

KÜÇÜK OMURGALI HAYVANLARDA BOYALI İSKELET METODU

STAINING SKELETON METHOD FOR SMALL VERTEBRATES

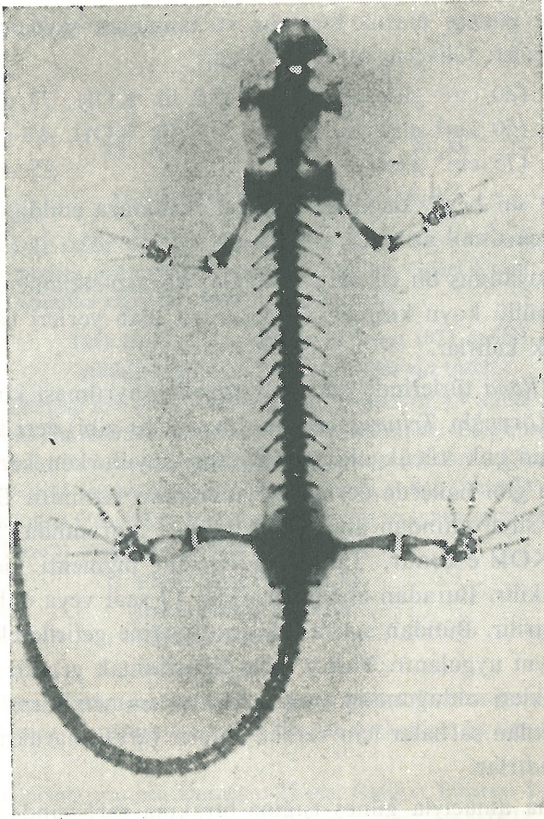
Doç. Dr. Neclâ ÖZETİ

Ege Üniversitesi, Sistematik Zooloji Kürsüsü

Ayrıntılı iskelet çalışmalarında kuru iskelet kullanmak, özellikle küçük hayvanlar için, uygun değildir. Zira kemikler kaslardan ne kadar dikkatli temizlense zedelenebilir, ayrıca temizlik işi bittikten sonra kurumaya bırakılınca büzülür ve normal durumundan farklı bir şekil alır. Bundan başka kıkırdak kuruyunca kıvrılır ve şekli kaybolur. Eklem yerleri de iyi belli olmaz. Ayrıca nisbî iskelet ölçüleri için yapılan ölçmelerde az çok hataya, düşülebilir.

Saydam-boyalı total iskelet hazırlanmasında kullanılan Davis-Gorge (1947) ve Taylor (1967) un alizarin metodu tarafımızdan değiştirilerek *Rana* türlerine aşağıdaki şekilde uygulandı :

Dikkatlice derisi soyulup iç organları temizlenen kurbağanın bacağına kimyasal maddede erimiyen mürekkeple yazılmış etiket bağlanır ve üzerindeki formol yahut alkolü iyice giderilsin diye 24 saat akan çeşme suyunun altında bırakılır. Sonra tripsin eriyiğine konarak güneş ışığına terkedilir. Tripsin eriyiği şöyle hazırlanır : 60 cm³ satüre boraks, 140 cm³ saf su ve bir küçük çay kaşığı toz halindeki saf tripsin. Eriyik 2-3 günde bir değiştirilir ve daima hayvanlar güneşe maruz bırakılır. Burada kalma süresi objenin büyüklüğüne ve tespit şekline bağlı olup, iki gün ilâ 3-4 hafta kadar sürebilir. Bizim kendi örneklerimiz ki bunlar % 10 luk formolde tespit edilip % 70 lik alkolde muhafaza edilmişti, en geç 15 gün sonra saydamlaşmaya başlamıştır. Müze materyelinden bazıları ise çok eski ve ilk tespiti iyi olmadığından saydamlaşma çok uzun zamanda olmuştur. Sırt, göğüs ve parmak kemikleri kasların altından az çok görülmeğe başlayınca boyaya geçilir. Önce stok boya hazırlanır ve her seferinde bu stok boyadan 1 cm³ alıp 100 cm³ % 2 lik KOH içine koyarak taze yapılır.



