

Plant Microtechnique

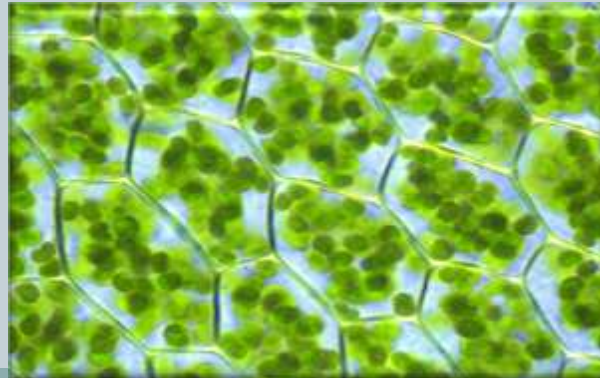
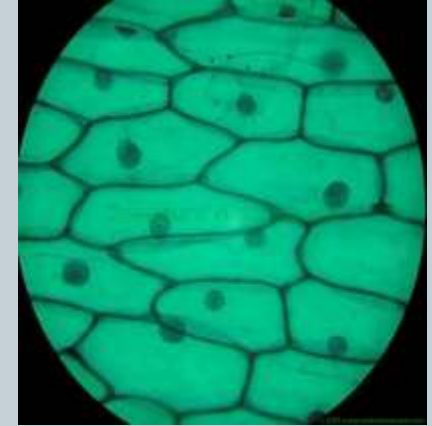
BOT 213



التحضيرات المجهرية النباتية

213 نبت

محاضره 3



Preparation Methods of microscopic samples and their applications

Preparation of microscopic samples of different plants depend on plant sizes and complexity of their structures. There are several methods, including:

- 1 - Squash Method
- 2 - Smear Method
- 3 - Whole Mount
- 4 - Maceration Method
- 5 - Sectioning Method



طرق تحضير العينات النباتية المجهرية وتطبيقاتها

يختلف تحضير العينات النباتية المجهرية باختلاف أحجام النباتات ودرجة تعقيد تراكيب أجسامها، وهناك عدة طرق منها:

1. طريقة الهرس Squash Method
2. طريقة الغشاء (المسحة) Smear Method
3. طريقة العينة الكاملة Whole Mount
4. طريقة التفكيك Maceration Method
5. طريقة التقطيع Sectioning Method

Quiz:

Mention the types of Preparation Methods of microscopic samples?

واجب: أذكر أنواع طرق تحضير العينات المجهرية؟

1- Squash Method

In some cases, a researcher needs to study the internal structures of botanical samples that are not shown by sections. **Squash Method** shows the internal structures of the samples and their relations.

This method **used to study the spores** that exist within the Sporangia, or **study the phases of meiosis** occurring within the Pollen Mother Cells in the anther to form pollens or **to study the phases of Mitosis** in stems and roots tips.

Squash Method summarized as follow:

- 1 - Place a sample on the center of a clean slide and covered by the cover slide.
- 2 - Press the cover slide to release the components
- 3 - and examine under a microscope.
- 4 - Pressure on the cover slide equal to avoid breaking it.



أولاً . طريقة الهرس Squash Method :

في بعض الأحيان يضطر الباحث إلى دراسة التراكيب الداخلية للعينة التي لا تظهرها القطاعات، ففي هذه الحالة يلجأ إلى طريقة الهرس التي بواسطتها يمكن إظهار التراكيب الداخلية والعلاقات التي تربطها ببعض، وتستعمل هذه الطريقة لدراسة الأبواغ Spores التي توجد داخل الحواظف البوغية Sporangia، أو دراسة أطوار الانقسام الاختزالي Meiosis التي تحدث داخل الخلايا المولدة (الأمية) Pollen Mother Cells في المتك لتكوين حبوب اللقاح أو لدراسة الأطوار المختلفة للانقسام غير المباشر Mitosis في القمم النامية (المرستيمات) للسيقان والجذور.

وتتلخص عملية الهرس فيما يلي: توضع العينة على الشريحة وتغطى بغطاء الشريحة،

يضغط على غطاء الشريحة حتى تظهر المكونات الداخلية إلى الخارج

وبالتالي يمكن مشاهدتها تحت المجهر

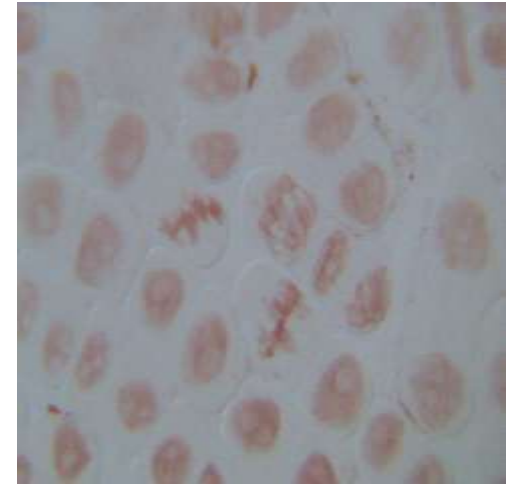
يجب أن يكون الضغط على غطاء الشريحة متساوياً لتفادي كسره أو كسر الشريحة نفسها،

