

## Bitki Anatomisi Çalışmalarında El Kesitleri İçin Yeni Boyama Yöntemi

Bahattin BOZDAĞ, Okan KOCABAŞ, Yurdanur AKYOL, Canan ÖZDEMİR

### ÖZ

Bu çalışmada alkol ile fikse edilmiş bitki örneklerinin el kesiti ile preparat yapımında, dokuların net bir şekilde ayırt edilebilmesini sağlayan yeni bir ikili boyama yöntemi geliştirildi. Bu yeni yöntem, el kesitlerinde kullanılabilmesi ve renk farkıyla dokuları net bir şekilde ayırt etmesi bakımından pratiklik ve kesinlik sağlamaktadır. Bu yöntemde, safranin ve fast-green boyalarının belirli oranlarda karışımından oluşan ikili boya, hem monokotil

hem de dikotil bitki örneklerinde kullanılabilmekte ve uzun süre oda sıcaklığında bozulmadan saklanabilmektedir. Bu makalede, bu yöntemin uygulandığı çeşitli bitki örneklerine ait anatomik kesitlerin fotoğrafları çekilerek, çeşitli dokular gösterilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Bitki anatomisi, Boyama, El kesitleri, Fast-green, Safranin.

### 1. Giriş

Bitki anatomisi laboratuvarında preparat hazırlamada kullanılan çeşitli inceleme ortamları ve bu ortamlar için kullanılan farklı boyalar bulunmaktadır. Toluidin mavisi O (1), laktofenol pamuk mavisi (2), laktofenol pamuk mavisi ve anilin mavisi (3), tripan mavisi ve rose bengal boyası (4), asit fuksin (5), safranin (6) ve kalkoflor (7) boyları bunlardan sadece birkaçını oluşturmaktadır. Bu boylar bazen tek başına bazen de iki boyanın belli oranlarda karıştırılmasıyla kullanılmaktadır. İkili boyama tekniklerinde bitkisel dokular için çoğunlukla safranin ve fast-green boyları kullanılmaktadır (8). Safranin bazik yapılı bir boya olup başta ligninleşmiş dokular olmak üzere; kitinleşmiş, kütinleşmiş ve suberinleşmiş dokuları ve bunun yanı sıra çekirdekçik ve kromozom yapılarını boyamaktadır (9). Bunun yanında 9/1 oranında hazırlanan anilin ve astra mavisi boyları, bazı araştırmacılar tarafından bitki dokularını boyamak için kullanılmasına rağmen, bu boyların kullanımının bakteri ve fungal organizmalar için daha uygun olduğu düşünülmektedir (10).

Bitkisel organizmalar için kullanılan preparasyon yöntemlerinde daimi ve geçici preparat yapma yöntemleri sıklıkla kullanılmaktadır. Daimi preparat hazırlamada oldukça yaygın bir yöntem olan Algan (8)'in parafin yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntem sırasıyla fiksasyon, dehidrasyon, parafin bloklara gömme, mikrotomda kesit alma, parafinden kurtarma ve boyama gibi işlem basamaklarından oluşmaktadır. Parafin yönteminde en çok safranin / fast-green ikili boyama yöntemi tercih edilmektedir. Bu yöntemde göre boyanan kesitlerin üzerine uygun bir yapıştırıcı

Bahattin BOZDAĞ, Okan KOCABAŞ, Canan ÖZDEMİR  
*Celal Bayar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Muradiye, Manisa*

Yurdanur AKYOL  
*Manisa Hasan Türek Anadolu Lisesi, Aynalı Mahallesi Kenzi Caddesi No.24 Yunusemre, Manisa*

**Sorumlu yazar:**  
Yurdanur AKYOL  
*Manisa Hasan Türek Anadolu Lisesi, Aynalı Mahallesi Kenzi Caddesi No.24 Yunusemre, Manisa*  
Tel: +90236 238 4777  
Faks: +90236 238 0955  
E-posta: yurdanur45@gmail.com

**Submitted/Gönderilme:** 27.02.2016 **Revised/Düzeltilme:** 04.04.2016  
**Accepted/Kabul:** 07.04.2016

yardımıyla lamel kapatılarak preparatlar hazırlanır. Oldukça maliyetli ve zaman alan bir işlem olan parafin yönteminde belirtilen basamakların birinde gerçekleşebilecek bir aksaklık çalışmanın tekrarlanmasına yol açabilmektedir. Daimi preparasyonlarda bitki materyalleri oldukça fazla kimyasal ortamından geçtiğinden bitki materyalinin kimyasal içeriğinin bir kısmı ve pigmentler kaybedilerek yapay bir görünüm elde edilmekte ve salgı tüyleri gibi kırılğan yapılar zarar görebilmektedir. Daimi preparatlar uzun süre saklanabilir olması bakımından avantajlıydı. Fakat günümüzde geçici preparatların mikrofotograflarının dijital ortamda uzun süre saklanabilir olması daimi preparatlara olan ihtiyaçları da ortadan kaldırmıştır.

