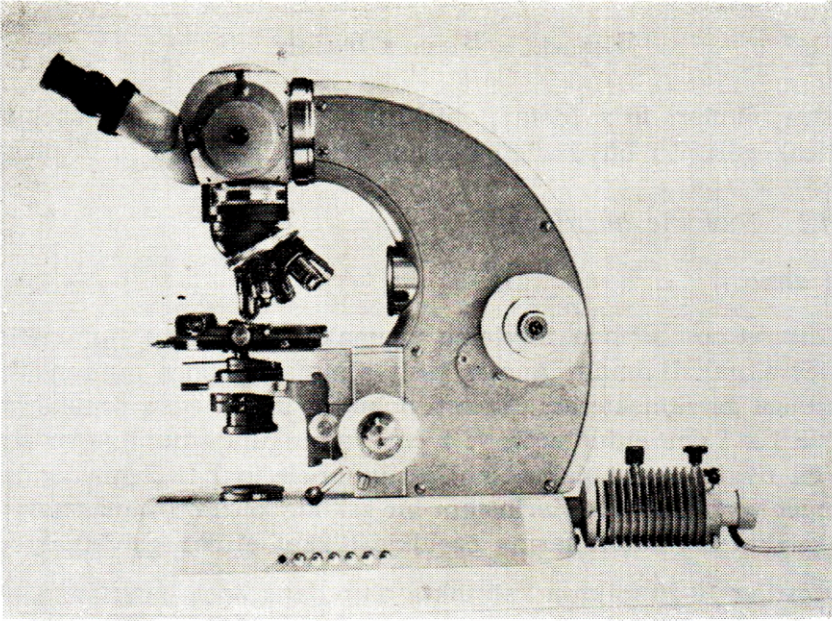
Işık mikroskopisinde kullanılan mikroskoplar bileşik mikroskoplardır. Bunlar çok değişik tip ve yapıdadırlar. Esas itibariyle bileşik mikroskop iki mercek sistemini taşıyan bir gövde tüb'ünü ihtiva etmektedir. Bu tübün üst ucunda oküler, alt ucunda da objektif vardır. Görüntü evvelâ objektif tarafından teşkil edilmekte, sonra oküler vasıtasıyla de büyütülmektedir. Tek okülerli mikroskoplara monoküler, iki okülerli de binoküler mikroskop adı verilir. Bir mikroskop, tipine bağlı olarak değiştirilebilen beş değişik büyütmele objektifle donatıl-

mıştır. Bileşik mikroskopların diğer önemli bir kısmı ise tablanın altındaki kondansördür. Kondansör ışığın entansitesini ve görüntü kontrastını ayarlamağa yardım eden üçüncü bir mercekler sistemidir. Stereoskopik mikroskoplarda kondansör kısmı bulunmamaktadır (Needham, 1958). Şekil: 1 de normal ışık mikroskobu ve kısımları, Şekil: 2 de bir araştırma foto mikroskobu ve Şekil : 3 de ise stereoskopik mikroskop görülmektedir.

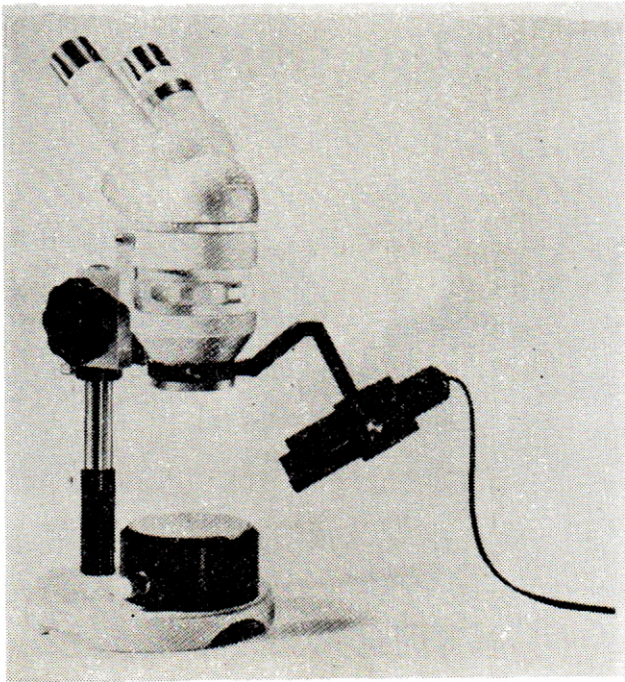


Şekil 1. Işık Mikroskobu ve kısımları. 1) Oküler, 2) Mikroskop túb'a, 3) Rovel-ver (Objektif taşıyıcı), 4) Objektif, 5) Obje tablası, 6) Kondansör, 7) Diafram, 8) Renkli cam filtre tutucusu, 9) İnce ve kaba ayar vidası, 10) Işıtma tertibatı ve ayna, 11) Mikroskop ayağı.

Bileşik mikroskoplarla takriben 2000 x (defa) ya kadar büyütme yapmak mümkün olabilmektedir. Esasen okülerin büyütme gücü ile kullanılan objektifin büyütme gücünün çarpımı mikroskobun büyütme kapasitesini vermekte ve aşağıdaki şekilde hesaplanmaktadır:



Şekil 2. Bir araştırma Fotomikroskopunun genel görünüşü



Şekil 3. Bir Stereoskopik mikroskopun genel görünüşü

$$B_{\text{mikroskop}} = B_{\text{oküler}} \times B_{\text{objektif}}$$

Örneğin; oküleri 10 x (defa), objektifi 40 x büyüten mikroskopla elde olunacak görüntü büyüklüğü normal büyüklüğün 400 misli olacaktır.