Mitosis:

Preparation of **Mitosis** division in order to study the different phases using a light microscope. Plant root tips are the best specimens to illustrate these phases. It was found that the roots of the plant *Allium cepa* (onions) are one of the best plant roots, especially when the study to be for who has no experience in the preparation of plant samples.

There are several Methods to prepare microscopic slides for phases **Mitosis** division, but our study here will be limited to the most important and most common, namely:

- 1 - **Feulgen Method**
- 2 - **Acetocarmine Staining Method**
- 3 - **Colchicine Method**
- 4 - **The Karyotype**



http://www.nuffieldfoundation.org/sites/default/files/PB_investigating-mitosis-in-allium-root-tip-squash-slide-b-zoomed-metaphase-500.jpg

تحضير أطوار الانقسام غير المباشر Mitosis:

من أجل دراسة الأطوار المختلفة للانقسام غير المباشر Mitosis باستخدام المجهر الضوئي، وُجد أن نسيج القمم النامية للجذور النباتية هي أنسب العينات لتوضيح هذه الأطوار. كما وُجد أن جذور نبات البصل *Allium cepa* هي من أفضل الجذور النباتية، خصوصاً عندما تكون الدراسة لمبتدئ لم تكن لديه خبره في تحضير العينات النباتية.

وهناك عدة طرق لتحضير شرائح مجهرية لأطوار الانقسام غير المباشر، ولكن ستقتصر دراستنا هنا على أهم هذه الطرق وأكثرها شيوعاً، وهي:

طريقة فولجين ، طريقة صبغة الأسيتوكارمين ، الكولشيسين ، التركيب الكروموسومي (الهیئة الكروموسومية)

1 - Feulgen Method:

1 - Feulgen Method was discovered by Feulgen in 1924, a technical study of chromosomes or DNA and summarize in the following steps:

(A) Root Germination (onion roots)

(B) Killing and Fixation: by **Carnoy's fluid**.

(C) Hydrolysis: the transfer of the roots to the test tube containing hydrochloric acid $N HCl$. Then placed in an oven or a water bath at $60^{\circ}C$ for 12 minutes.



1- طريقة فولجين Feulgen Method اكتشفها فولجن 1924 وهي تقنية

لدراسة الصبغيات أو DNA

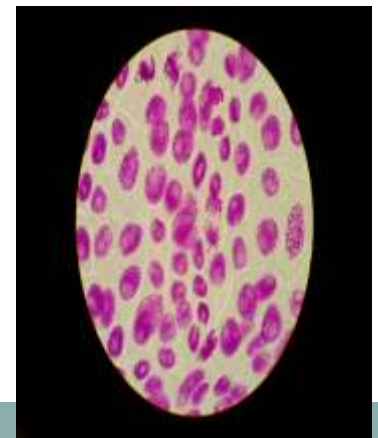
وتتلخص بالخطوات التالية:

(أ) إنبات الجذور: Root Germination

(ب) القتل والتثبيت: Carnoy's fixative, Killing and Fixation

(ج) التحليل Hydrolysis :

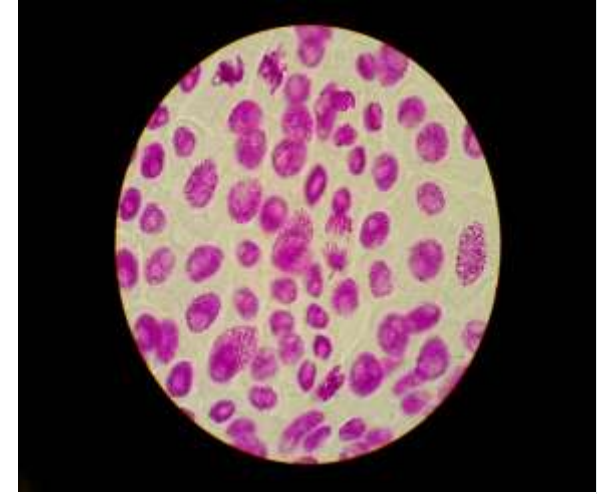
تنقل الجذور إلى أنبوبة اختبار تحتوي على حمض الهيدروكلوريك عياري $HCl N$ ثم توضع في فرن أو حمام مائي على درجة $60^{\circ}C$ لمدة 12 دقيقة.