Geçici preparat yapımı parafin yöntemine göre çok daha kolay bir yöntemdir. Bu yöntemde göre bir jilet yardımıyla alınan el kesitleri, uygun boya ile boyanarak mikroskopta incelenebilir. Geçici preparatların boyanmasında çoğunlukla kullanılan boyalardan biri de sartur reaktifidir (11). Bu boyama yönteminde dokular tek bir rengin tonları şeklinde boyanmaktadır. Bu durum parafin yöntemi ile hazırlanan preparatlardaki dokusal kayıpların veya değişimlerin, aynı örneklerden el kesiti alınarak karşılaştırılmasına olumsuz yönde etki etmektedir.

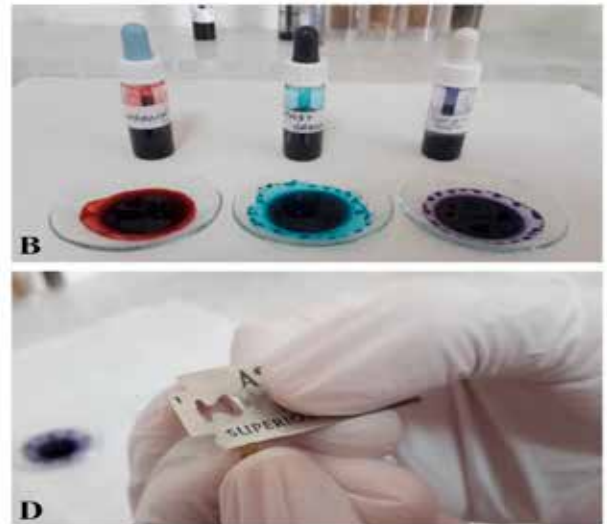
Bu çalışmada el kesitlerinin incelenmesinde kolaylık sağlamak için yeni bir boyama yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde kullanılan safranin ve fast-green boya ile parafin yönteminde de kullanılmaktadır. Fakat, boya bileşimleri ve uygulama yöntemi farklıdır. Bu yöntemi kullanmadaki amaç, parafin yöntemindeki zaman, maliyet ve oluşabilecek aksaklıkları en aza indirmek ve parafin yöntemine göre hazırlanan daimi preparatların, geçici preparatlar ile en iyi şekilde karşılaştırılmasını sağlamaktır. Ayrıca, preparasyon çalışmalarına hız kazandırmak da amaçlanmıştır.

## 2. Materyal ve Yöntem

Bu çalışmada hazırlanan boyanın dokular üzerindeki etkisini göstermek amacıyla farklı bitki gruplarına ait; *Triticum aestivum* L., *Cichorium pumilum* Jacq., *Hypparrhenia hirta* (L.) Stapf, *Moenchia coerulea* Boiss., *Scabiosa hispidula* Boiss., *Echium italicum* L., *Symphytum anatolicum* Boiss. taksonları kullanılmıştır. Geçici preparatlar için geliştirilen boyanın hazırlanmasında ilk olarak kristal halde bulunan safranin O ( $C_{20}H_{19}ClN_4$ ) boyası, her 100 ml %50'lik etanol çözeltisi için 1 gr (%1'lik) olacak şekilde ve kristal halde bulunan fast-green FCF ( $C_{37}H_{34}N_2Na_2O_{10}S_3$ ) boyası, her 100 ml %96'lık etanol çözeltisi için 0,2 gr (%0,2'lik) olacak şekilde tartıldı. Daha sonra bir manyetik karıştırıcı yardımıyla safranin ve fast-green boya, safranin için %50'lik etanolde ve fast-green için %96'lık etanolde homojen olacak şekilde çözdürüldü. Sonraki aşamada safranin 1 oranında fast-green ise 9 oranında kullanılarak her iki boya birbirleriyle karıştırıldı. Bu sayede karışım el kesitleri için kullanılabilir hale geldi. Bu karışım laboratuvarında oda sıcaklığında 15-20 gün süreyle özelliğini yitirmeden kullanılabilir (Şekil 1A, B).

