

BUĞDAYDA MEİOSIS İÇİN SİTOLOJİK TEKNİKLER

Sevim SAĞSÖZ (1)

GİRİŞ

Buğday, insan beslenmesinde en başta gelen tarım bitkisidir. Bugüne kadar dünyanın hemen bütün ülkelerinde bu bitki üzerinde ıslah çalışmaları yapılmıştır ve yapılmaktadır. Islah çalışmalarına ışık tutan sitolojik çalışmalar buğdayda geniş çapta uygulanmaktadır. Özellikle meiosis bölünme devrelerinin incelenmesi ile birçok sorunlar çözüm bulmaktadır. Bu bölünmenin devrelerinin incelenmesi ve zaman kaybına meydan vermeden kısa zamanda çok sayıda materyalle çalışmak amacı ile birçok yöntemler denenmektedir. A. B. D.'de çalıştığımız laboratuvarında kullandığımız ve aşağıda anlatılacak yöntemler yalnız buğdayın değil aynı zamanda birçok buğdaygil bitkisinin meiosis bölünmelerinin incelenmesinde kullanılabileceğini de belirtmekte yarar vardır.

Tarla koşulları, iyi özellikte örnek almak için her zaman uygun olmadığından sitolojik örnekler alınan bitkilerin mümkün olduğu kadar uygun seralarda ve büyütme kabinlerinde yetiştirilmesi istenir.

Sitolojik çalışmalar için uygun örneklerin elde edilmesinde aşağıdaki koşullar gereklidir.

(1). Yeterli ışık- Kışın ve erken ilkbaharda seralarda ilâve ışıklandırma kullanılmalıdır. Büyütme kabinlerinde 16 saat ışıklandırma 8 saat karanlık periyotlar uygulanır.

(2). Özellikle örnek alma zamanlarında yeterli rutubet bulunmalı. Bu zamanda bitkilerin kurummasına ön vermemelidir.

(3). 20-25°C arasında değişen orta bir hava sıcaklığı. Yüksek suhunet zayıf boyanmaya, kromozomların bir araya kümelenmesine ve birbirlerine yapışmasına neden olur. Düşük suhunet meiosis durdurabilir.

Örnek alma devresinde ve bu devreden hemen önceki devrede rutubet ve sıcaklığa çok dikkat edilirse zayıf numuneden dolayı mikroskop çalışmalarında boşuna zaman harcama önlenmiş ve zamandan tasarruf edilmiş olunur.

Bununla beraber, optimum koşullar altında bile genetik yapıdan dolayı

(1) Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü Öğretim Üyesi.

farklı orijine sahip materyallerde sitolojik kalite yönünden farklılıklar bulunabilir. Genellikle ilk sürgünler sonra gelişen sürünlere nazaran daha iyi örnek verirler.

Bunun yanında ilk sürgünleri kesip büyük bir saksıya almak suretiyle çok iyi gelişen genç sürgünler elde edilebilir.

Meiosis İçin Örneklerin Alınması ve Başakların Fiksasyonu:

Meiosis için örnekler, başaklar kının içinde bulunduğu devrede alınmalıdır. Meiosisün vuku bulunduğu devrede kın içindeki başağın durumu farklı materyallere ve çevre koşullarına göre değişir. Genel olarak, kının üst internodunun uzamasından sonraki devreye, yani bayrak yaprağın ikinci yaprağın yukarısından belirli bir uzaklıkta bulunduğu devreye kadar başak örnek için uygun devrede değildir. İlk sürgünlerde, başağın ikinci nodun üzerinde veya hemen aşağısında bulunduğu devre en doğru devredir. Bununla beraber geç sürgünlerde veya uygun olmayan şartlar altında başak, ikinci internoddan daha aşağı bir pozisyonda olgunlaşır. En iyisi, herhangi bir materyalde doğ-

ru devreyi saptamak için birkaç başlangıç materyalini incelemektir.

Kural olarak tüm başak fikse edilir. Fakat, çok iyi yayılmanın istendiği kritik çalışmalarda yalnız anterler fikse edilebilir. Meiosisün devresi bir anterden anlaşıldıktan sonra diğer ikisi fikse edilebilir. Fiksasyon Farmer eriyiğinde (3 kısım % 95'lik etil alkol: 1 kısım glasiyal asetik asit) yapılabilir. Bununla birlikte eğer hergün çok sayıda örnek alınabiliyorsa bu yöntem uygun değildir.

