

KÜÇÜK KROMOZOMLAR İÇİN ASETİK-HEMATOKSİLİN EZME METODU

AN ACETIC-HAEMATOXLIN SQUASH METHOD FOR SMALL CHROMOSOMES

Dr. Gökseil OLGUN

İstanbul Üniversitesi, Botanik ve Genetik Kürsüsü

Genellikle ezme metodu için uygulanan boyalar, çok küçük kromozomlu bitki ve hayvan materyellerinde kullanıldığı zaman iyi sonuç vermemiştir.

Halbuki NUNEZ (1962) *Pterygota* nın *Collembola* familyasına ait (*Isotoma* ve *Entomobrya*) spermatozit ve oositlerindeki kromozomların çok küçük olması ve iyi boyanamaması nedeniyle yaptığı araştırmalar sonucunda, çeşitli konsantrasyonlardaki mordanların asetik asit solusyonunda koyu kırmızı bir renk vermesiyle bu küçük kromozomların net bir şekilde görülmesini sağlamıştır.

Bilindiği gibi hematoksilin eriyikleri «hematein» meydana getirmek üzere havadaki O₂ ile yavaş yavaş oksitlenir; hematein münasip mordanlarla mora çalan koyu kırmızı bir renk teşkil etme özelliğine sahiptir.

Son yıllarda (TIWARY ve SHRIVASTAVA, 1950; MARIMUTHU ve SUBRAMANIAM, 1960; WITTMANN, 1962) kromozom ezme metodunda, hematoksilin kullanılması hakkında çeşitli eserler yayınlanmış ve genellikle hematoksilin ezme metodu için tek banyo metodu uygulanmıştır.

Bu metodu denerken kullanılan asetik-hematoksilin, 100 cc %45 asetik asit (pH ca, 1.4) içersinde 2 gr hematoksilin (Merck) eritilerek elde edilir. Bu eriyiğin gerekli oksidasyon derecesine çıkabilmesi için

2 ay beklemesi gerekmektedir. Daha zayıf eriyikler (mesela %1) daha çabuk okside olurlar.

Kullanılan hematoksilinin bilhassa Merck firmasından temin edilmesindeki amaç, saf olmayan maddeleri kapsayan satıdaki hematoksilinin gerçek boya konsantrasyonuna erişememesi sonucunda, kromozomlar kuvvetlice boyanamaz ve çok defa mordan ilavesinde çökelti meydana getirirler.

Kısmen okside bir eriyik elde etmek için; kullanmadan hemen önce hazırlanabilen sodyum iyodatın az bir miktarına (takriben hematoksilinin her gramı için 0,06 gr.) taze hazırlanmış boya eriyiği ilâve edilir (BAKER ve JORDAN, 1953).

HYDE ve GARDELLA (1953) metodunda ise, asetik-asit demir tozuna doğrudan doğruya ilâve edilir ve sonradan kaynatılarak hazırlanır.

Daha önce belirtildiği gibi kromozom ezme metodunda hem tek banyo metodu (ezmeden hemen önce boyanın mordanla karıştırılması) hem de çift banyo metodu (dokunun aynı zamanda fikse edilmesi, mordanlanması ve sonra boyanması) tatbik edilmiştir.

Tek banyo metodunda, materyal Carnoy karışımı ile fikse edilir (Carnoy 3:1). Ezme anında bir lam üzerine demir-asetat ile doyurulmuş %45 asetik-asitten bir damla, asetik-hematoksilinden bir damla ilâve edilir.

Çift banyo metodu uygulanacak ise, Carnoy sıvısında glasiyal asetik-asidi yerine eşit hacimde demir-asetat ile doyurulmuş glasiyal asetik-asit kullanılır.

NUNEZ (1968) çalışmaları esnasında küçük kromozumlu hayvan ve bitki materyellerine, aşağıdaki metodu uygulamış bu küçük kromozomların iyi boyanmasını ve net bir şekilde görülmesini temin etmiştir.