1.1. Numune hazırlama

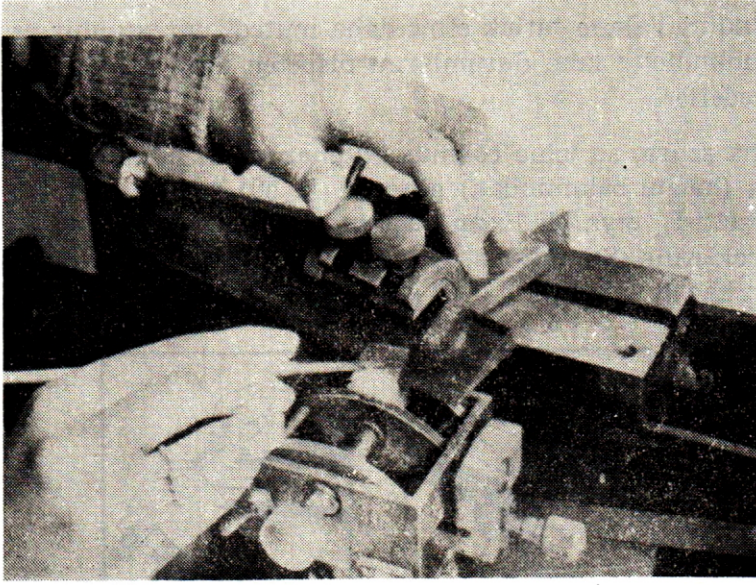
Kesit alma

Mikroskop altında inceleme yapmak için odunsu numunelerden kesitler almak lâzımdır. Ancak kesit alınmadan önce numunenin hazırlanması gerekmektedir. Odunsu dokuları ihtiva eden örneklerde genellikle 1 x 1 cm² enine kesit ve 2 cm uzunluğunda numuneler elde etmek en uygun bulunmaktadır. Bu numunelerin hazırlanmasında enine, teğet ve radial yüzeylerin tam bir şekilde kesilmiş olmasına ve meyilli kesilmemiş bulunmasına özellikle dikkat etmek gerekmektedir.

Kesitler 10-20 mikron kalınlıkta olup daha önce hazırlanan numuneden kızaklı bir mikrotom yardımıyla alınmaktadır. Şekil 4 ve 5 de



Şekil 4. Kızaklı bir mikrotom ve kesitlerin hazırlanmasında kullanılan lüzumlu yardımcı âlet ve kimyasal maddeler. (F.P.R.L., 1956).



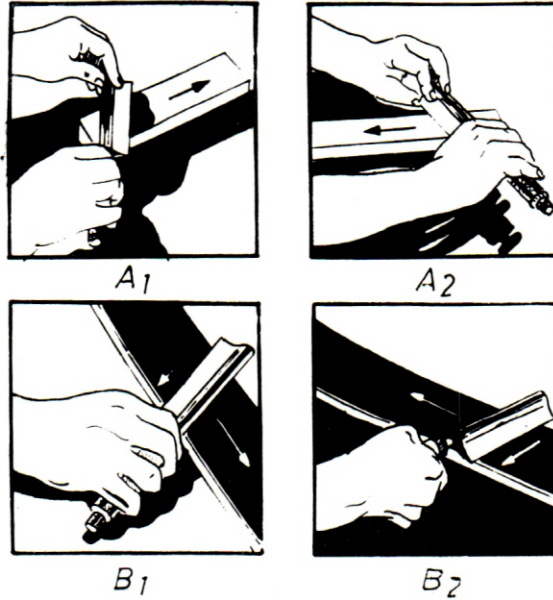
Şekil 5. Kızaklı bir mikrotom ile odunsu kesitlerin alınma şekli (F.P.R.L., 1956).

görülebileceği gibi mikrotom elle çalışan bir makine olup esasen şu kısımlardan müteşekkildir: (a) Numuneyi tutan kısım, (b) her vuruştan sonra önceden tesbit edilen kalınlığı otomatik olarak ayarlayan kısım, ve (c) bıçağı tutan ve kızaklar üzerinde kaymasını sağlayan kısımlar. Mikrotom bıçağı esasen bir ustura bıçağını andırmaktadır. Fakat daha geniş ve daha uzundur (20-25 cm). İyi bir kesiş yapabilmek için bıçak çok iyi bir şekilde bilenmiş olmalı, dişleri ihtiva etmemeli ve keskin bulunmalıdır. Bıçak ağzının uygun bir şekilde hazırlanıp hazırlanmadığını tetkik etmek için 50 x veya 100 x büyüten mikroskop altında incelemek gerekmektedir. Bıçağın bilenmesi evvelâ yağ taşında, sonra da bir kösele üzerinde el yardımı ile ileri geri hareket ettirmek suretiyle yapılır. Şayet otomatik bir mikrotom bileme makinesi varsa, tabiatıyla onunla bilemek daha uygundur (Şekil 6 ve 7).

Kesit alınacak material, şayet odun v.b. şekilde oldukça sert ise önceden yumuşatılması gerekmektedir. Bazı yumuşak ağaç türleri odunları için tâze halde iken yumuşatmadan kesit almak mümkün olmaktadır. Yumuşatma ya su içinde kaynatma, ya da içinde su bulunan bir vakum desikatöründe numunelerin su içine çöktürülmesi yoluyla yapılmaktadır. Kaynatmada çöktürme zaman zaman soğuk su ilâve edilmek suretiyle çabuklaştırılabilir. Veyahutta numunelerin sıcak su içinden çıkartılıp soğuk suya batırılması ile de çöktürme yapmak

mümkündür. Vakum tatbik etme daha mutedil bir usuldür ve bundan dolayı numuneler tabii durumlarını nisbeten daha iyi bir şekilde muhafaza ederler.

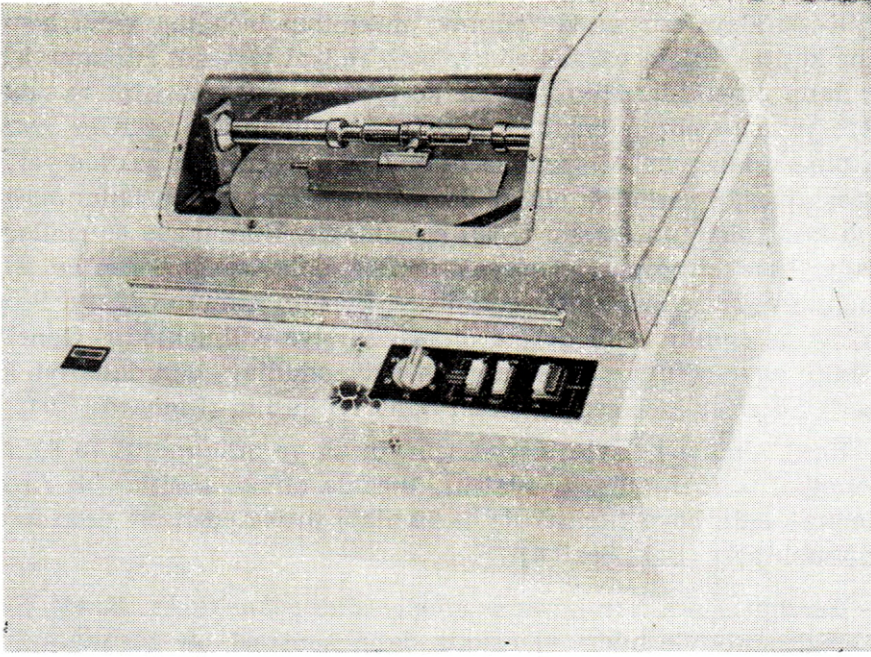
Daha sonra, su içine çökmüş bulunan odun numuneleri eşit miktarlarda (hacim bakımından) gliserin (% 50) ve etil alkol (% 50) eriyiği (çözeltisi) veya bir kısım gliserin, 2 kısım etil alkol ve 3 kısım su içinde bekletilir. Yumuşama odunun sertliği ile ilgili olarak değişmek üzere bir kaç ay sürebilir.