Geçici preparatlar için geliştirilen yöntemde göre hazırlanacak el kesitleri ve sonrasında boyama işlemleri için aşağıda belirtilen basamaklar sırasıyla uygulandı:

- Öncelikle kesit alınacak bitki materyali, materyale zarar vermeyecek şekilde baş ve işaret parmakları arasına yerleştirilerek, çift yönlü bir jilet yardımıyla materyale göre dik açılı olacak şekilde kesildi. Saçak kökleri ve uzun süre fiksatifte bekletilen bitki materyalleri gibi hassas yapılardan kesit almak için, materyalden bir parça kesilerek strafor köpük içerisine yerleştirilip, jilet yardımıyla ince bir kesit alındı (Şekil 1C, D).



Şekil 1. Geçici preparatlar için kullanılan boyalar (A, B) ve kesit alma işlemleri (C, D)

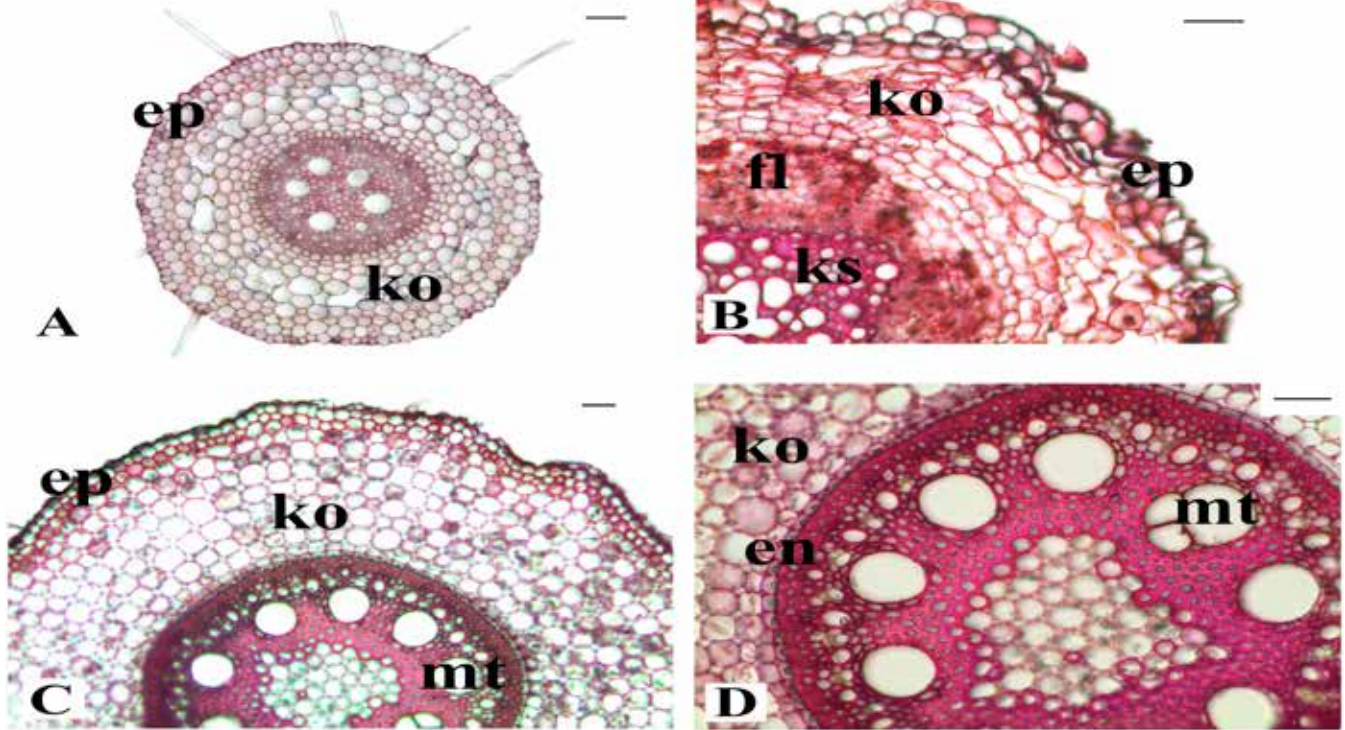
- Alınan kesitler temiz bir lam üzerine damlatılmış birkaç damla saf suyun içerisine konuldu. Daha sonra üzerine önceden hazırlanan safranin ve fast-green boya karışımı damlalık yardımıyla 1-2 damla damlatıldı. Birkaç dakika içerisinde kesitler boya karışımını hücre içine alarak boyandı. Daha sonra fazla su ve fazla boya kurutma kağıdı ile kesitlere zarar vermeden dikkatli bir biçimde emdirildi. Son olarak kesitlerin üzerine uygun bir lamel kapatıldı. Bu sayede geçici preparatlar inceleme için hazır hale gelmiş oldu.
- Hazırlanan preparatlar mikroskopta incelenerek mikrofotografı çekildi.

