

Plant Microtechnique

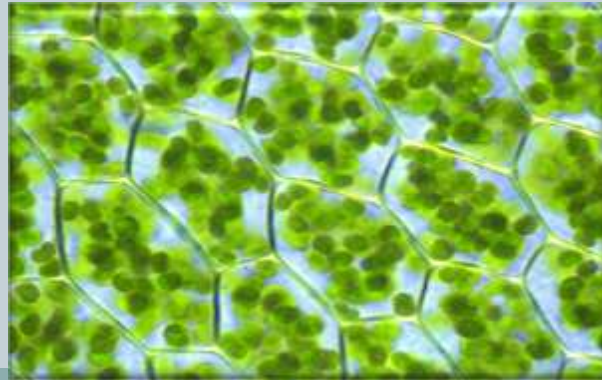
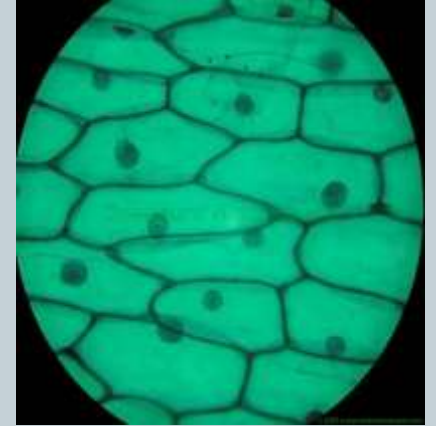
BOT 213



التحضيرات المجهرية النباتية

213 نبت

محاضره 4



2 - Smear method:

- This preparation aims to spread the individual cells and cell organelles suspended in a liquid and make them in a homogeneous single layer (membrane) on a glass slide in order to be killed and fixed at once without showing Artifacts. Generally all the cells or cell organelles which present stick on the slide and then no need for adhesives to fix them on the slide, because adhesives may be pigmented and give Artifacts.
- Dehydrate and stain the membrane (note that these last two stages are causing the loss of some cells or organelles of the membrane.

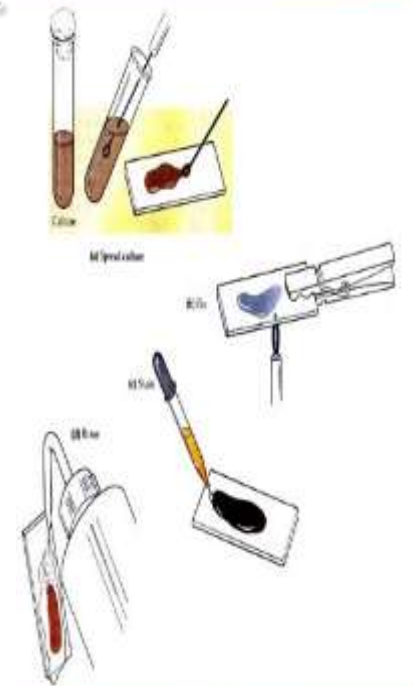
This method used for the preparation of plant specimens, their bodies consist of a single cell, like bacteria, some fungi and algae, isolated cells or cell organelles, e.g. Plastids and Mitochondria.



ثانياً . طريقة الغشاء (المسحة) Smear method

يهدف هذا التحضير إلى نشر الخلايا أو العضيات المعلقة في سائل وجعلها في طبقة واحدة متجانسة (غشاء) على شريحة زجاجية من أجل قتلها وثبيتها في آن واحد دون تشويهها أو إظهار حقائق مصطنعة Artifacts، وعموماً فإن جميع الخلايا أو العضيات التي تنشر تلتصق على الشريحة ومن ثم فلا داعي لاستعمال المواد اللاصقة لثبيتها على الشريحة، لأن هذه المواد اللاصقة قد تصطبغ وتعطي حقائق مصطنعة.

وبعد عمل الغشاء يمكن سحب الماء من العينة وصبغها، (الأخيرتين تسببان فقدان بعض الخلايا أو العضيات من الغشاء)، وتستخدم هذه الطريقة لتحضير العينات النباتية التي تتكون أجسامها من خلية واحدة كالبكتيريا وبعض الفطريات والطحالب أو الخلايا المعزولة أو عضيات خلوية كالبلاستيدات والأجسام السبحية وغيرها.