Şekil 6. Yağ taşı ve kayış yardımı ile mikrotom bıçağının bilenme tekniği.

(A₁ — A₂ yağ taşı ile ve B₁ — B₂ bileme kayışı ile)

Bu gibi muameleler genellikle pek çok ağaç türü odunu için kâfidir. Ancak çok sert odunlu ağaç türleri için özel metodlar gerekli olabilir. Bu metodlar hidrofluorik asit (%48 lik), hidrojen peroksit H₂O₂ ve asetik asit veya buhar vasıtasıyla odunsu numuneleri yumuşatma metodlarıdır. Sonuncu yani buharla yumuşatmada numuneler su içersine çöktürülmeden mikrotoma takılmakta ve kesilecek yüzeye buhar püskürtülerek kesitler alınmaktadır. Hidrofluorik asit kullanıldığında üstü kapalı plâstik kaplardan istifade edilmeli, numunelerin asit içersine yerleştirilmesi veya alınmasında ağaçtan yapılmış maşalar ve lâstik eldiven kullanmalı, gazları teneffüs edilmemelidir. Sertliği değişik



Şekil 7. Otomatik mikrotom bıçağı bileme makinesi.

olan ağaç türü odunlarında değişik sürelerde numuneler bu asit içerisinde bekletilmelidir (Jane, 1956).

Meşe	2 gün
Teak ve porsuk	4 gün
Şimşir	6 gün
Pelesenk	9 gün

Yaşayan dokulardan kesit alındığı zaman, örneğin; bir kambiyum araştırmasında ve kambiyum faaliyet halinde iken nümuneleri bazı fiksatorlerin içerisine koymak ve o andaki durumda fikse etmek icabettir. Fiksator olarak çok çeşitli eriyik vardır. Bunlar % 95 lik etil alkol, Kromasetik asit, Formalin aseto-alkol v.b. dir. En uygun olanı ise FAA olarak bilinen Formalin Aceto-alcohol olup eriyiğin hazırlanış şekli aşağıda belirtilmiştir (Bozkurt, 1966).

Etil alkol (% 70)	90 cm ³
Glâsiyal asetik asit	3 cm ³
Formalin	7 cm ³

Kesit alma esnasında odunun mikrotom bıçağına karşı koyması enine kesitte, liflere paralel yönler olan radyal ve teğet istikametlerden çok daha büyüktür. Mikrotom ile kesit alma maharet ister ve odunun hücre yapısını bozmadan ince kesitler alabilmek için tecrübe kazanılmış olması lâzımdır. Mikrotoma nümunenin uygun bir şekilde yerleştirilmesi, bıçağına verilecek dikine ve yatık açılarının uygun bulunması başarılı kesit almanın esasını teşkil etmektedir. Nümunede öz ışınlarının bıçağın hareketine paralel olacak şekilde âlete takılmasının en uygun olduğu araştırmalarla tesbit edilmiştir. Bıçağın nümune yüzeyi ile yaptığı dikine açının 10-15 derece olması tavsiye edilmektedir. Genellikle yapraklı ağaç odunları iğne yapraklı ağaç odunlarından daha iyi, kalın çeperli hücreler ince çeperlilerden daha iyi kesilir (Richards, 1949).

Kesit almayı kolaylaştırmak için, bıçak ve nümune % 70 lik alkol (etil alkol = $C_2H_5 OH$) ile ıslatılır. Bıçakla alınan kesitler bir fırça (8 Numaralı sulu boya fırçası) ile % 70 alkol ihtiva eden bir petri kabına konulmaktadır (Bak: Şekil 4).

Bundan sonra sıra boyama ameliyesine gelmektedir. Kaide olarak boyamak suretiyle hücre yapısında daha kontrast bir görünüm temin edilmektedir. Çeşitli boyama metodları vardır. Örneğin, Safranin ve Hematoksilin veya Safranin ve Fast Green (sabit yeşil). Safranin ve Hematoksilin normal ve basınç odunu nümuneleri kesitlerini boyamada, Safranin ve Fast Green ise normal ve çekme odunu nümune kesitlerini boyamada kullanılmaktadır. Safranin lignini kırmızıya, hematoksilin ve fast green de selülozu sırasıyla mavimsi mor ve yeşile boyarlar. Safranin alkolde veya destile su içinde eritilmekte, yalnız da kullanılabilir. Ancak çift boyama tekniği daha iyi netice vermektedir. Bu boyalardan 1 gr (toz halde) 100 cm³ alkol veya destile su içerisinde çözüldikten sonra boyama eriyikleri elde olunmaktadır (Tsoumis, 1969).

(a) *Safranin ve hematoksilin ile boyama tekniği :*

1. Bir pipet yardımı ile kesitlerin içinde bulunduğu alkol emilir.
2. Kesitler üzerine 2 dakika veya daha az bir zaman için safranin damlatılır.
3. % 50 lik alkol ilâve edilir.
4. Kesitlerden çıkan su renksiz kalıncaya kadar kesitler destile su ile yıkanır.
5. Kesitler üzerine hematoksilin damlatılır ve 2 dakika kadar beklenir.

6. Su renksiz kalıncaya kadar kesitler yıkanır.
7. % 50, %70, % 95 ve saf alkol (% 99,9) ile kesitler sıra ile temizlenir ve dehidrate edilir (su çıkartılır).
8. Kesitler üzerine Ksilen (Xylene) dökülür.
9. Kesit lâm üzerine bir fırça veya pens yardımıyla yerleştirilir Bisturi ile şekil verilir, fazla ksilen alınır, bir miktar, (bir damla) Kanada Balzamu kesit üzerine damlatılır. Üzerine hafif ısıtılmış lâmel yine pens yardımı ile o şekilde kapatılır ki hava kabarcığı kalmasın. Hava kabarcığı kalmışsa iğne ile hafifçe bastırılarak giderilmeğe çalışılır. Daha sonra lâmel üzerine ağırlık konularak kanada balzamının sertleşmesi beklenir (Tsoumis, 1969).