Bu boyama yöntemi ile boyanmış bazı taksonlara ait olan kök, gövde, yaprak kısımlarıyla iletim demetlerinin mikrofotografı bulgular bölümünde verilmiştir.

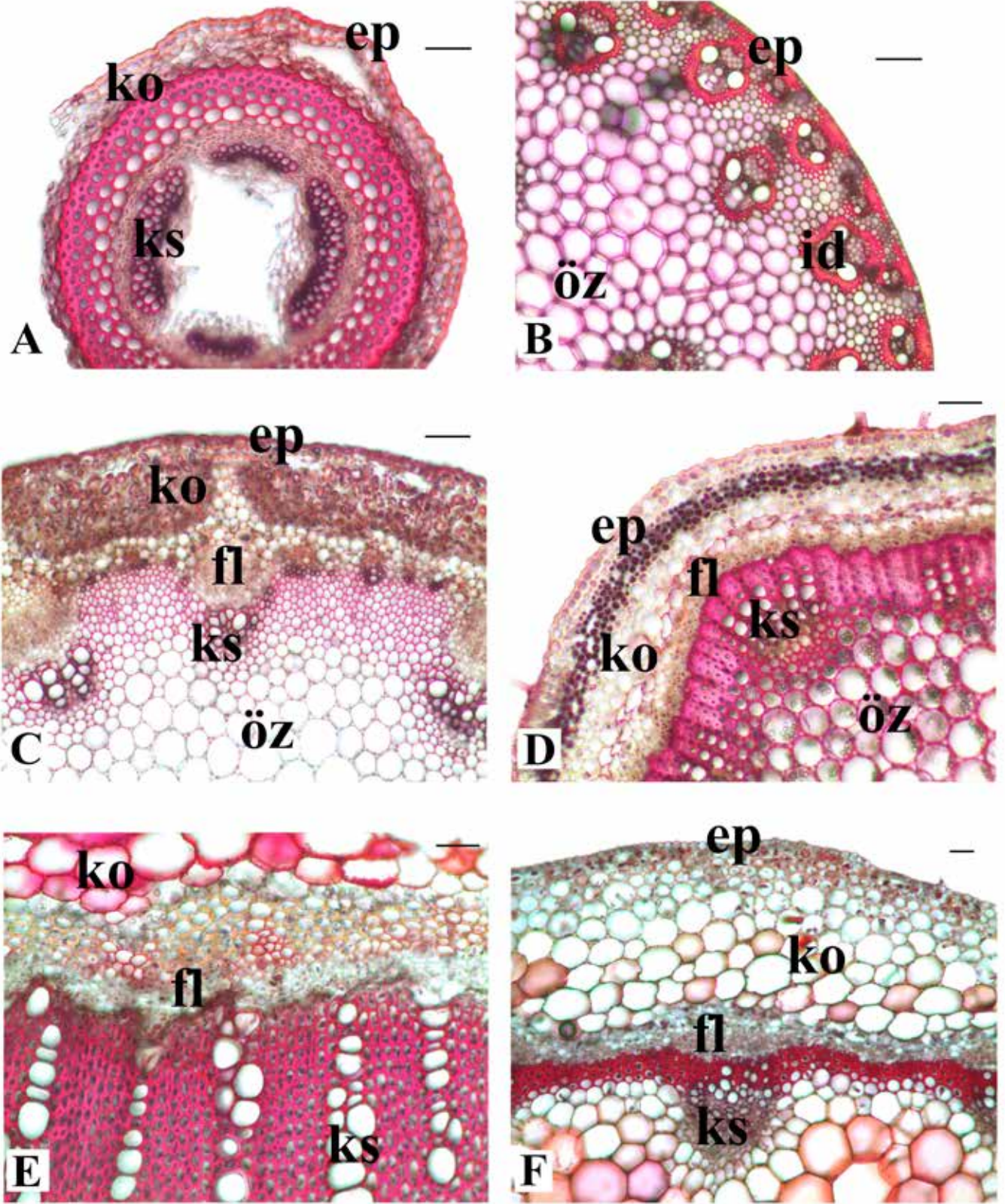
### 3. Bulgular

Bu çalışmada kullanılan boyalardan safranin primer yapıları ve çoğunlukla sekonder yapıları boyarken, fast-green genellikle primer yapıları boyamaktadır. Köklerden alınan kesitlerde, safraninin en çok merkezi silindirdeki ksilem dokusunu belirgin bir biçimde boyadığı görülmüştür. Fast-green ise merkezi silindirdeki öz ve merkezi silindirin etrafındaki parankimatik yapıları boyamıştır

(Şekil 2 A-D). Gövde enine kesitlerinde safranin boyasının genel olarak ksilem hücrelerini boyadığı görülmüştür. *H. hirta* türünde, iletim demetlerinin etrafındaki sklerenkimatik yapının ve korteksteki sklerenkimatik dokuların safranin ile boyandığı görülmektedir. Ayrıca, *M. coerulea* ve *C. pumilum* türlerinde bulunan kalın kutikula tabakaları da safranin sayesinde kolaylıkla ayırt edilebilmektedir. Fast-green boyasının ise parankimatik yapıda olan korteks tabakası ve floem dokularında etkili olduğu gözlenmiştir (Şekil 3A-F). Yaprak enine kesitlerinde sekonder yapı çok fazla olmadığı için genellikle mezofil tabakası tek renk boyanmaktadır. Fakat, *Hyparrhenia hirta* türünde olduğu gibi iletim demetlerinin etrafında gözlenen sklerenkim hücrelerinin bulunduğu yapraklarda, bu kısım safranin tarafından belirgin bir şekilde kırmızı renkte boyanmıştır (Şekil 4 A-D). Bu boyama yönteminin iletim demetlerindeki dokuların ayırt edilmesinde de oldukça etkili olduğu görülmüştür. Özellikle ksilem hücrelerinin ve sklerenkimatik dokuların belirginleştiği görülmektedir (Şekil 5 A-C). Bazı durumlarda dokuların mor renkte boyandığı gözlenmiştir. Bu durum %70'lik etanol içerisinde fikse halde uzun süreli bekletilmiş ve hücre içeriğini kaybetmiş bitki materyallerinde daha fazla gözlenmektedir. Daimi preparat yapımında kullanılan parafin yönteminde de da alkol serilerinde hücresel içeriğini kaybeden örneklerde bu durum gözlenmektedir.

