

KATI BESİ YERLERİNDE FUNGAL GELİŞMENİN İNCELENMESİ VE FOTOĞRAFLARININ ÇEKİLMESİ İÇİN BİR YÖNTEM

M. Timur DÖKEN (1)

ÖZET

Geliştirilen bu yöntem selefyon kültür tekniğinin uygun bir boyama ile birleştirilip, takiben süreli preparatlarının hazırlanmasıdır. *Colletotrichum atramentarium* (B. et Br.) Taub., *Rhynchosporium secalis* (Oudem.) J.J. Davis fungus'ları uygun bir besi yeri üzerine yerleştirilen selefyon diskler üzerinde gelişmeye bırakıldı. Daha sonra belirli aralıklarla alınan selefyon diskler, üzerlerindeki fungus ile birlikte periyodik asit Schiff yöntemi veya analin mavisi ile boyanıp, etil alkol serisi ve xylol den geçirildikten sonra Kanada balzamu, Euparal veya Entellan kullanılarak süreli preparatları yapıldı. Bu yöntem fungus'ların katı besi yerinde gösterdikleri gelişmeyi incelemede ve bunların fotoğraflarının çekilmesinde çok iyi sonuç vermektedir. Ayrıca süreli preparatlar bir referans materyali olarak da saklanabilmektedir.

GİRİŞ

Besi yerlerinde gelişme niteliğine sahip fungus'ların burada gelişme durumları, çukur lamda asılı damla yöntemi ile veya doğrudan doğruya lam üzerine alınan bir kısım koloni parçasında incelenebilir. Çukur lamda asılı damla yönteminde boyama yapılamadığından bilhassa renksiz olanların görülebilmesi ve fotoğraflarının çekilebilmesi son derece güç olmaktadır. Diğer taraftan lam üstüne alınan fungus burada boyanabilmesine rağmen fungus'un besi yerinden alınıp lam üstüne aktarılırken doğal gelişme durumunun bozulması büyük bir mahsur oluşturmaktadır. Bu bakımdan daha iyi bir yönetime ihtiyaç duyulmaktadır.

Bazı fungus'ların besi yeri üstüne konulan selefyon kağıtlar üzerinde gelişebildiği çeşitli araştırmacılar tarafından belirlenmiştir. Nitekim Schmiedeknecht (1956), *Colletotrichum atramentarium* (B.et. Br.) Taub'un agar ortamı üzerine yapıştırılan selefyon kağıtta geliştiğini saptamıştır. Diğer taraftan fungus'ların selefyon kağıt

(1) Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Doçenti.

üzerinde geliştirilip süreli preparat durumuna getirilmesi Jones (1956) ve Atkinson (1967) tarafından önerilen bir yöntemdir.

Bu çalışmada amaç fungus'un besi yeri üstündeki selefon kağıtta geliştirilmesi tekniğinin uygun bir boyama yöntemi ile kombinasyonu ve takiben selefon kağıtla birlikte fungus'un süreli preparatının yapılmasıdır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Bu çalışmada test materyali olarak *C. atramentarium* ve *Rhynchosporium secalis* (Oudem.) J.J. Davis fungus'ları kullanılmıştır.

Piyasadan temin edilen selefon kağıtlar, üzerlerinde bulunabilecek kimyasal maddelerden arındırılmak amacıyla yarım saat kaynatıldıktan sonra bir cam levha üstüne serilerek kurutuldular. Bu kağıtlardan 1 cm çapındaki mantar tıpa delicisi ile kesilen selefon diskler içine rutubet girmeyecek şekilde etrafı alüminyum kağıtla iyice sarılmış olan petri kabı içinde otoklavda sterilize edildiler. Selefon diskler steril bir pens ile teker teker alınıp petri kaplarındaki katı besi yeri üstüne altında hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirildiler. Burada fungus'un gıda isteklerini karşılayan besi yeri kullanıldı. Ancak işlemler süresince dışarıdan bulaşabilecek mikroorganizmaların daha süratli gelişip aşıladığımız fungusun gelişmesini bastırabilme tehlikesini azaltmak amacıyla besi yerindeki gıda maddeleri oranları belirli düzeyde düşürüldü. Şöyleki *C. atramentarium* için patates deskroz agarı (PDA) 1 PDA: 4 SA (su agarı) oranında ve *R. secalis* için lima fasulyesi agarı (LBA) 1 LBA: 3 SA oranında su agarı ile karıştırılarak hazırlandı. Aşılama işleminde mikro pipetin her damlasında 10-15 konidi olacak şekilde ayarlanan spor süspansiyonlarından her selefon diske bir damla damlatıldı. Her fungus için ayrı ayrı hazırlanan petri kapları bunların en iyi geliştiği sıcaklık derecesine (*C. atramentarium* için 26°C *R. secalis* için 17°C) ayarlı inkubatörlere konuldu. Bundan sonra belirli aralıklarla selefon diskler steril bir pens ile dikkatlice besi yerinden alınarak fikse edilmek üzere FAA içine konuldular. Buradan alınan selefon diskler üzerlerinde bulunan fungus'un boyanması için aşağıda gösterilen boyama yöntemlerinden birisinden, süreli preparatları yapılmak istenenler de boyamayı takiben üstlerindeki suyun ve sonra da alkolün alınması için alkol ve xylol serilerinden geçirildiler. Son olarak xylolden alınan her bir selefon disk üstüne damlatılan Euparal, Kanada balzamu veya Entellan içine yatırılıp, üzerleri lamel ile kapatılarak süreli preparat durumuna getirildiler. Periyodik asit Schiff yöntemi ile boyananların fotoğraflarının çekilmesinde yeşil filitre kullanıldı.