(b) *Safranin ve Fast green (sabit yeşil) ile boyama tekniği (F.P. R.L., 1956).*

1. Kesitler 5 dakika % 1 lik su içinde eritilmiş safranin eriyiğine yerleştirilir.
2. Safranin süzülür ve en az üç defa damıtık su ile yıkanır.
3. İki defa % 96 lık alkolde yıkanır.
4. Kesitler 2 dakika kadar (1/3) oranında alkol ve karanfil yağında çözünmüş % 1 lik Fast green içine geçirilir.
5. Fast green temizlenir ve hiç olmazsa üç defa % 96 lık alkolde yıkanır. (Saf alkolde bir veya iki defa yıkamak yeterlidir).
6. Kesitler 5 dakika karanfil yağında, sonra bir dakika Cedar wood oil (ardıç odunu yağı) içinde tutulur ve kanada balzamu ile monte edilir. Beşinci safhada en sonunda saf alkolden geçirilirse cedar wood oil yerine ksilol (xylol) emniyetle kullanılabilir.

Daimi preparatlar (slaytlar) hazırlanacak ise 60°C de kurutma fırınında 12 saat bekletilir.

Özel haller bahis konusu olduğu taktirde, örneğin çürümüş odundan kesit almada donma mikrotomu ile kesit alınır. Nümuneler kambium tabakası, apikal meristemi, ibre, yaprak vb. dokuları ihtiva ediyorsa kesit almada hücre yapısını bozmamak ve mikrotoma sıkı bir şekilde tesbit edebilmek üzere parafin, selloidin (Celloidin), metakrilat veya diğer sentetik maddelerden faydalanılır. Ancak bu metodların izahı fazla yer alacağı için bu makalede zikredilmekten sarfınazar edilmiştir.

Bununla beraber elde olunacak kesitlerin kalitesini yükseltmek için odun nümuneleri % 2 lik selloidin eriyiği (eşit ölçülerde susuz eter ve metil alkol) her kesit almadan sonra odun yüzeyi üzerine fırça ile sürülmek suretiyle hücrelerin parçalanması önlenebilir. Daha sonra ince selloidin tabakası, kesitlerin aseton içine gömülmesi suretiyle kolayca temizlenebilir. İğne yapraklı ağaç odunlarında ilk teşekkül eden ince ilkbahar odunu traheid çeperlerinin parçalanmaması bu suretle mümkün olmaktadır.

Mantarlar tarafından saldırıya uğramış oduna ait kesitleri boyama, tercihan boyuna kesitlerde suda çözeltiilmiş safranin ile prico-aniline mavisini, kullanılarak yapılmaktadır. Bu suretle ligninleşmiş hücre çeperleri kırmızıya ve mantar lifleri ise açık maviye boyanmaktadır.

Çekme odunu suda çözeltiilmiş safranin ve fast green ile boyanmalıdır. Çinko-klor-iyod çözeltisi jelâtin tabakasını daha belirli bir şekilde boyadığı halde, bu boya ile daimî preparatlar yapmak mümkün olmamaktadır.

Daimî preparatların hazırlanmasında Gliserin - Jelâtin metodu da uygulanır. Bir kısım jelâtin, yedi kısım gliserin ve altı kısım destile su bu maksat için kullanılmaktadır. Erlenmayer içine konulan su ve jelâtin bir saat bekletildikten sonra su banyosunda kaynatılır. Müteakiben üzerine 7 kısım saf gliserin ilâve edilerek karıştırılır. Bozulmaması için içine bir kaç damla asit karbolik (fenol) damlatılır. Daha sonra donar, fakat kullanılacağı zaman ısıtılarak eriyik hâline getirmek lâzımdır. Preparat hazırlanacağı zaman boyanmış olan kesitler lâm üzerine yerleştirilir. Sıvı haldeki gliserin-jelâtin eriyiğinden bir kaç damla damlatıldıktan sonra ısıtılmış lamel kesit üzerine kapatılır. Eriyik soğuyup sertleşinceye kadar bir mandal ile sıkıştırılır ve hava almaması, uzun süre bozulmaması için lâmel etrafına kanada baızamı fırça ile sürülerek hava ile ilişkisi kesilmelidir.

1.2. Maserasyon (dokuyu çözme).

Odunu masere etmek için evvelâ liflere paralel yönde 1-2 cm uzunlukta ve takriben yarım milimetre kalınlıkta parçacıklar hazırlanmaktadır. Bunlar bir tüp içerisine yerleştirilir veya küçük cam bir kaba konur, sonra dokuyu çözücü kimyasal maddeler ilâve edilir. Maserasyon için bir kaç önemli metod burada zikredilecektir.

Metodlardan ilkinde eşit miktarlarda glâsial asetik asit ve hidrojen peroksit ($H_2O_2 = 20$ hacim) karışımı kullanılmaktadır. Odun parçacıkları ve kimyasal madde (hidrojen peroksit) birarada 48 saat $60^\circ C$

de bir kurutma dolabında bekletilir. Derecenin 70°C e çıkartılması ve daha kesif hidrojen peroksit kullanmak suretiyle daha kısa zamanda memnuniyet verici neticeler alınabilir. Tabiatıyla bu süre ağaç türleri ile ilgili olarak 4 - 8 saat arasında değişmektedir. Bu usul *Franklin metodu* olarak bilinmektedir (Tsoumis, 1969).

Diğer metodlar olarak nitrik asit ve potasyum klorat, nitrik asit ve kromik asit, glâsial asetik asit ve sodyum klorit veya perasetik asit ve sodyum asetol ile muamele etme metodları bilinmektedir. Bunlardan en önemlileri şunlardır :

Schultze metodu

Bu en çok kullanılan metodlardan biridir. Odun parçacıkları bir tüp içine konulduktan sonra üzerine bir miktar derişik nitrik asit ile bir kaç potasyum klorat kristali ilâve edilir. Tüp alttan yavaş yavaş ısıtılır. Odun parçacıklarında meydana gelen kırmızimsı renk kayboluncaya kadar beklenir ve sonra su dolu bir kaba aktarılır (Jane, 1956).

Jeffrey metodu

Masere etmek için eşit miktarlarda % 10 nitrik asit ve % 10 kromik asit karışımı kullanılır. İçinde odun parçacıkları bulunan eriyik özellikle bir kurutma dolabında hafifçe ısıtılır ve sonra su içerisine geçirilerek liflerine ayrılır (Jane, 1956).