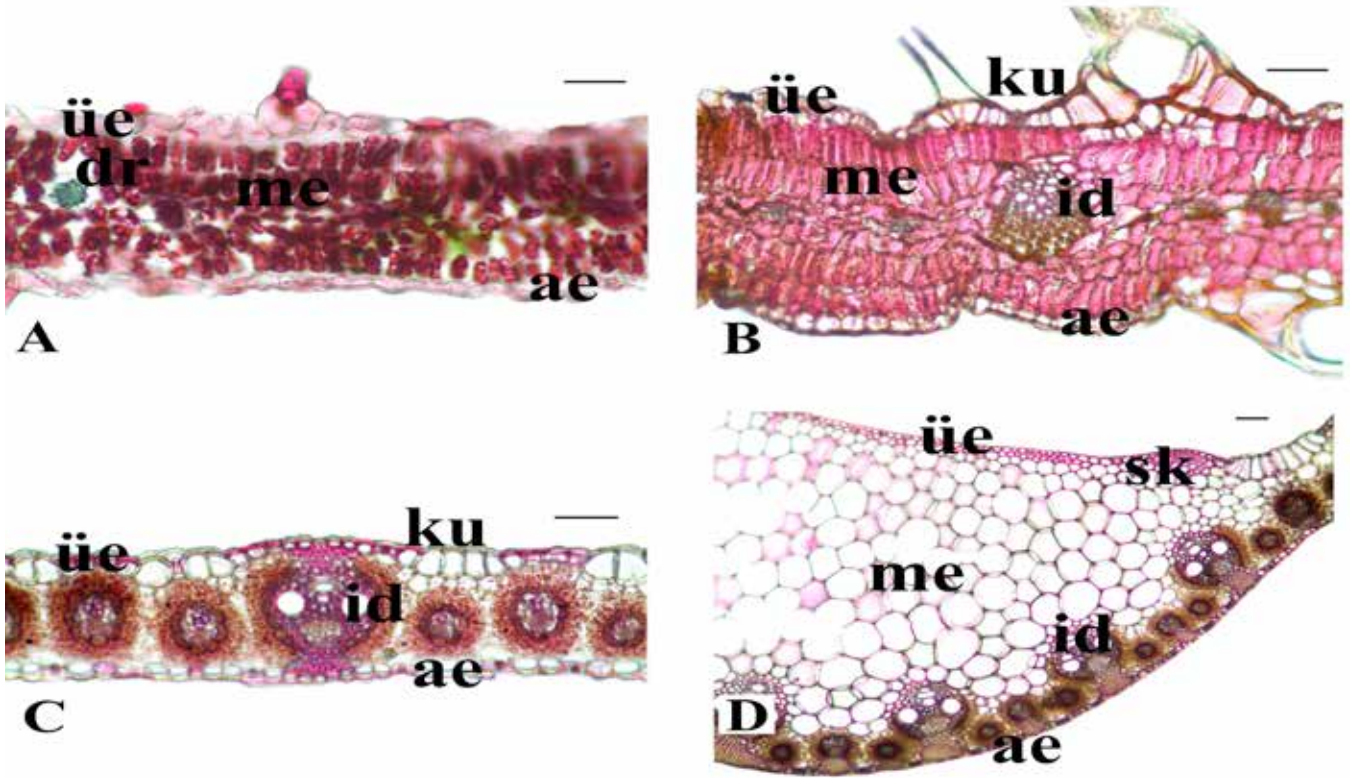


Şekil 2. Belirtilen yöntemle boyanan *T. aestivum* (A), *C. pumilum* (B) ve *H. hirta* (C, D) kök enine kesitleri (Ölçek: 50 µm). ep: epidermis, ko: korteks, en: endodermis, fl: floem, ks: ksilem, mt: metaksilem.