Analin mavisi Yöntemi

Süre

1. Analin mavisi 15 dk
2. Damıtık su Fazla boya akıtılıncaya kadar

Periodik asit Schiff Yöntemi

1. Periodik asit (% 1) 5 dk
2. Damıtık su 5 dk
3. Decolorised bazik fuksin 5 dk
4. Potasyum metabisulfit(% 10) 5 dk
5. Damıtık su..... 5 dk

Suyun ve alkolün alınması

1. Etil alkol (% 40) 5 dk
2. Etil alkol (% 70) 5 dk
3. Absolut etil alkol 5 dk
4. Absolut etil alkol + Xylol (1:1) ... 10 dk
5. Xylol 10 dk
6. Xylol 10 dk

FAA 90 ml % 50 etil alkol + 5 ml glasiyal asetik asit + 5 ml formalin (Purvis ve arkadaşları, 1963); Analin mavisi eriği 1 gr analin mavisi + 100 ml % 85 etil alkol (Vardar, 1962) terkininde hazırlandı. Periodik asit Schiff Preece (1959) 'un geliştirdiği bir boyama yöntemidir.

SONUÇLAR ve TARTIŞMA

C. atramentarium, *R. secalis* besi yerleri üstüne yapıştırılan sefyon diskler üzerinde normal bir gelişme göstermiştir. Konidi'lerin çimlenmesi ile başlayan gelişme süreçleri içindeki çeşitli dönemlerde alınan örneklerin boyanıp incelenmesi sonucu bu fungus'ların besi yerlerinde gösterdikleri gelişmenin her kademesini kolayca ve net olarak takip edilebileceği ve incelenebileceği görülmüştür. Analin mavisi ile boyananlarda renk mavi, Periodik asit Schiff yöntemi ile boyama sonucu renk kırmızı olmaktadır. Her iki boyamada da sefyon disk biraz boyanmakta ise de fungus'ların çeşitli organları hemen hemen aynı düzeyde sefyon diskten çok daha koyu bir renkte boyanmaktadır. Periodik asit Schiff boyama yöntemi daha iyi sonuç vermektedir. Her iki boyama sonucu hazırlanan süreli preparatların fotoğrafları net olarak çekilebilmekte, ancak Periodik asit Schiff ile kırmızıya boyanan fungus'un yeşil filitre ile çekilmesi çok daha iyi sonuç vermektedir.

Geliştirilen bu yöntem fungus'ların katı besi yerlerinde gösterdikleri gelişmenin net bir şekilde fotoğraflarla tespit edilmesine ek olarak süreli preparat durumunda her zaman için incelenebilecek bir referans materyali olarak saklanabilmesini de sağlamaktadır. Bu yöntemin besi yerlerinde gelişme gösterebilen diğer fungus'larda da uygulanabileceği sanılmaktadır.

SUMMARY

A METHOD FOR OBSERVING AND PHOTOGRAPHING THE DEVELOPMENT OF FUNGI ON SOLID MEDIUMS

The method described is the combination of a cellophane culture technique with a staining method and then the preparation of permanent mounts. The fungi *Colletotrichum atramentarium* (B. et Br.) Taub., *Rhynchosporium secalis* (Oudem.) J.J. Davis are grown on cellophane discs placed on a suitable medium. Then the cellophane discs with their fungus colony are carefully lifted from the surface of the medium and stained with Periodic acid Schiff method or anilin blue. For the preparation of permanent mounts they are passed through graduated series of ethyl alcohol and transferred to xylol. Then they are mounted on microscope slides in Canada balsam, Euparal or Entellen.

This technique permit the preparation of permanent mounts retaining diagnostic characteristics of spore stages and mycelium besides giving an opportunity of observing and photographing the development of a fungus on culture mediums.

LİTERETÜR LİSTESİ

- Atkinson, R. G., 1967. Preparation of permanent mounts of fungus cultures on cellophane. In Sourcebook of Laboratory exercises in plant pathology. W. H. Freeman and company. San Francisco and London, 86-87.
- Jones, W., 1956. Permanent mounts of fungus cultures on cellophane. *Phytopathology* 46: 131-132.
- Preece, T. F., 1959. A staining method for study of apple scab infections. *Plant Pathol.*, 8: 127-129.
- Purvis, M. J., D. C. Collier and D. Walls, 1966. *Laboratory Techniques in botany.* Butterworths, London, 439 pp.
- Schmiedeknecht, M., 1956. Untersuchung des parasitismus von *Colletotrichum atramentarium* (B. et Br.) Taub. an Kartoffelstauden (*Solanum tuberosum* L.). *Phytopath. Z.* 26: 1-30.
- Vardar, Y., 1962. Botanikte preparasyon tekniği. Ege Üniversitesi Matbaası, İzmir, 66 pp.