Bütün metodlarda kimyasal maddelerden arıtma ve su ile yıkama kimyasal muameleyi takip etmektedir. Muamele edilmiş odunsu numuneler daha sonra su içerisine alınır. Takriben bir dakikalık sallama hücrelerin bir birinden ayrılmasına kâfi gelmektedir. Sudan ayırma çok ince tel bir elekten geçirilerek yapılır ve saf alkol içinde saklanır.

Masere edilmiş hücrelerin geçici olarak tetkiki için hazırlanan preparatlar masere edilmiş materyal su içersinde dağıtıldıktan sonra bir kaç damla su ile birlikte lam üzerine yerleştirilir. Üzerine lâmel kapatmağa bâzen lûzum dahi yoktur.

Daimi preparatların (Slayt) hazırlanmasında ise aşağıdaki yol takip edilir. Bir huninin dip kısmı keten filtre kâğıdı ile örtülür ve huni üstten bir cm kalıncaya kadar su ile doldurulur. Sonra bir miktar masere edilmiş madde su içine atılır. Hücreler suyun yavaşça emilmesi ile tedrici olarak dibe çöker. Üzerine diaphone adı verilen sentetik monte maddesi tatbik edildikten sonra lam filtre kâğıdı yüzeyine basılır ve hücrelerin bir çoğu lam üzerine yapışır. Bir iki dakika kadar

açık havada kurutulur ve böylece lâm üzerine sıkı bir şekilde hücreler bağlanmış olur. Diafhone yavaş kuruyan bir maddedir, fakat hafif bir şekilde ısıtılmış kurutma dolabında kurutma çabuklaştırılabilir.

Masere edilmiş hücrelerin boyanması her zaman arzu edilmez. Arzu edildiği zaman masere edilmiş madde üzerine bir kaç damla hematoksin, safranin veya diğer boyalar damlatılır. Daha sonra hücrelerin dehidre edilmesi (suyunun alınması) ve saf alkol içerisinde muhafazası gerekmektedir.

1.3. Mikroskopik ölçmeler

Mikroskop; yıllık halka genişlikleri, yaz odunu hücre büyüklükleri ve çeper kalınlığı, lümen çapı, geçit büyüklüğü vb. gibi çok çeşitli ölçme maksatlarında kullanılabilir. Bu gibi ölçmeleri yapmak için mikroskoptaki oküler içerisine bir mikrometre yerleştirilir. Her hangi bir büyütmede oküler mikrometresindeki bir taksimatın, objektifin altına ve tetkik edilecek objenin yerine yerleştirilen, aralarındaki taksimatın en küçüğü 0,1 mm ve 0,01 mm olan bir başka mikrometrede kaç milimetreye tekabül ettiği hesaplanarak ölçmeler yapılmaktadır (Tsoumis, 1969).

Yıllık halka veya yaz odunu genişliğini tespit etmek için yapılan ölçmelerde ise mikrotom ile ince kesitler almağa lüzum bulunmamaktadır. Bu gibi ölçmeler artım kalemleri veya diğer odun numuneleri üzerinde özel olarak hazırlanmış mikroskoplar kullanmak suretiyle yapılmaktadır. Bazı ağaç türlerinde ilkbahar ve yaz odunu arasında kontrast yaratmak veya yıllık halkaları daha belirgin hâle getirmek numuneleri boyamak lâzımdır. İlk bahar ve yaz odununun genişliğini tefrik etmek ekseriyetle mikroskop ile tetkik edilecek kesitler alındığı zaman dahi güçtür. İğne yapraklı ağaçlar için özellikle çam ve ladinlerde *Mork* tarafından teklif edilen metod uygulanmaktadır (Wiksten, 1945). Buradaki esasa göre trakeidlerde, enine kesitte radyal yönde hücre çeperi genişliğinin iki misli ($2W$), teğet yöndeki hücre lümen genişliğine (2) bölündüğünde çıkan değer 2,0 ve daha fazla ise (yani $L/2W = 2,0$ ve daha fazla) o hücre yaz odunu hücresidir.

Hücre uzunluğu ölçmeleri için de, genellikle hücreler mikroskop ve bir ayna yardımı ile özel bir yere aksettirilmekte ve burada boylar ölçülmektedir. Kısa boylu hücreleri doğrudan doğruya mikroskop altında ölçmek mümkün olduğu gibi, bu maksat için vizopan (Reichert) gibi çeşitli yardımcı âletler kullanılmaktadır. Kaideten hücre boyu masere edilmiş hücrelerde ölçülmektedir. Ancak boyuna kesitler üzerinde de ölçmeler yapmak mümkündür. (Ladell, 1959).

Normal ışık mikroskoplarında mikrofibrillerin özellikle sekonder çeperin orta tabakasında (S_2) hangi açı ile seyrettiğini bulabilmek için ince mikrotomik kesitleri iyot - potasyum iyodür çözeltisi ile boyamak lazımdır. Koyu kahve renkli boyuna yönde yerleşmiş iyot kristallerinin eğimi mikrofibrillere paralel olmaktadır. Fluoresans mikroskoplar yardımı ile ince mikrotomik kesitler almaya luzum kalmadan, örneğin ar-tım kalemlerini uygun floresans maddelerle boyayarak radyal yönlerde, yarılmış yüzeylerde tetkik ve ölçmeler yapmak mümkündür. Bilhassa yumuşak çürüklüğe maruz kalmış yapraklı ağaç odunlarda ve basınç odunu hücrelerinde hücre çeperinin çeşitli tabakalarının durumu da polarizasyon mikroskobu ile tetkik edilmektedir.

1.4. Mikroskoptan Fotoğraf çekme (Fotomikrografi)

Mikroskopik görünümleri daimî olarak saklayabilmek için çizim veya fotomikrografi metodlarını uygulamak lâzımdır. Çizimde mikroskopik görünüm bir kağıt üzerine aksettirildikten sonra şekil çizilmektedir (Michel, 1967).

Fotomikrografi, modern mikroskoplar ve otomatik fotoğraf çekme aletlerinin bir arada kullanılması ile basitleştirilmiş bulunmaktadır. Ancak iyi bir fotoğraf çekebilmek için şu esaslara dikkat ve riayet etmek gerekmektedir. Mikroskobun ayarı, ışığın seçimi, verilecek zaman, film seçimi, baskı kağıdı, kimyasal maddeler ve her şeyden evvel fotoğrafı çekilecek objenin maksadı tam manâsıyla karşılaması lâzımdır.