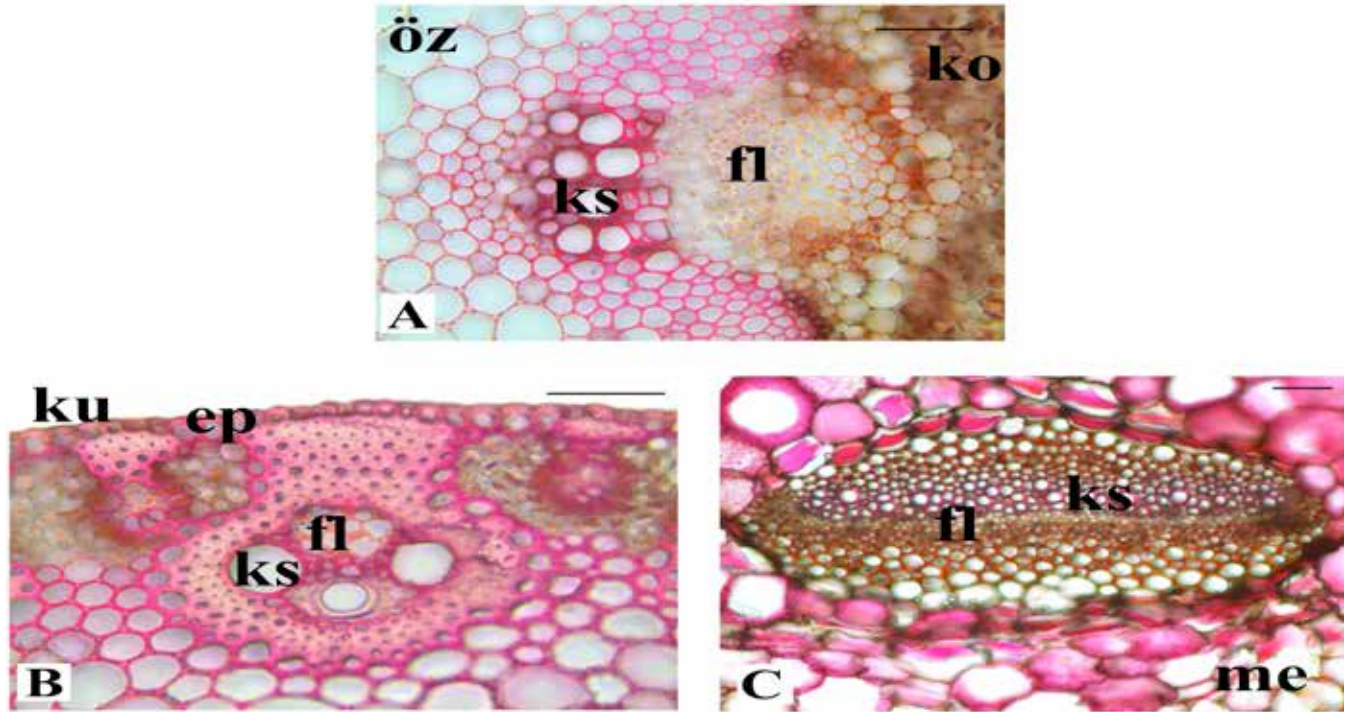
Şekil 3. Belirtilen yöntemle boyanan *M. coerulea* (A), *H. hirta* (B), *C. pumilum* (C), *S. hispidula* (D), *E. italicum* (E), *S. anatolicum* (F) gövde enine kesitleri (Ölçek: 50 µm).