Tüm başaklar taze Carnoy solüsyonunda (6 kısım % 95'lik etil alkol, 1 kısım glasiyal asetik asit, 3 kısım kloroform) fikse edilir. Smith (1947)'e göre bu yöntem, buğdayda kromozomların en çok kısaldığı devre için en fazla memnuniyet verici bir fixativ olduğu kabul edilir.

Derin dondurma sıcaklığında (-15°C) örnekler Carnoy fixativinde birkaç yıl saklanabilir. Numuneler, fixasyon ve sertleşme işlemlerinin tamamlanmasından emin olunmak için preparat yapımından veya düşük sıcaklıkta depolamadan önce en az 24 saat oda sıcaklığında tutulurlar.

ASETOKARMINLE PREPARATLARIN YAPILMASI

Asetokarmin boyama solüsyonu :
% 2'lik asetokarmin demirsiz kullanılır.

Boyayı hazırlamak için 2 gr. karmin boyası 100 ml. % 45'lik asetik aside ilâve edilir (glasiyal asetik asid % 100'lüktür ve distile veya musluk suyu ile seyreltilebilir). Isıtıcı üzerinde asetokarmin bulunduran küçük şişe ile geriye

akan kondansatör çalıştırılır. Kondansasyon başladıktan sonra 2 saat kadar ısınmaya devam edilir. Solüsyon ılıncaya kadar bekletilir ve ince filtre kağıtlarından süzülür.

Eğer dönüşlü kondansatör mevcut değilse aşağıdaki işlem uygulanır: Pyrex beherglass içinde 50 ml. glasiyal asetik asid kaynayıncaya kadar ısıtılır. 2

gr. karmin ilâve edilir. Hafifçe kaynar-ken bir veya iki dakika karıştırılır (Bu işlem uzatılmaz, boyanın aside oranı değişecektir). Beherglas ateşten kaldırılır. Solusyon 50°C ye kadar soğutulur. 50 ml. distile veya musluk suyu ilâve edilir. Serinletilir ve filtre edilir. Eğer kromozomlar yeteri kadar boyanmıyorsa az bir miktar demir ilâve etmek gerekli olabilir (Doyurulmuş ferrik asetat solusyonundan birkaç damla damlatılır). Bu solusyon bir gece kaldıktan sonra filtre edilebilir.

Her iki yöntemle elde edilen solusyonlar gerekli ise % 45'lik asetik asit ilâvesi ile seyreltilebilir. Eğer boya bir süre depolandıktan sonra çökelti meydana getirirse bu çökteleri gidermek için solusyon filtre edilir. Kullanılmayan solusyonlar ağzı kapalı şişeler içinde buz dolabında saklanır.

Preparatların Hazırlanması:

1. Bir petri kutusuna % 70'lik alkolden bir miktar dökülür ve buğday başağı tüpten alınarak buraya aktarılır. En fazla olgunlaşmış başakçıklar tahminen uçtan itibaren üçte birlik kısmında bulunur. Uçtan aşağıya doğru inildikçe başakçıklar daha genç devrelerde dir.

Her başakçık genellikle dört çiçeğe sahiptir. Birinci çiçek en ileri gelişme durumundadır. Sırasıyla 2., 3. ve 4. çiçekler bunu takip eder. En iyi preparatlar 1. ve 2. çiçeğin erkek organlarından elde edilir. Fakat, eğer bunlar çok ileri devrelerde iseler 3. çiçekte kullanılabilir.

2. Çiçeklerde bulunan üç anteri ayırmak için paslanmaz çelikten yapılmış olan ok uçlu iğne ve ince parçala-

ma iğnesi kullanılır. Sonuncu iğne yardımı ile bir miktar demir temin edilir. Bu çalışmaya yeni başlayanlar preparatları hazırlarken tek bir anter kullanmalıdır. Böylece eğer uygun bir devre bulunursa herhangi bir teknik hata ortaya çıkması halinde diğer ikisi kullanıma hazırdır. Ehil olanlar preparat hazırlanmasında bir çiçeğin üç anterini de kullanabilirler.

3. İğne ile bir anter alınır ve temiz bir lam üzerine damlatılan aseto karmine taşınır. Anteri kesmek için ok uçlu iğnenin kenarı kullanılır. Eğer lam üzerine çok fazla boya damlatılırsa hücreleri didip dışarı çıkarmak çok zor olur ve gözlem esnasında çok fazla hareket vardır.