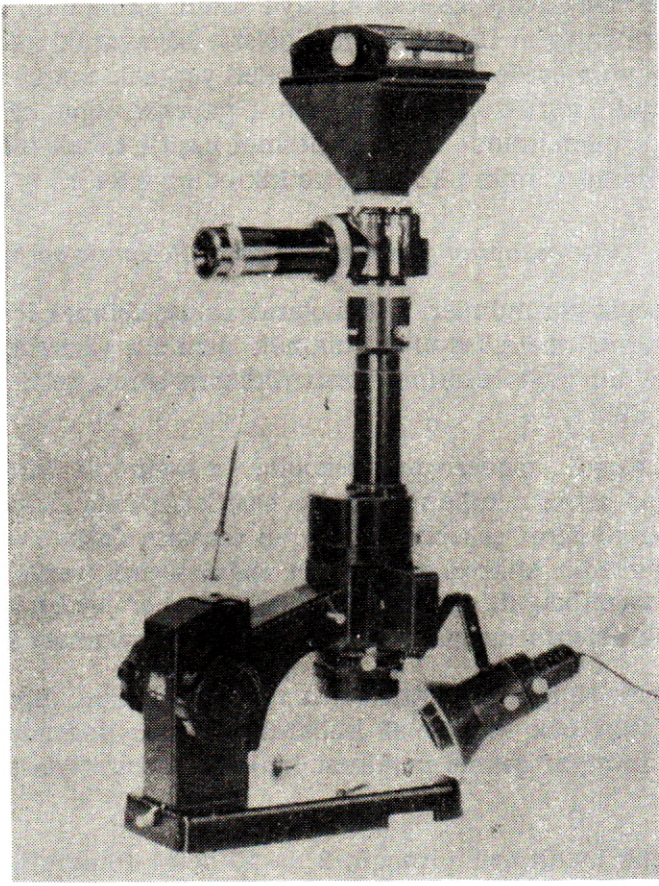
Fotograflar 35 mm lik siyah beyaz veya renkli film, diğer 6 x 9 cm roll filmler, film pak ve camlar kullanılmak veya doğrudan doğruya polaroid bir fotoğraf çekme makinesi kullanmak suretiyle kâğıt üzerine çekilebilir.

Çok küçük büyüttmeli (örneğin 2 ilâ 10 defa) fotoğraflar mikrotomik kesitler alınmadan ve mikroskop kullanılmadan da elde edilebilmektedir. Bunun için iki usul vardır :

1. Mikrotom ile odun yüzeyi düzgünleştirilir veya zımpara kağıdı ile düzgün bir hale getirilir. Böylece hazırlanmış yüzeylerin düşük büyüttmeli fotoğrafları doğrudan doğruya çekilir. Bu maksatla mikrofoto tertibatlı stereoskopik mikroskoplar da kullanılmaktadır (Şekil : 8).

2. Mikrotom ile odun yüzeyi düzgünleştirilir ve numune kurutulur. Sonra bu odun yüzeyi, üzerinde ince $Al_2 O_3$ tozu bulunan bir cam levhaya sürtülmek suretiyle hazırlanır. $Al_2 O_3$ un fazlası yumuşak bir

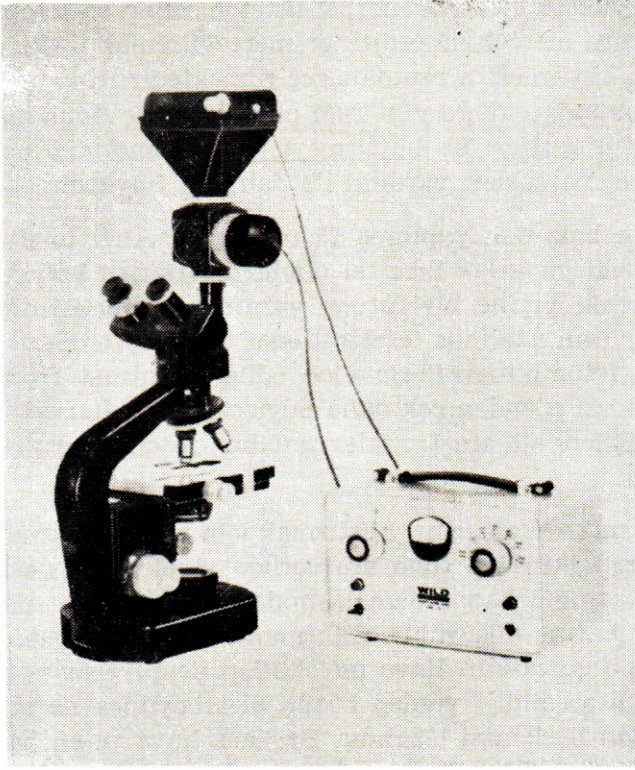
bez parçası ile temizlenir. Toz haldeki Al_2O_3 hücre boşluklarını, reçine kanallarını doldurur ve hücre çeperi çok iyi bir şekilde belirir. Bâzı ağaç türlerinde, meşe, karaağaç gibi, bu muamele ile hücre yapısı daha belirgin hale gelmektedir.



Şekil 8. Mikrofoto tertibatlı bir Stereoskopik mikroskop.

Mikrotom ile alınan kesitler lâm üzerine monte edildikten sonra görüntü doğrudan doğruya fotoğraf kâğıdı üzerine aksettirilir. Ancak bu taktirde elde edilen resimler negatiftir. Ancak yapraklı ağaç odunlarında bu durum memnuniyet verici fotoğrafların elde edilmesine sebebiyet vermektedir. İğne yapraklı ağaçlarda yaz odunu tabakasının açık renkte belirmesi hakikatle bağdaşmadığı için tavsiye edilmemektedir.

Şekil : 9 da otomatik mikrofoto tertibatlı bir araştırma mikroskobu görülmektedir.



Şekil 9. Otomatik mikrofoto tertibatlı bir araştırma mikroskobu.

2. Elektron Mikroskopisi

Elektron mikroskop odunun ultrastrüktürel yapısının tetkiki için yegâne âlettir. Elektron mikroskoplar, ışık mikroskoplarının ortaya çıkaramadığı özellikleri, objeyi 200,000 defaya kadar büyütme suretiyle incelemek fırsatını vermektedir. Işık mikroskoplarında en yüksek büyütme 2000 defadır. Mikroskoplar arasında mukayese yapabilmek için ayırma gücü (resolving power) denilen ve bir birine çok yakın iki noktayı birbirinden ayırabilme kabiliyeti hakkında bilgi sahibi olmak gerekmektedir. Işık mikroskopunda ayırma gücü, takriben 0,275 mikron (2750 Angstrom) iken elektron mikroskopta 5 Angstroma kadar yükselmektedir. İnsan gözünün ayırma gücü ise 25 ilâ 100 mikron (250000 - 1000000 Angstrom) arasında bulunmaktadır.