ep: epidermis, ko: korteks, id: iletim demeti, fl: floem, ks: ksilem, öz: öz bölgesi.



Şekil 4. Belirtilen yönteme göre boyanan *S. hispidula* (A), *E. italicum* (B), *H. hirta* (C) yaprak enine kesitleri ve *H. hirta* (D) yaprak ana damarı enine kesiti (Ölçek: 50 µm).

**ku:** kutikula, **üe:** üst epidermis, **me:** mezofil tabakası, **id:** iletim demeti, **dr:** druz kristali, **sk:** sklerankima, **ae:** alt epidermis.



Şekil 5. Belirtilen yönteme göre boyanan *C. pumilum* (A), *H. hirta* (B), gövde iletim demetleri ve *E. italicum* (C) yaprak ana damarı iletim demeti (Ölçek: 50 µm).

**ku:** kutikula, **ep:** epidermis, **ko:** korteks, **me:** mezofil tabakası, **fl:** floem, **ks:** ksilem, **öz:** öz bölgesi.

#### 4. Tartışma ve Sonuç

Bitki anatomisi çalışmalarında doğru sonuçlar elde etmek için preparasyondaki tüm aşamalar titizlikle ele alınmalıdır. Kesit alındıktan sonra kullanılacak olan boya, incelenecek hücre ya da doku kısımlarına göre seçilmelidir. Bu çalışmada genel anlamda bitki dokularını ayırt etmek için safranin ve fast-green boyaları önceki yöntemlerden farklı bir şekilde hazırlanarak uygulanmıştır.

Safranin ve fast-green Johansen (9), Sass (12) ve Algan (8) gibi araştırmacılar tarafından geliştirilen yöntemlerle ikili kombinasyon şeklinde kullanılmıştır. Popham ve arkadaşları (13) odunsu dokuları boyamak için safranin ve anilin mavisi boyalarını tercih etmişlerdir. Araştırmacılar safranin ile fast-green kombinasyonunun ligninleşmiş dokuları belirlemede hızlı sonuç verdiği için daha çok bu ikisini birlikte kullanmışlardır (14). Safraninin anilin mavisi ile de kullanılabilirliğini, ancak bu kombinasyonun Gymnospermler için daha uygun olduğunu belirtmişlerdir (9, 15). Bu çalışmada daimi preparat yapımında sıklıkla kullanılan safranin ve fast-green boyalarının tercih edilmesinin diğer bir sebebi de hem el kesitleri hem de Algan'ın (8) yöntemine göre hazırlanmış kesitleri birlikte değerlendirebilmektir.

Boyaların hazırlanmasında Algan'ın (8) yöntemi uygulanmıştır. Boyaların kullanım oranlarının 9/1 olarak belirlenmesinde safranin boyasının fast-green boyasına göre dokulara daha iyi nüfuz etmesi etkili olmuştur. Johansen (9) ve Algan (8) gibi araştırmacıların uyguladıkları ikili boyamalarda, her iki boya çoğunlukla sıralı olarak yani ayrı zaman dilimlerinde farklı sürelerde kullanılmaktadır. Fakat, yeni yöntemde belirli oranlarda safranin ile fast-green karışımı kullanılmaktadır.