I. *Collembola* için tatbik edilen metod :

1. **Fikse etme:** Hayvan materyalleri Carnoy ile en az 24 saat fikse edilir.
2. **Dokuyu parçalara ayırma:** Fikse edici sıvı ile birlikte polietilen bir tabak üzerine (fotoğraf kapağı da bu işi görür) örnekten bir parça konur ve streskopik mikroskop altında gonadlar parçalanır.
3. **Ezme** : Gonadlar bir lam üzerinde asetik-hematoksilinin bir damlasına geçirilir. Gerekirse demir-

asetat ile doyurulmuş bir damla % 45 asetik - asit ilâve edilir. Lamelin üzerine kuvvetlice bastırılmadan önce filtre kağıdı ile eriyiğin fazlalığı alınır. Eğer arzu edilirse, tırnak cilası veya koruyucu bir sıvı ile lamelin etrafı kapatılır.

4. **Sürekli preparat** : Bir kaç damla Hoyer's mounting (BEEKS, 1955) veya Berlese sıvısı (WYGODZINSKY, 1957) lamelin bir tarafından verilir, diğer taraftan absorpsiyonunu ve sıvının akışını kuvvetlendirmek için filtre kâğıdı ile sıvının bir kısmı çekilir. Sıcak bir masada preparat kurumaya terk edilir.

II. Kök uçlarına ve yaprak tomurcuklarına tatbik edilen metod :

1. **Ön muamele** : Kök uçları ve yaprak tomurcukları, 8-hidroksikinolin, kolşisin veya kumarin (SHARMA ve SHARMA 1957) gibi eriyiklere konur (TJIO ve LEVAN, 1950).
2. **Fikse etme**: Ön muameleden alınan kök uçları Carnoy fiksatifi ile (24 saat) veya Battaglia ile (5 dakika) fikse edilir (BATTAGLIA, 1957 a).
3. **Yıkama** : Fiksedenden alınan materyal, %96 etil alkolde yıkanır ve destile suda derecesi düşürülür.
4. **Boyama** : Yıkamadan sonra materyal %18 HCl (soğuk), de Carnoy ile fikse edilmiş ise 5-10 dakika, Battaglia ile fikse edilmiş ise 20 dakika hidroliz edilir. Hidrolizden sonra Leuco-bazik fuksinde 1-2 saat bekletilir (BATTAGLIA, 1957 b).
5. **Dokuyu çözmek**: Destile suda 2-3 defa çalkalandıktan sonra, 30-60 dakika pH 3,5-4 olan tampon 0,1 M asetatlı %3 pektinas eriyiğine geçer ve sonra saf suda yıkanır. Hemen ezilmiyecek ise buz dolabında saklanır (DE LATOUR, 1960).
6. **Ezme** : Materyal, bir lam üzerinde %45 asetik-asit içerisinde didiklenir ve iyice ezilir. %45 asetik-asidin fazlası filtre kağıdı ile emdirilir ve yerine bir damla asetik-hematoksilinden, bir damla da %45 asetik-asit ile doyurulmuş demir asetatlı

ilave edilir. Ezmenin tamamlanabilmesi için lam üzerine lamel kapatılır ve üzerine filtre kağıdı ile kuvvetlice bastırılır.

7. **Sürekli preparat:** *Collembola* için tatbik edilen metod aynen kök uçlarına da uygulanır.

III. Polen ana hücrelerine tatbik edilen metod :

1. **Fikse etme:** Anterler Carnoy ile 24 saat fikse edilir.
2. **Boyama** : Fiksedenden alınan anterler, demir-asetat ile doyurulmuş %45 asetik-asidin bir damlasının ilavesiyle, asetik-hematoksilinde ezilir.
3. **Sürekli preparat:** *Collembola* ve kök uçlarındaki gibi preparatlar sürekli hale çevrilir.

Berlese sıvısı	Hoyer's mounting sıvısı
Arap zamkı (toz veya kristal) 30 g.	Destile su 50 ml.
Destile su 45 cc.	Arap zamkı 30 gms.
Kloral hidrat 40 cc.	Kloral hidrat 200 gms.
Şeker 6 g.	Gliserin 16 ml.
Glasiyal asetik asit 12 cc.	
Fenol Bir kaç damla	