(D) Staining: add **Basic Fuchsin Stain**

(E) Squashing: A clean glass slide is taken and then placed in the middle, a small drop of **45% acetic acid**, a single stained root is transferred and dissected by forceps, squash it well and place cover slide and press on the cover so that the components of the root spread.



Phases of **Mitosis** division

(د) الصبغ : Staining

يضاف عليها صبغة الفوشين القاعدي (**Basic Fuchsin Stain**)

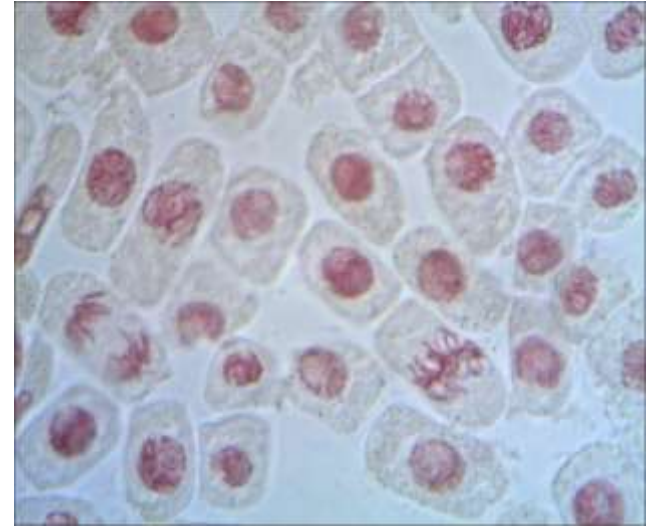
(هـ) الهرس Squashing

تؤخذ شريحة زجاجية نظيفة ثم يوضع في وسطها قطرة صغيرة من حمض الخليك تركيز 45 %، ينقل إليها جذر واحد من الجذور المصبوغة بواسطة ملقط تشريح، تهرس القمة جيداً إلى أجزاء قد تكون غير مرئية بالعين المجردة يؤخذ غطاء شريحة زجاجي Cover slide ويتم الضغط على غطاء الشريحة لكي تنتشر مكونات الجذر كطبقة رقيقة

2 - Acetocarmine Staining Method

The use of this technique by Belling (1926) for the study of chromosomes in each of Mitosis stages, he observed while working to use the Iron-Acetocarmine or Ferric acetate or iron resulting from the use of the rusty needle, was enough to stain chromosomes than other components of the cytoplasm. Belling also noted that heating the slide, including tissues reduces pigmentation of cytoplasm.

Orcien stain can be used to stain instead of **Acetocarmine** and **Propionic acid** instead of acetic acid, which gives good results with **Acetocarmine**



Light micrograph of onion (*Allium cepa*) root tip cells stained with acetocarmine to show nuclei and chromosomes. The field includes cells in **interphase**, **prophase**, **metaphase**, and **late telophase**

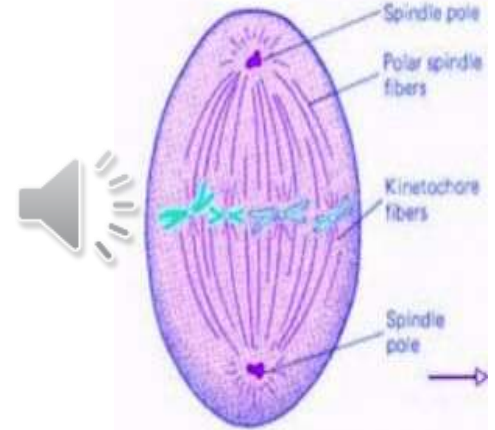
2. طريقة صبغة الأسيتوكارمين Acetocarmine Staining :

يرجع الفضل في استخدام هذه التقنية إلى بيلنج (Belling 1926) لدراسة الكروموسومات في كل من الانقسامين غير المباشر والاختزالي، فقد لاحظ بيلنج Belling أثناء عمله أن استخدام الأسيتوكارمين الحديدي **Iron-Acetocarmine** أو خلاات الحديد **Ferric acetate** أو الحديد الناتج من استخدام إبرة تشريح مصدئة، كان كافياً لصبغ الصبغيات (الكروموسومات) بطريقة مكثفة عما سواها من مكونات السيتوبلازم، كذلك لاحظ بيلنج Belling أن تسخين الشريحة بما عليها من نسيج مفرد تسخيناً هيناً يخفف أيضاً من اصطباغ السيتوبلازم.

ويمكن استخدام صبغة الأورسين **Orcien** أو صبغة اللاكمويد **Lacmoid** بدلاً من الكارمين، كما يستخدم حمض البروبيونيك **Propionic acid** بدلاً من حمض الخليك، وهو يعطي نتائج جيدة مع الأسيتوكارمين.