Elektron mikroskopunun ışık kaynağı bir elektron ışığıdır. Bu ışın «V» şeklinde bükülmüş ve elektrikle ısıtılarak akkor haline gelmiş saf bir tungsten telden neşredilmektedir. Bir çok mikroskopta 50 ve 100 bin Volt gibi yüksek elektrik enerjisi ile elde edilen elektronlar kondansör, objektif, ara mercek ve projektör merceği olmak üzere çeşitli manyetik mercek sistemleri arasından geçirilmektedir. Kondansör merceği ışık mikroskopunda olduğu gibi ışığı obje üzerinde toplamağa yardım eder. Objektifin vazifesi ilk büyötmeyi temin etmek olup görüntü ara ve projeksiyon mercekleri yardımı ile daha da büyütölmektedir.

Genellikle bakırdan yapılmış 75 mikron açıklığı hâvi ve takriben 3 mm çapındaki yuvarlak ince tel bir levha üzerine konulan obje, objektifin altındaki yerine bir tutucu yardımı ile yerleştirilir. Görüntü fluorasans bir cam üzerinde teşekköl eder. Bunun fotoğrafı da alınabilir. Elektron fotomikrograflarla elde edilen kontrast fluoresans cam üzerinde teşekköl edenden çok daha büyüktür. Bundan dolayı ultrastü-rüktürel özelliklere ait araştırmalar tercihan fotomikrograflar üzerinde yapılmaktadır.

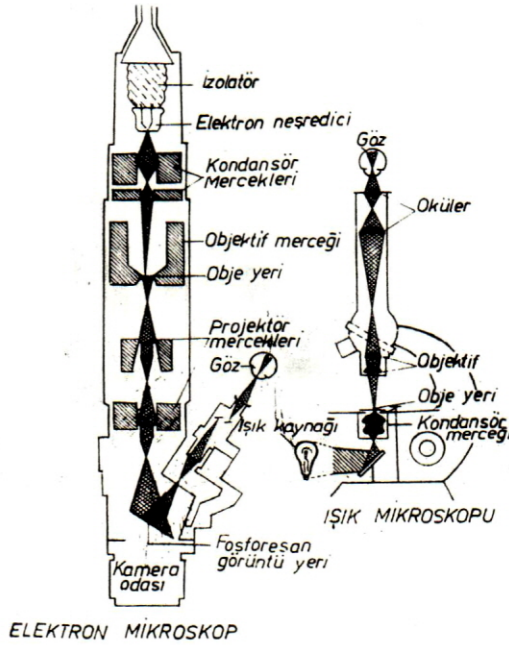
Elektron mikroskoplarını çalıştırmak için vakum (hava boşluğu)na ihtiyaç vardır. Mikroskop tübü adı verilen ve elektron neşredilen yerden fotoğraf camına kadar olan kısımda takriben 10^{-4} mm (0,1 mikron)ye kadar basınç düşürölür. Çalışmanın devamlı olarak vakum altında yapılması gereklidir. Hava molekölleri ile çarpışmanın olmaması, elektronların neşredildiğı yerden bütün âlet boyunca hava molekölleri ile çarpışmadan ilerlemesi lâzımdır. Başkaca hava ve su buharı tungsten telinin tahrip edilmesine yol açarlar. Bu itibarla vakum pompası elektron mikroskopun ana kısımlarından birini teşkil eder (Tsoumis, 1969).

Şekil : 10 bir elektron mikroskop ile ışık mikroskopunu şematik olarak, Şekil: 11 ise bir elektron mikroskopunun resmini göstermektedir.

2.1. Numune hazırlama

Elektron mikroskopta numunelerin uygun bir şekilde hazırlanması esas problemi teşkil etmektedir. Işık mikroskopunda olduğu gibi, görüntü ve fotoğrafların kalitesi numunelerin kalitesi ile doğrudan doğruya ilgilidir. Elektron mikroskop incelemelerinde numune hazırlamada, kesit alma ve yüzey replika (surface replica)lar olmak üzere iki esas metod kullanılmaktadır. Hücre çeperi tabakaları kalınlığı, geçit boşluklarının büyüklüğü, sigilli tabakanın tetkiki ve ölçölmeleri, hücre

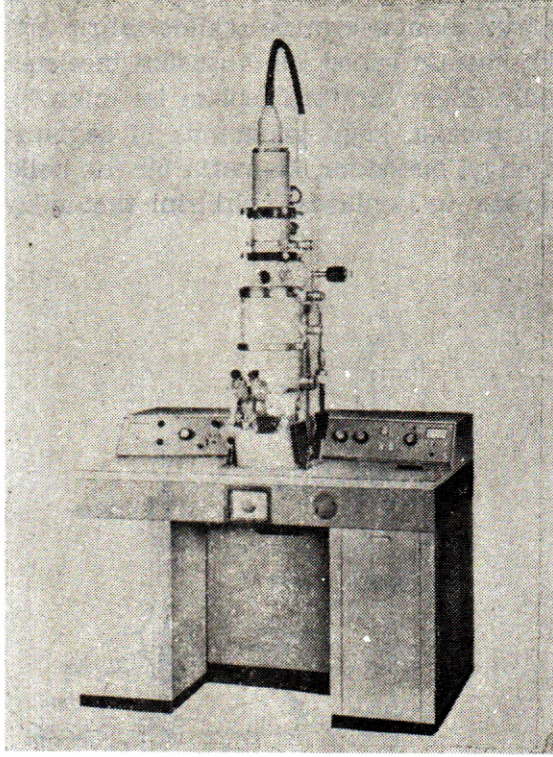
çeper tabakası lâmeleri, geçit zarlarının yapısı, kimyasal muamelelerin etkisi, hücre çeperini mantarların ne şekilde tahrip ettiği, çekme odununda jelâtin tabakasının yapısı v.b. hususları incelemek için kesit almak gerekmektedir. Diğer taraftan replika ise mikrofibriller, geçit zarının yapısı, siğilli tabaka, kâğıt yapımında lif bağlanması v.b. hususların tetkiki için en iyi metoddur. Mamafih bir çok hallerde her iki metod da kullanılmakta ve bunlardan birbirini tamamlayıcı olarak faydalanılmaktadır.



Şekil 10. Elektron ve Işık mikroskoplarının şematik görünüşü.