4. Uygun bir meiosis devresinin bulunup bulunmadığını saptamak için lamel kapatılmadan solusyondaki hücreler mikroskopun en küçük objektifi (10x) (Solusyonla temas edeceğinden büyük objektif kullanılmaz) ile incelenir. Eğer uygun bir devre değilse lam üzerindeki boya yumuşak bir bez yardımı ile temizlenir ve başka bir çiçek denir. Eğer uygun bir devre bulunursa kesilen anterlerin içindeki hücreler iğne yardımı ile dışarı çıkarıldıktan sonra anter duvarının dışını oluşturan kısımlar pens yardımı ile uzaklaştırılır. Eğer boya ilave etmek gerekiyorsa bu işlem hücreleri zedelemeyecek şekilde dikkatli olarak yapılmalıdır. Önce lamelin bir kenarı boya damlası ile temas edecek şekilde başlanarak yavaşça bütün damlayı kapatacak şekilde yerleştirilir.

5. Preparat alkol veya havagazi alevinde dikkatli olarak ısıtılır (kaynama hücreleri zedeler). Preparat ku-

rutma kağıdı arasına yerleştirilir, lamelin bulunduğu kısma parmakla yavaşça bastırılır. Lamelin veya hücrelerin kayıp zedelenmemesinden emin olmak gerekir. Daha sonra mikroskop altında incelenir. Preparat genellikle bir kaç defa ısıtılır. Kromozom ve sitoplazma arasında görülen kontrastın daha fazla oluşmadığı devreye kadar ısıtmaya ara ara devam edilir, bu ısıtma sonunda mikroskopta preparatın durumu incelenir.

6. Preparatlar hazırlandığı gibi incelenebilir. Çünkü bir bitkinin tanımlanması için geçen zamanda hemen kurumazlar. Aynı şekilde, preparatları devamlı hale getirmeden önce, fotoğrafları çekilecekleri çekmek en iyisidir.

Taze hazırlanmış preparatlarda immersion yağı kullanılırsa, yağın lamel altına geçmemesine özen gösterilmeli ve Sel Pak temizleme kağıtları ile hafif hafif değip kaldırarak temizlenmelidir.

7. Bir numuneyi bitirdikten sonra farklı bir bitki ile çalışmak istenirse petri kabı çalkalanarak önce çalışılan bitki artıkları uzaklaştırılır ve taze % 70'lik alkolden dökülür. Örnekler değiştirilirken % 70'lik alkol ile nemlendirilmiş yumuşak bir bez yardımı ile iğneler temizlenir.

Devamlı Preparatların Yapılması:

Çok sayıda örnek ile çalışırken kullanılması kolay olduğundan devamlı preparatların yapılması için *Venetion turpentine mounding medium* (Wilson 1945) kullanılır. Bu yöntemin tek noksan tarafı solusyonun sertleşmesi için birkaç haftaya ihtiyaç duyulmasıdır. Bu nedenle kuruyuncaya kadar her hafta bir kere kontrol edilmeleri gerekir.

Devamlı preparat yapımında kullanılan bu yöntem kromozom boyamasını bozduğundan asetorcin ile kullanılamaz.

Devamlı preparat yapımında kullanılan yapıştırıcı ortam aşağıdaki şekilde hazırlanır:

Propionic acid	: 35 cc
Venica turpentine	: 25 cc
Phenol crystals	: 50 cc
Acetic acid	: 10 cc
Su	: 20 cc

Venica turpentin, propionic aside ilave edilir ve karıştırılır. Buna phenol kristalleri, asetik asid ve su ilave edilir. Eğer gerekirse daha konsantre duruma getirmek için ısıtılabilir.

Taze hazırlanmış preparatlarda lamelin bir kenarına hazırlanan ortamdan bir damla ve karşı kenarına bir damla asetokarmin uygulanır. Boyanın bulunduğu tarafa 2,0-2,5 cm² büyüklüğünde kurutma kağıdı parçalarından 2-3 tane yerleştirilir ve üzerine ağırlık olarak büyük bir lastik tıpa konur.

Kullanılan sabitleştirme ortamının boyanın yerini alıp almadığını görmek için preparatlar birkaç kez kontrol edilir. Preparatlar sertleşmeden önce çok dikkatli olarak kullanılabilir. Immersion kullanılırsa Sel Pak kağıdı ile temizlenir.

Preparatların Saklanması:

Kalın ve sert mukavva ve flaster band yardımı ile hazırlanan koruyucular içinde preparatlar saklanabilir. Bu preparat taşıyıcılar istenilen ölçülerde yapılabilir. En uygun ölçü 6x2 cm. büyüklüğünde 10 preparat taşıyabilmektedir.

LITERATUR

Smith, Luther., 1947. The acetocarmine smear technic. *Stain Technology*, 22:17-31.

Wilson, G. B., 1945. The Venetion turpentine mounting medium. *Stain Technology* 20: 133-135.