3 - Colchicine Method:

The purpose of the use of colchicine in the preparation of chromosomes is getting a lot of cells in the equatorial Metaphase as much as possible, because the chromosomes at this stage of the division has become the fully helical short and thick. **Colchicine** breaking the Spindle fibers in the Mitosis or prevent the chromosomes to clustered in the center of the cell during Metaphase, so this case is called **Arrested Metaphase** and hang the occurrence of Anaphase. chromosomes do not separate components to chromatids.

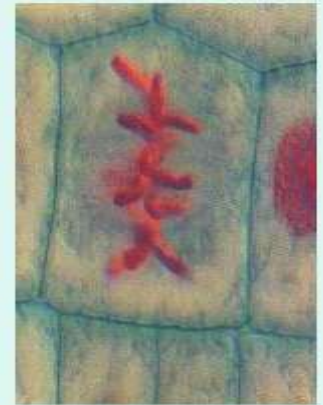


can be isolated for kaChromosomes align at the metaphase plate. 2. Cells can be arrested by microtubule inhibitors (e.g., colchicine). 3. Cells ryotype ...

3 - طريقة الكولشيسين Colchicine Method:

والغرض من استخدام مادة الكولشيسين في تحضير الصبغيات هو الحصول على الكثير من الخلايا في الطور الاستوائي Metaphase بقدر الإمكان، لأن الصبغيات في هذه المرحلة من الانقسام قد أصبحت حلزونية بصورة كاملة وقصيرة وغلظة. كما أن للكولشيسين تأثير في تحطيم خيوط المغزل Spindle في الانقسام غير المباشر أو منع تكوينها بحيث تتجمع الصبغيات في وسط الخلية عند الطور الاستوائي، لذا تسمى هذه الحالة بتوقيف الطور الاستوائي **Arrested Metaphase** ويتعطل حدوث الطور الانفصالي Anaphase ولا تتفصل مكونات الصبغيات إلى كروماتيدات كما يحدث عادة في الطور الانفصالي. وللكولشيسين أيضاً تأثيراً في استمرار عملية الحزنة أكثر مما في الحالة العادية، ولذلك تصبح الصبغيات أقصر من طولها العادي.

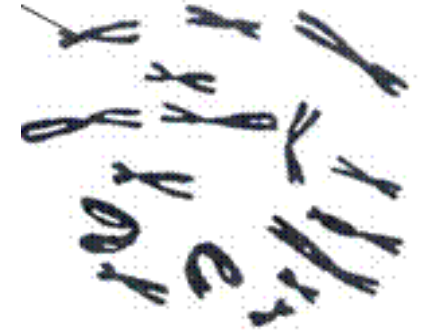
Plant Cell



metaphase

4 - The Karyotype:

Cells of different types of plants contain chromosomes with the different numbers , shapes and sizes. These chromosome characters can be seen when the cells of plants are in **Mitosis**, especially at **Metaphase** stage, chromosomes used to distinguish between different types of plants when studied in Cytogenetical methods. *Allium cepa* roots (onion) used as an example to show **the karyotype** (arrangement chromosomes), shapes sizes and the number of chromosomes.



The Karyotype of *Allium cepa*

ج. التركيب الكروموسومي (الهيئة الكروموسومية) : The Karyotype :

تحتوي خلايا أنواع النباتات المختلفة على صبغيات (كروموسومات) ذات أعداد وأشكال وأحجام مختلفة كما سبق أن شوهد ذلك في الطرق العملية السابقة، ويمكن ملاحظة هذه الكروموسومات عندما تكون خلايا هذه النباتات مستمرة في الانقسام غير المباشر، وبالأخص عند الطور الاستوائي **Metaphase** ، وعلى ضوء اختلافات هذه الكروموسومات أمكن التمييز بين أنواع النباتات المختلفة عند دراستها بالطرق الوراثية الخلوية **Cytogenetical methods** ، وسوف تستعمل جذور نبات البصل **Allium cepa** كنموذج لإظهار الترتيب الكروموسومي أو الهيئة الكروموسومية، ولمعرفة أشكال وأعداد الكروموسومات في هذا النوع من النباتات.

Preparation of Meiosis Division:

Meiosis produces pollens in the anthers. sometimes pre-open before bud opening, each bud contains a number of anthers. Cut one of the good anthers and squash in Charmin over a glass slide and then examined to find any stage of **Meiosis**, if any. **Meiosis in** anthers represents easier **Meiosis** in living organisms can be clearly seen, because of the easy access to dividing cells, and the presence of many different stages to be examined. There are several methods to prepare phases of meiosis, including:



ب - تحضير أطوار الانقسام الاختزالي Meiosis :

تحدث الانقسامات الاختزالية التي تنتج حبوب اللقاح في الأسدية أحياناً قبل تفتح البرعم الزهري ببعض الوقت، ويحوي كل برعم عدداً من المتوك، ويمكن انتزاع أحدها بالتشريح الجيد وهرسه في الكارمين الخلي فوق شريحة زجاجية ثم فحصه للعثور على أي طور من أطوار الانقسام إن وُجد.