Parafin yöntemi gibi alkol serilerinin kullanıldığı ortamlarda bitkinin kimyasal içeriğinin kaybolması ile birlikte tüy gibi oluşumlar zarar görebilmektedir. Bu eksiklikleri gidermek için el kesiti yöntemi ile alınıp boyanan preparatlar kullanılabilir. El kesitlerinde sıklıkla kullanılan sartur reaktifi ise kesitlerde tek renk verdiği için, dokuların net olarak ayırt edilmesi zorlaşmaktadır.

Sonuç olarak özellikle Angiosperm yapıdaki bitki örneklerinin dokularını gözlemlemek için kullanılan diğer yöntemlere göre bu yeni yöntem, zaman ve maliyet açısından daha elverişlidir. Aynı zamanda bitki anatomisi laboratuvarlarında bitki dokularını net bir şekilde ayırt etmeyi sağlar. Bu çalışmada hazırlanan boya kombinasyonunun pratik ve daha az maliyetli olması tercih sebeplerindedir.

#### A New Staining Method for Hand-Cut in Plant Anatomy Studies

##### ABSTRACT

In this study, a new double staining method that provide clearly to identify tissues in making preparations by hand-cut of plant samples were fixed with alcohol has been developed. This new method can be provides practicality and certainty in terms of

distinguishing the tissues and can be used for hand-cut. In this method, double staining consist of safranin and fast green can be used in both monocotyledons and dicotyledons and can be stored at room temperature for a long time without spoiling. Photographs of the anatomical sections is used this method was taken and tissues was demonstrated.

**Keywords:** Plant anatomy, Staining, Hand-cut, Fast-green, Safranin.

#### KAYNAKLAR

- Ghemawat MS. Polychromatic staining with toluidine blue O for studying the host-parasite relationships in wheat leaves of *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*. *Physiol Plant Pathol* 1977; 11: 251-3.
- Heath MC. Light and electron microscope studies of the interactions of host and non-host plants with cowpea rust—*Uromyces phaseoli* var. *vignae*. *Physiol Plant Pathol* 1974; 4: 403-14.
- Shipton WA, Brown JF. A whole-leaf clearing and staining technique to demonstrate hostpathogen relationships of wheat stem rust. *Phytopathology* 1962; 52: 1313.
- Saha DC, Jackson MA, Johnson-Cicalese JM. A rapid staining method for detection of Endophytic fungi in turf and forage grasses. *Phytopathology* 1988; 78: 237-9.
- McBride MC. A method of demonstrating rust hyphae and haustoria in unsectioned leaf tissue. *Am J Bot* 1936; 23: 686-8.
- Bandoni RJ. Safranin O as a rapid nuclear stain for fungi. *Mycologia* 1979; 11: 873-4.
- Trese AT, Loschke DC. High contrast resolution of mycelia of pathogenic fungi in corn tissue after staining with calcofluor and destaining with cellulose. *Phytopathology* 1990; 80: 196-200.
- Algan G. Bitkisel Dokular İçin Mikroteknik. Fırat Üni Fen Ed Fak Yay Bot No:1. İstanbul. 1981.
- Johansen DA. *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book Co., Inc., New York and London. 1940, pp.553.
- Yeung ECT, Stasolla C, Sumner MJ, Huang BQ. *Plant Microtechniques and Protocols*, Springer International

- Publishing (EBook). Switzerland. 2015.
11. Baytop A. Bitkisel Droguların Anatomik Yapısı. İstanbul Üni Yay 6. Baskı No: 32. İstanbul. 1981.
  12. Sass J. Botanical Microtechnique. Third Edition. Iowa State University Press, Iowa. 1958.
  13. Popham RA, Johnson TJ, Chan AP. Safranin and anilin blue with Delafield's hematoxylin for staining cell walls in shoot apices. Stain Tech 1948; 23:185-90.
  14. Balatinecz JJ, Kennedy RW. Maturation of ray parenchyma cells in pine. Forest Prod J 1967; 17: 57-64.
  15. Jensen WA. Botanical Histochemistry: Principles and Practice. Freeman, San Francisco. 1962.