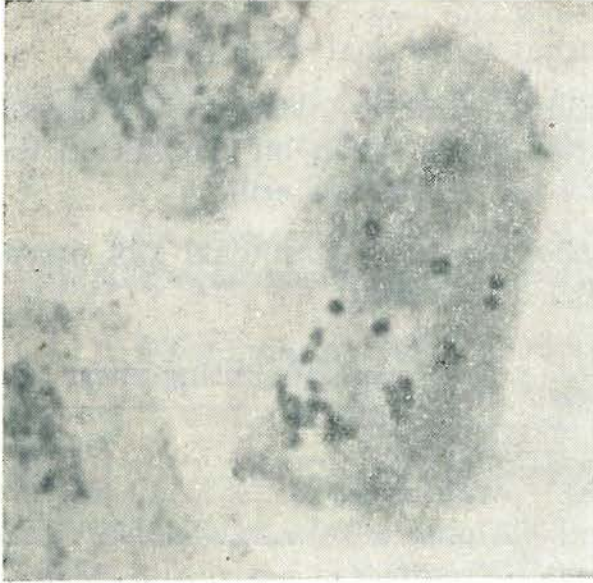
Yukarıda bahsedilen metod, ufak kromozomlu bitki ve hayvan materyallerinde iyi sonuç vermiştir. Boyalar ve bunların çeşitli mordanlarla meydana getirdikleri bileşimler hakkındaki bilgiler, aşağıda belirtilen araştırmacılar tarafından verilmiştir (COLE, 1943. WIGGLESWORTH, 1952; HARMS, 1957; BAKER, 1958).

Carnoy ile fikse edilen materyal kalitesinde hiç bozulma olmaksızın uzun bir süre buz dolabında saklanabilir. Bilindiği gibi ferri iyonları kromozomlar üzerinde onların bozulmasını önleyen koruyucu bir tabaka teşkil ederler.

Metodun başlıca aksak tarafı, hematoksinin eriyiğinin sabit olmasıdır. Tedrici olarak bir müddet sonra hemateine dönüş ve atmosferik oksijen tarafından meydana getirilen oksidasyonun ilâvesi onu bir müddet sonra kullanışsız hale dönüştürür. UNNA tarafından kullanılan bir muamele de süblüme sülfürün ilâvesi, asetik eriyiği sabitleştirmez. Bundan başka Fe tarafından teşkil edilen bu gibi bileşik elementlerin tabiatlarının değişmesi iyice bilinmemektedir. Bu sebep-

ten ferri iyonları ile kromozomların koyu kırmızı boyanması dikkate değer bir husustur.

NUNEZ (1968) tarafından küçük kromozomlara uygulanan bu metod, tarafımızdan biraz değiştirilmek suretiyle küçük kromozomlu (*Caryophyllaceae-Dianthus*; *Scrophulariaceae-Digitalis*) bitkilere aşağıda belirtilen şekilde uygulanmıştır (Şekil 1, 2).



Şekil: 1 — *Dianthus giganteus*
($2n = 30$)



Şekil: 2 — *Digitalis lutea*
($2n = 56$)

I. Kök uçlarına tatbik edilen metod :

1. **Ön muamele** : Kök uçları 8-hidrokinolin veya kolşisin (%5) de bekletildi (2-3 saat).
2. **Fikse etme** : Ön muameleden alınan kök uçları Battaglia ile 5 dakika fikse edildi (BATAGLIA, 1957 a).
(Battaglia fiksatifi: 5 kısım %95 etil alkol, 1 kısım kloroform, 1 kısım glasiyal asetik-asit, 1 kısım %40 formaldehit).
3. **Yıkama** : %96 etil alkol ile yıkanıp destile suda derecesi düşürüldü.
4. **Dokuyu çözmek** : %18 HCl (soğuk) ile 20 dakika hidroliz edildikten sonra, destile su ile 2-3 defa çalkalandı ve pH 3,7 olan tampon çözeltisinde (30-60 dakika) bekletildi.

(Tampon çözelti:

I. 100 cc D. su — 2,72 gr CH_3COONa 0,2 M
II. 1000 cc D. su — 1,2 cc CH_3COOH

pH 3,7 için Sol. I — Sol. II = 10 cc — 90 cc =
100 cc.)