يمثل الانقسام الاختزالي في المتوك أسهل انقسام اختزالي في الكائنات الحية يمكن رؤيته بوضوح، نظراً لسهولة الوصول إلى الخلايا المنقسمة، ووجود كثير منها في حالة انقسام، مما يوفر تتبع الأطوار المختلفة للانقسام.

Meiosis: consists of a series of phases

1 - **Prophase 1**: chromosomes appear single in **Leptotene**, followed by convergence and the adhesion of identical chromosomes in **Zygotene**, then duplication in **Pachytene** followed by separation of the chromosomes to chromatids in **Diplotene** then the formation of the spindle in **Diakinesis**.

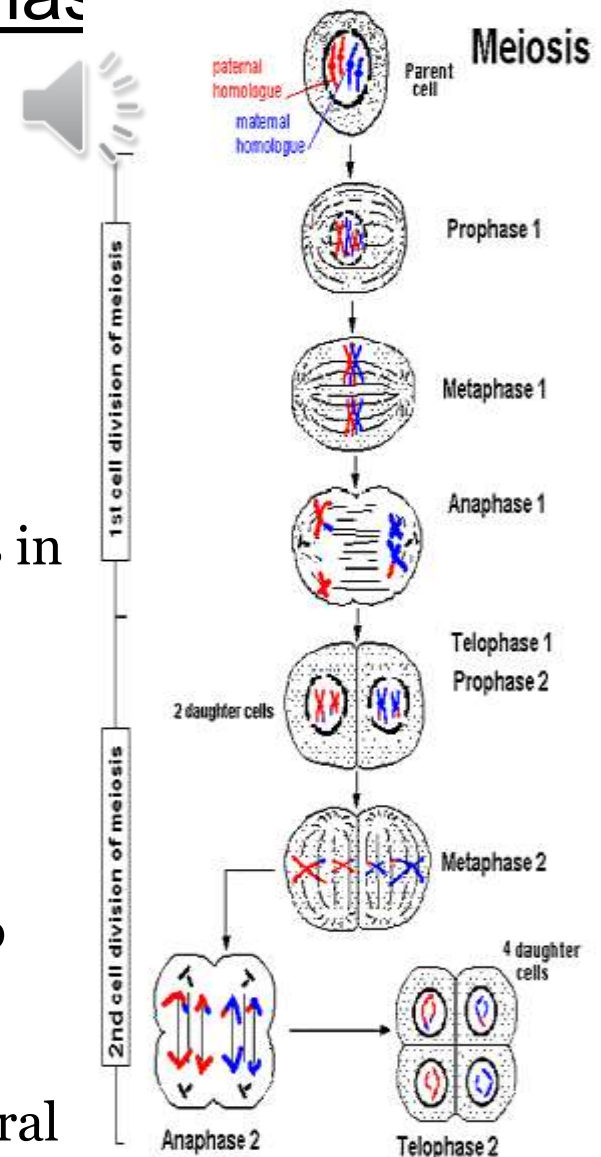
2 **Metaphase I**: Bilateral shrinking chromosomes in arranged in the center of spindle fibers.

3 - **Anaphase I**: the separation of identical chromosomes from each.

4 - **Metaphase II**: formation new regular bilateral chromosomes at the equator spindle.

5 - **Anaphase II**: The breakup of chromosomes to two groups.

6 - **Telophase II**: formation of four nuclei with a single chromosomal Haploid group. There are several methods to prepare phases of meiosis, including:



ويتألف الانقسام الاختزالي من سلسلة من الأطوار تبدأ بالتالي:

1 - **الطور التمهيدي الأول Prophase** وتظهر فيه خيوط الصبغيات منفردة في المرحلة القلادية **Leptotene**، ويتبعها تقارب والتصاق الصبغيات المتماثلة في المرحلة التزاوجية **Zygotene**، ثم ازدواجها في **المرحلة الضامة Pachytene** يليه مرحلة انفصال الصبغيات إلى كروماتيدتين في **المرحلة الإنفراجية Diplotene** ثم حلزنة وتكوين المغزل في المرحلة **التشتتية Diakenesis**.