Kesit alma

Kesit alma ışık mikroskopisinde numunelerin hazırlanması için kullanılan standard metodun bir benzeridir. Fark sadece elektron mikroskopta incelenecek kesitlerin 0,1 mikrondan da ince olmalarıdır. Bir çok maksat için bu kalınlık 600 - 900 Angstrom (0,06-0,09 mikron)dur. 1500 Angstrom (0,15 mikron)dan kalın kesitler, elektronların daha az nüfuz edebilmeleri dolayısıyla elektron mikroskop için çok kalındır.



Şekil 10. Bir Elektron mikroskopunun genel görünüşü.

Kesit almada kullanılan odunsu örnekler, genellikle hava kurusu halde ve 1,0 cm uzunluk ile 0,5 mm $\times$ 0,5 mm enine kesitinde kısa kibrit çöpü şeklinde bulunmaktadır. Bu numunelerin enine kesiti yıllık halkalara dik, radyal ve teğet yönde olabilir. İlk bahar ve yaz odunu arasında özgül ağırlıkta belirli bir fark bulunan numunelerde kesit almayı kolaylaştırmak için bu dokuların ayrılması uygun olmaktadır. Kesit almak için odunsu nümune esas itibariyle metakrilat veya epoksi reçinelerden Araldit, Epon gibi maddeler içerisine gömülür. Kesitler bir ultramikrotom yardımı ile elmas veya cam bıçakla alınır. Cam bıçaklar hem ucuz, hem de bazen daha memnuniyet verici neticeler vermektedir. Ancak uzun zaman kullanılmazlar ve bunların hazırlanması özel bir maharet istemektedir. Kesitler şerit halinde olup bir büyüteç ile tetkik edilebilir. Kesitler daha sonra önceden üzerine selloidin, Polivinil formal (formvar) veya karbon sürülmüş bakırdan delikli bir levha üstüne yerleştirilir. Delikli bakır levhaların en iyilerinin seçimini faz kontrast mikroskopta yapmak çok faydalıdır.

Replikaların hazırlanması

Replikalar, numunenin yüzeyinin topoğrafik yapısını tam bir şekilde üzerine alarak elektron geçiren materyale ait çok ince levhalardan müteşekkildir. Odunsu nümuneler için aşağıda izah edilen metod uygulanmaktadır. Replikanın esas anlamı kopya olup replika yapmak, her hangi materyalin yüzeyinin kopyasını çıkarmak demektir.

Replika yapılacak yüzey ya yarılmak ya da radyal veya teğet yönlerde odunsu materyali mikrotomla kesmek suretiyle hazırlanır. Takriben 1 cm² lik replika alanı verecek olan ve 1 mm kadar kalınlıktaki nümune tam kuru hale gelinceye kadar kurutulur. Ancak nümunenin herhangi bir yabancı madde ile kirletilmemesi gerekmektedir. Sonra nümune bir buharlaştırma ünitesi içerisine yerleştirilir. Burada önce 10 Angstrom kalınlıkta plâtin tabakası nümune üzerine çökertilir. Müteakiben de 200 Angstrom kalınlıkta karbon tabakası püskürtülür. Bundan sonra en uygun olarak şu metod kullanılabilir :

Nümune buharlaştırma ünitesi içinde iken ince polistiren yuvarlak bir levha hazırlanır. Plâtin ve karbon ile örtülmüş odun yüzeyi bu polistiren levhaya bastırılırken, bir taraftan da sıcak bir plâka üzerinde polistiren levhanın yumuşaklığını muhafaza etmesi sağlanır. Polistiren soğutulup sertleştikten sonra % 72 lik sülfirik asit içine yerleştirilir, müteakiben odun ihtiva eden kısmın % 10 luk nitrik asit ve % 10 luk kromik asitte veya % 2 lik sodyum klorit içinde bekletilmesi hücrelere ayrılmasını sağlar ve geriye plâstik maddeye bağlı replika (odunsu yüzeyin kopyası) kalır. Replika 3 mm² lik kısımlara ayrılır ve etilen diklorür içine yerleştirilir. Replikalar dikkatli bir şekilde tekrar yeni etilen diklorür eriyiğine geçirilmek suretiyle yıkanır ve delikli bakır levhalar üzerine alınarak tetkik için hazır bir duruma gelmiş olur.

Mikroskop tekniğine ait diğer metodlar

Normal ışık ve elektron mikroskopisinden başka odunun mikroskopik ve ultura mikroskopik yapısını tetkik etmek üzere daha başka metodlar vardır. Örneğin; polarizasyon, fluoresans, faz kontrast, kızıl ötesi spektrofotometresi, X - ışını, scanning mikrofotometri v.b. gibi diğer metodlar modern bilimsel araştırmalarda kullanılmaktadır. Ancak daha önce de belirtildiği üzere burada maksat bu hususta genel bir anlam kazandırmaktır. Bu itibarla bu metodlar ayrı makalelerde incelenecektir.

L İ T E R A T Ü R

- BOZKURT, A.Y. : 1966. Belgrad Ormanı'nda önemli bazı ağaç türlerinde yıllık halka gelişimi üzerine araştırmalar. Or. Gen. Md. Yay. No. 437/11.
- F.P.R.L. : 1956. The preparation of wood for microscopic examination. Forest Products Research Laboratory Leaflet No. 40.
- JANE, F.W. : 1956. The structur of wood. Adam and Charles Black, London.
- LADELL, S. L. : 1959. A new method of measuring tracheid length. Forestry, 32. pp. 124 - 125.
- MICHEL, K. : 1967. Die Mikrophotographie. Springer - Verlag Wien - New York.
- NEEDHAM, G.H. : 1958. The practical use of the microscope. Charles C. Thomas. Publisher. Springfield. Illinois. USA.
- RICHARDS, O. W. : 1949. The effective Use and proper care of the microtome. American Optical Company. New York.
- TSOUMIS, G. : 1969. Wood as raw material. Pergamon Press.
- WIKSTEN, A. : 1945. A method of measuring spring wood and summer wood in the annual ring. Medelanden Fran Statens Shogsförsöksanstalt. Häfte, 34. Nr. 9.

BROŞÜRLER

- REICHERT : Directions for using the Reichert microtomes C. Reichert Optische Werke A.G. Wien XVII, Hernalserstr. 219.
- SHANDON - ELLIOTT : Automatic microtome knife sharpener, Mk. II. Shandon Scientific Company Limited. 65 Pound Lane, Willesden, London NW 10.
- WILD : Wild M 4 und M5 Stereoscopic micsoscope - Micro - photoautomate. Wild Heerbrugg Limited, Heerbrugg/Switzerland.
- ZEISS : Microscopy from the very beginning by F.K. Möllring. Carl Zeiss, Oberkochen/West Germany.