Şekil 1 : Alizarin metodu ile boyanmış *Salamandra (Mertensiella) luschani*'nin total iskeleti.

Stok boya : 5 cm³ glasyal asetik asit
 10 cm³ gliserin (beyaz)
 60 cm³ % 1 lik kloralhidrat

içine doymuş hale gelinceye kadar Alizarin red-S konur. Taze ve iyi tespit edilmiş örnekler boya içinde 12-20 saatte gayet iyi boyandıkları halde, müze materyelinden eski ve büyük örnekler için (*Rana temporaria* gibi) 24-48 saat beklemek gerekmiştir. *Rana iberica*'dan 1-2 küçük örnek ise 4 saatte iyi boyanmıştır.

Boyama esnasında kemiklerle beraber kaslar da boyanır. Fazla boyanın temizlenmesi için, içinde birkaç damla gliserin bulunan % 2 lik KOH içine konur ve duru KOH kalıncaya kadar sık sık değiştirilir. Burada dikkatli olmak gerekir, zira fazla kalırsa parçalanabilir.

Boyası temizlenen örnekler, aşağıdaki gliserin serilerinin her birinde 2-3 gün kalmak üzere güneşe maruz bırakılır ve tamamen saydamlaşanlar % 100 lük gliserinde saklanır. Gliserin serileri şöyledir :

% 20 gliserin (20 cm³ gliserin, 3 cm³ % 2 lik KOH, 77 cm³ saf su)

% 50 gliserin (50 cm³ gliserin, 3 cm³ % 2 lik KOH, 47 cm³ saf su)

% 75 gliserin (75 cm³ gliserin, 0 25 cm³ saf su)

Kullanılan gliserin saf beyaz değil ise örneğin muhafaza edildiği % 100 lük gliserin içine bir parça timol atılır.

Bu metodla boyanmış bir iskelette kemikler kırmızı-siklamen, kalsifiye kıkırdak kısımları granüllü koyu kırmızı, saf kıkırdak olan yerleri ise hiç boyanmadan saydam olarak kalırlar.

Bilindiği gibi *Rana* türlerinde derinin kaslardan ayrılması kolaydır. Halbuki bazı hayvanlarda (örneğin *Triturus cristatus*'ta olduğu gibi) deri kaslara iyice yapışmıştır veya hayvan çok küçük olduğu için deri soyulurken kemiklerin kırılma ihtimali vardır. Bu gibi hallerde derinin soyulmaması lazımdır. Bu hayvanlar 24 saat akan musluk suyu altından alınarak, içinde % 5 oranında % 1-2 lik H₂ O₂ bulunan % 2 lik KOH e konur. Tamamen derinin pigmenti giderilip beyazlaşmaya kadar bırakılır. Buradan alınan örnekler 12 saat veya daha fazla kalmak üzere saf suyu geçirilir. Bundan sonra tripsin eriyiğine getirilerek yukarıda anlatılan ameliyenin aynı uygulanır. Yalnız şunu hatırlatmak gerekir ki, her örneğin kendine has özellikleri olduğundan (tespit farkı, cesameti, taze olup olmaması v.s.) yukarıda anlatılan safhalar için verilen süreler farklı olacaktır. Sürekli gözlem altında olmalıdırlar.

Saydamlaştırma amacıyla güneş ışığına bırakma safhasında, şayet hava bulutlu ise kuvvetli elektrik lambası altına koymak gerekir.

Alizarin metodu, Taylor (1967) tarafından balık, reptil ve memelilere de uygulanmış ve iyi sonuçlar alınmıştır.

Bu metodla boyanmış bir iskelet Şekil 1 de gösterilmiştir.

BİBLİYOGRAFYA

1. DAVIS, D. D. and GORGE, U. R. (1947) : Clearing and staining skeletons of small Vertebrates. - Fieldiana : Technique Number 4.
2. TAYLOR, W. R. (1967) : Outline of a method of clearing tissues with pancreatic enzymes and staining bones of small Vertebrates. - Proc. U. S. Nat. Mus. 45 (12).