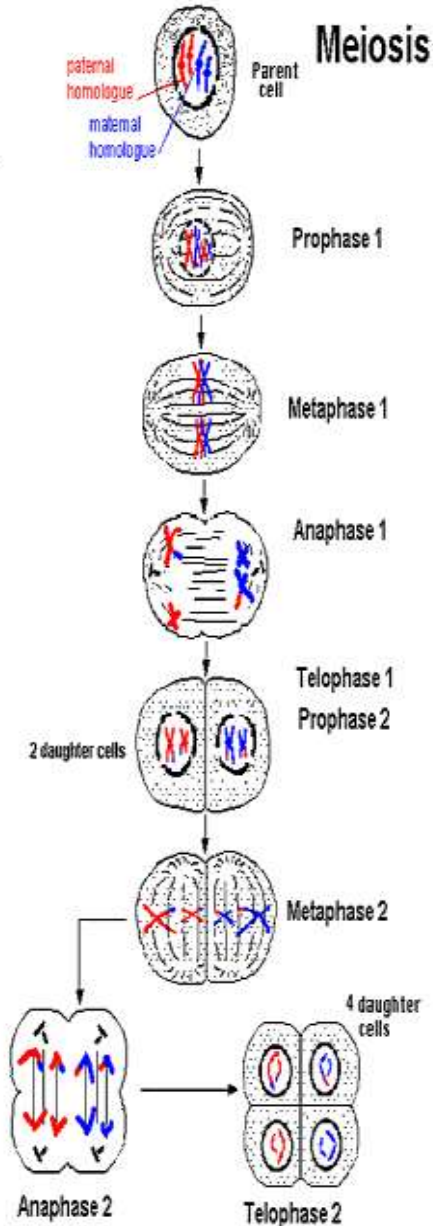
2 - **الطور الاستوائي الأول Metaphase I**: انتظام الصبغيات الثنائية المتقلصة في خط استواء المغزل.

3 - **الطور الانفصالي الأول Anaphase I**: وفيه يتم انفصال الصبغيات المتماثلة عن بعضها

4 - **الطور الاستوائي الثاني Metaphase II**: تكوين المغزلين الجديدين انتظام الصبغيات الثنائية في خط استواء المغزل،

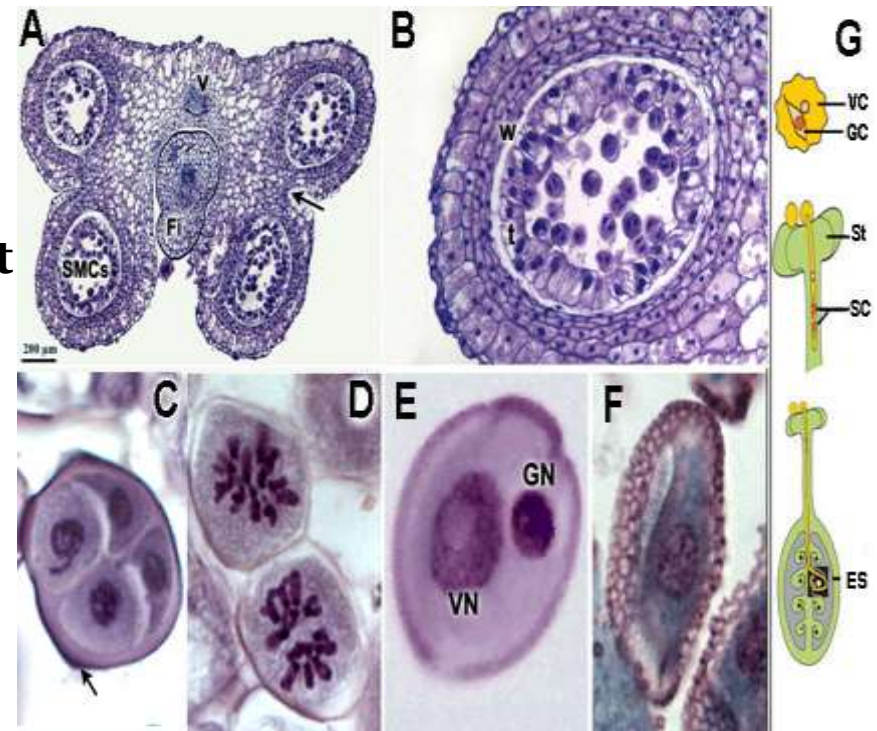
5 - **الطور الانفصالي الثاني Anaphase II**: يتم انفصالها، في الطور النهائي الثاني **Telophase II** ثم تكوين 4 أنوية ذات مجموعة صبغية أحادية **Haploid**.