5. Ezme : Tampon çözeltisinden alınan kök uçlarının bir kısmı buz dolabında saklandı. Diğer kökler ise bir lam üzerinde bir damla %45 asetik-asit içerisinde ezildi. Asidin fazlası filtre kağıdı ile çektilirip yerine bir damla asetik-asetat ile doyurulmuş demir-asetat, bir damla da asetik-hematoksinin ilave edilip lamel kapatıldı. Sonra filtre kağıdı ile lamelin üzerine kuvvetlice bastırıldı.
- 6 Sürekli preparat: Lam ve lamel %10 asetik-asit içerisinde birbirinden ayrıldı, her biri ayrı ayrı alkol serilerinden geçirilerek ksilole getirildi ve kanada balsamı ile kapatıldı (McCLINTOCK, 1929).

II. Polen ana hücrelerine tatbik edilen metod :

1. Fikse etme: Anterler Carnoy (3:1) ile 24 saat fikse edildi.
2. Ezme : Fiksedenden alınan anterler, %45 asetik-asit ile doyurulmuş demir-asetat ve asetik-hematoksinin karışımında ezildi.
3. Sürekli preparat: %10 asetik-asit içerisinde lam ve lamel birbirinden ayrıldı, kök uçlarına tatbik edilen şekilde sürekli preparat haline çevrildi.

BİBLİYOGRAFYA

- 1 — BAKER J.R., and JORDAN B.M. (1953) : Miscellaneous contributions to microtechnique. Quart. J. micr. Sci., 94 : 237-242.
- 2 — BAKER J. R. (1958) : Principles of biological microtechnique. Methuen Co Ltd. London.
- 3 — BATTAGLIA, E. (1957 a) : A new "5 minutes fixation" in chromosome analysis. Caryologia 9 : 368-369.
- 4 — BATTAGLIA, E. (1957 b) : A simplified Feulgen method using cold hydrolysis. Caryologia 9 : 372-373.
- 5 — BEEKS, R.M. (1955) : Improvements in the squash technique for plant chromosomes. El Aliso, 3 : 131-133.

- 6 — COLE E.C. (1943) : Studies in haematoxylin stains. *Stain Techn.*, 18 : 125-142.
- 7 — DE LATOUR G. (1960) : A leaf squash technique for chromosome studies in grasses. *N.Z.J. Sci.*, 3 : 293-297.
- 8 — HARMS H. (1957) : *Handbuch der Farbstoffe für die Mikroskopie*, Teil 2, Lief. 2. Staufen Verlag, Kamp-Lintfort. Germany.
- 9 — HYDE B.B. and GARDELLA C.A. (1953) : A mordanting fixation for intense staining of small chromosomes. *Stain Techn.* 28 : 305-308.
- 10 — MARIMUTHU K.M. and SUBRAMANIAM K. (1960) : A haematoxylin squash method for the root tips of *Dolichos lablab* Linn. *Curr. Sci.*, 29 : 482-483.
- 11 — McCLINTOCK, B.A. (1929) : A method for making acetocarmine smears permanent. *Stain Techn.* 4 : 53-56.
- 12 — NUNEZ, O. (1962) : Cytology of Collembola. *Nature*, 194 : 946-947.
- 13 — NUNEZ, O. (1968) : An acetic-haematoxylin squash method for small chromosomes. *Caryologia*. 21 (2) : 115-119.
- 14 — SHARMA, A.K. and SHARMA, A. (1957) : *Stain Techn.* 32 : 167-169.
- 15 — TIWARY N.K. and SHRIVASTAVA S. (1950) : Modified rapid aceto-haematoxylin technique. *V. Sci. and Cult.*, 16 : 163.
- 16 — TJIO, J.H. and LEVAN, A. (1950) : The use of oxyquinoline in chromosome analysis. *Anal. Estac. Exp. Aula Dei* 2 : 21-64.
- 17 — WIGGLESWORTH V.B. (1952) : The role of iron in histological staining. *Quart. J. micr. Sci.* 93 : 105-118.
- 18 — WITTMANN W. (1962) : Aceto-iron-haematoxylin for staining chromosomes in squashes of plant material. *Stain Techn.* 37 : 27-30.
- 19 — WYGODZINSKY P. (1957) : Nota sobre el método de Beeks para preparaciones permanentes de cromosomas. *Rev. Arg. Agr.* 24 : 118-120.