3 - Whole mount:

This method is used for minute plant specimens (small size) that do not need cutting or sectioning, e.g., filamentous algae, algal thallus, small leaves, parts of the Large leaf, stripped leaf and stem epidermis, hairs or pollen and parts of Flower.



ثالثاً - طريقة العينة الكاملة Whole mount :

تستخدم هذه الطريقة للعينات النباتية الدقيقة (الصغيرة الحجم) التي لا تحتاج إلى تجزئتها أو عمل قطاعات، ومن هذه العينات على سبيل المثال الطحالب الخيطية، والطحالب الثالوسية، وأجزاء من الأوراق كسلخة من البشرة أو الشعيرات أو حبوب اللقاح والأوراق الصغيرة أو أجزاء منها وأجزاء الزهرة غيرها.

Preparation of microscopic algae :



This method includes Isolation and Purification Microscopic algae, unicellular or filamentous, grow in **fresh and sea water, soil and air**. It should be noted that these methods can be used to prepare the other **Blue green algae** and **Plankton**. This method needs a lot of materials and the necessary tools and equipment.

تحضير الطحالب المجهرية وفحصها:

هذه الطرق تشمل عزل **Isolation** وتنقية **Purification** الطحالب المجهرية **Microscopic algae** وحيدة الخلية أو الخيطية حقيقية النواة التي تنمو في بيئات مختلفة كالمياه العذبة والمياه المالحة والتربة والهواء. هذه الطرق يمكن استخدامها لتحضير الطحالب الأخرى كالطحالب الخضراء المزرققة **Blue green algae** (cyanobacteria) والهائمات **Plankton** وغيرها. وتحتاج هذه الطرق إلى الكثير من المواد والأدوات والأجهزة الضرورية.



Isolation microscopic algae:

The term **Algal Unit** used for a **single cell** or **colony** or **filamentous algae** or **thallus** or **reproductive parts**. The isolation of **Algal unit** on suitable **media** for growth also be suitable to form a colony. Best methods: **Capillary pipette** and **Streak plate**.

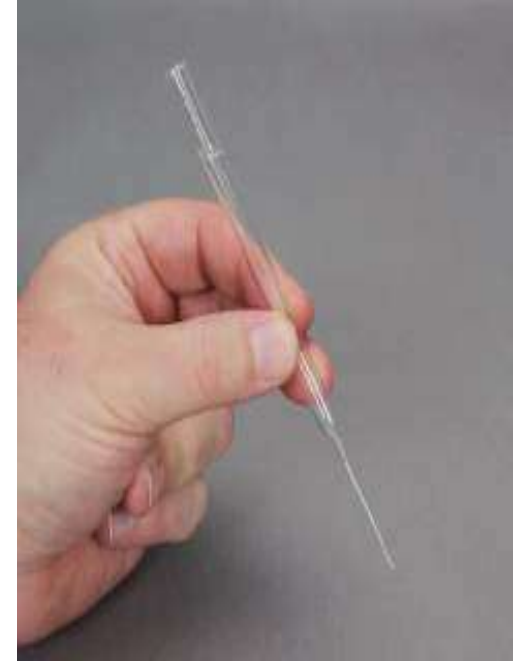
أ - طريقة عزل الطحالب المجهرية :

يستعمل لفظ وحدة **Unit** طحلبية للدلالة على الخلية الواحدة أو المستعمرة أو الطحالب الخيطية أو الأجزاء الثالوسية أو الأجسام التكاثرية، وإن عزل الوحدة الطحلبية على بيئة مناسبة للنمو تكون أيضاً مناسبة لتكوين مستعمرة، وقد وصفت عدة طرق لعملية العزل ولكن أفضلها هي طريقتا الماصة الشعرية **Capillary pipette** والطبق المخطط **Streak plate**.



(1) Sterile Pasteur type pipette

- Put **Capillary pipette** near the liquid above the algal unit, then dunk capillary tip and fluid and the algal unit will enter the **Capillary pipette** or pressing on the rubber, if necessary, to do so.