وهناك عدة طرق لتحضير أطوار الانقسام الاختزالي، منها:

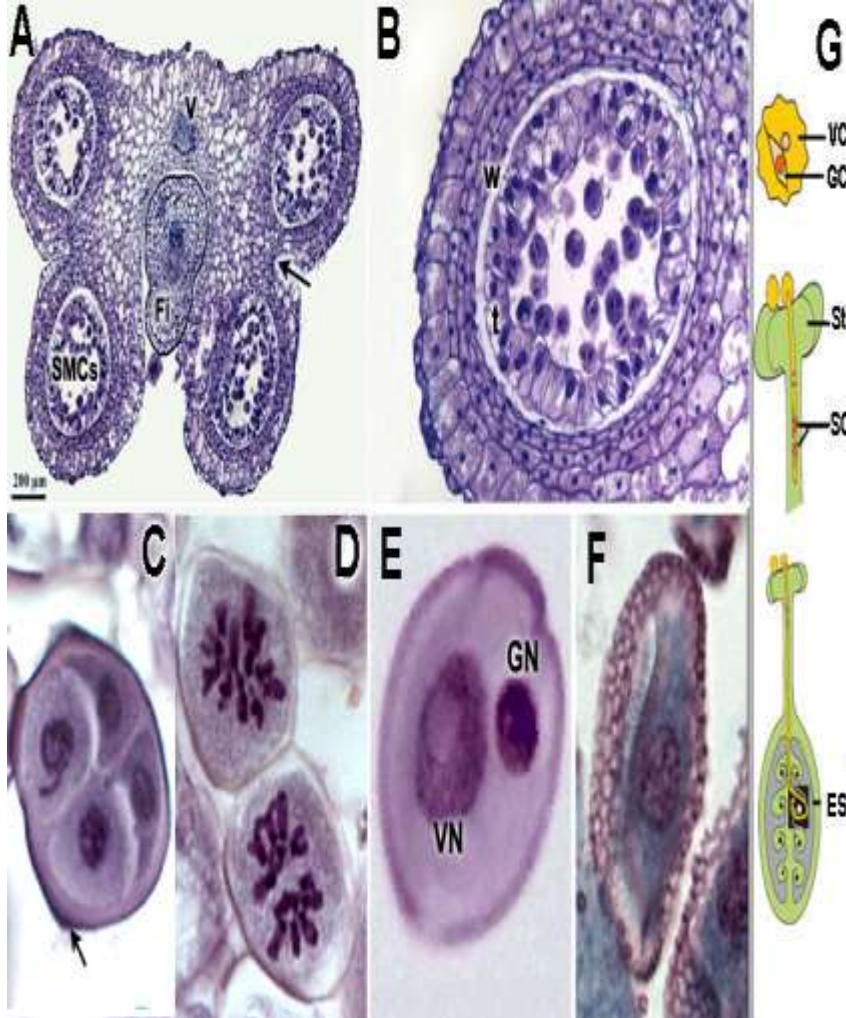


A – General Method

- 1 - Collect **floral buds** of plants to be studied.
- 2 - Squash in a drop of the selected stain, and then examine under a Light Microscope using a low-power (x 10) to see **Anthers** contain different stages of Meiosis,
- 3 - If desired phases clear. placed the cover slide. Gently heat with **Bunsen Burner** (avoid boiling dye), and then placed slide between two filter paper and press gently on the slide cover, and examine different **stages of Meiosis**, under a Microscope (High-power (x 40)).
- 4 – Place Wax around the edges of the cover slide for temporary mounting.



(أ) الطريقة العامة:



1. تجمع البراعم الزهرية للنباتات المراد دراستها بعد تمييزها عن البراعم الخضرية،
2. تهرس المتوك في قطرة من الصبغة المختارة وتفحص بعد ذلك تحت المجهر باستخدام القوى الصغرى (Low power (x10 لمعرفة هل هذه المتوك Anthers تحتوي على الأطوار المرغوب دراستها،
3. إذا كانت الأطوار المرغوب دراستها واضحة فبعد إزالة بقايا المتوك يوضع غطاء الشريحة وتسخن الشريحة برفق فوق لهب مصباح كحولي (مع تجنب غليان الصبغة، ثم توضع بعد ذلك بين طبقات من ورق الترشيح ويضغط برفق على غطاء الشريحة، ويمكن فحص الأطوار المبينة
4. يوضع شمع التحليق حول حواف غطاء الشريحة للحصول على تحميل مؤقت.

B – Belling Method: *We have studied previously*

Belling method proposed by **Belling** in 1926 and it still used for the study of chromosomes during Meiosis in preparation of pollen grains using Iron-Acetocarmine dye (see practical).



JOHN BELLING, "THE IRON-ACETOCARMINE METHOD OF FIXING AND STAINING CHROMOSOMES," The Biological Bulletin 50, no. 2 (February 1926): 160-162. DOI: 10.2307/1536680

(ب) طريقة بلنج Belling:

بالرغم من قدم هذه الطريقة التي اقترحها بلنج عام 1926م إلا أنها مازالت تستخدم حتى الآن لدراسة الكروموسومات أثناء الانقسام الاختزالي للخلايا المولدة (الأمية) لحبوب اللقاح باستخدام صبغة الكارمين الخلي الحديدي

Acetocarmine Iron-

c- Preparation of Pollen Grains :

There are three methods followed for the preparation of pollen grains depending on the quality of microscopic examination:

- 1 – Preparation of pollen grains, examined under a Light Microscope.
- 2 - Preparation of pollen grains, examined under a scanning Electron Microscope.
- 3 - Preparation of pollen grains, examined under the Transmission Electron Microscope.



ج. تحضير حبوب اللقاح Preparation of Pollen Grains :

هناك ثلاث طرق متبعة لتحضير حبوب اللقاح تبعاً لنوعية الفحص المجهرى، وهي:

1. تحضير حبوب اللقاح للفحص تحت المجهر الضوئي.
2. تحضير حبوب اللقاح للفحص تحت المجهر الماسح.
3. تحضير حبوب اللقاح للفحص تحت المجهر النافذ.

1 - Preparation of pollen grains examine under a Light Microscope.

Preparation of pollen in one of two Methods:

A - Erdtman Method (1971)

B - Punt Method 1962 and Hou, 1969).



1 - تحضير حبوب اللقاح للفحص تحت المجهر الضوئي

تحضير حبوب اللقاح بإحدى الطريقتين التاليتين:

أ - طريقة Erdtman (1971)

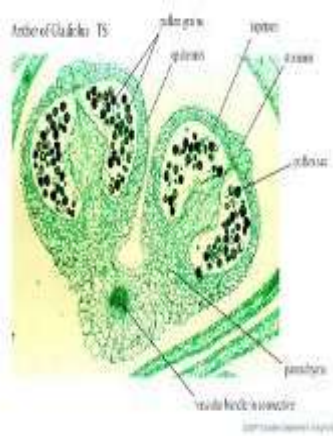
ب - طريقة بونت Punt 1962 م وهيو Hou ، 1969 م)



A - Erdtman Method (1971)

Acetolysis mixture (Erdtman 1971)

Add Acetolysis mixture to pollen when preparing (mixture consists of 9 parts of Acetic Anhydride + 1 part of Concentric Sulfuric Acid).

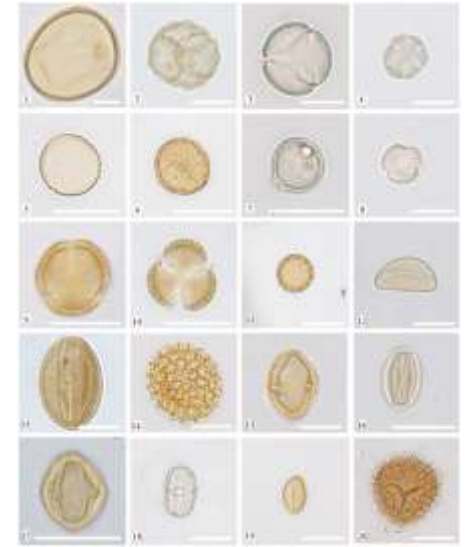


1- طريقة الخل المحلل Acetolysis mixture (عن Erdtman 1971)

إضافة مزيج الخل المحلل Acetolysis mixture إلى حبوب اللقاح عند التحضير)
يتكون المزيج من 9 أجزاء من أنهيدريد الخليك Acetic anhydride + 1 جزء من حمض
كبريتيك مركز (

B - Punt Method (1962 and Hou, 1969).

1 - Add Methylated spirit solution (ethyl alcohol mixed with alcohol Mathele) to the pollen when preparing and then drop by drop to Acetolysis Mixture, which force mixture to move in the form of a loop to the edge of a glass watch, leaving the pollen in the middle. Add more Methylated spirit solution to pollen so not to dry out at this stage.



Photomicrographs of selected pollen grains recovered from the honey samples



ب - الطريقة الثانية: (عن بونت Punt 1962 م وهيو Hou ، 1969 م).

إضافة مزيج الخل المحلل **Acetolysis mixture** ومحلول الكحول الأيثيلي الممثل **Methylated spirit** (كحول أيثيلي ممزوج بكحول ميثيلي) إلى حبوب اللقاح عند التحضير وذلك قطرة قطرة إلى مركز مزيج الخل المحلل المتبقي، حيث يدفع المزيج إلى التحرك على شكل حلقة إلى حافة زجاجة الساعة، تاركاً حبوب اللقاح في الوسط. يضاف مزيداً من محلول الكحول الأيثيلي الممثل إلى حبوب اللقاح حتى لا تجف في هذه المرحلة.