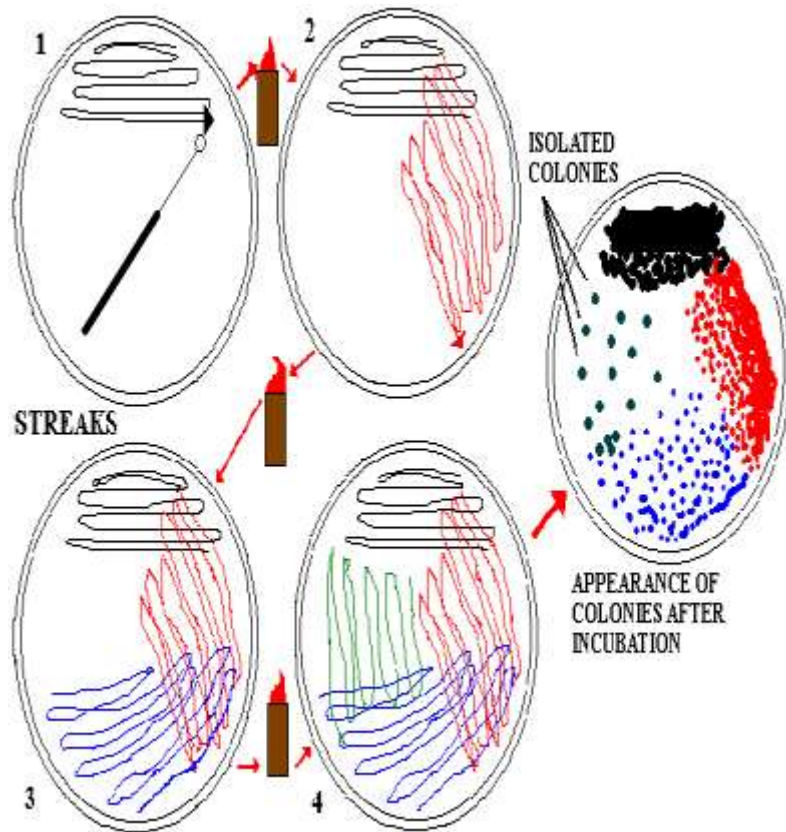


طريقة ماصة باستير المعقمة

توضع الماصة الشعرية بميل بقرب السائل وفوق الوحدة الطحلبية، ثم يغمس طرف الماصة الشعرية وبخاصية الشعرية سوف يدخل السائل والوحدة الطحلبية إلى الماصة أو بالضغط على الجزء المطاطي إذا دعت الضرورة لذلك.

(2) Streak plating:

Algal units of less than 10 micrometers in diameter be easily isolated using the **Streak plate** to solid media in Petri dishes.



الطبق المخطط Streak plating

الوحدات الطحلبية التي تقل أقطارها عن 10 ميكرومترات يكون من السهل عزلها باستخدام عملية الطبق المخطط للبيئة الصلبة في أطباق بتري.

3) Isolation of Agar



Algal units Can be isolated from the rest of other contaminated organisms processed from the surface of agar or allowing them to isolate themselves away from other types of undesirable algae.

(3) العزل على الأجار Isolation of Agar

يمكن عزل الوحدات الطحلبية عن بقية الكائنات الأخرى الملوثة بمعالجتها من على سطح الأجار أو بالسماح لها بعزل نفسها بزحفها بعيداً عن أنواع الطحالب الأخرى غير المرغوبة

4) Isolation from atmosphere:



The isolation of algal units from atmospheric air an easy task, as the origin of the soil. Brown, Larsion and Bold in 1964 suggested several simple methods to collect and isolate the algae from the atmosphere. Luty and Hochaw (1967) described quoting after Osteen (1983), a successful method to isolate the algae from the atmosphere.

(4) العزل من الهواء الجوي Isolation from atmosphere :

إن عزل الوحدات الطحلبية من الهواء الجوي مهمة سهلة، حيث إن منشأها من التربة، ولقد اقترح براون وآخرون عام 1964م Brown, Larsion and Bold عدة طرق بسيطة لتجميع وعزل الطحالب من الهواء الجوي، كما وصف لوتي وهوشاو (1967م) Luty and Hoshaw نقلاً عن أستين (1983م) طريقة ناجحة لعزل الطحالب من الهواء الجوي.

A- Isolation from atmosphere Method



- a - Prepare agar medium petri dishes.
- b - Exposed dishes to air in a vertical position directly to the atmosphere for 5-10 minutes from a car moving at 50-70 kilometers per hour.
- c - Covered invert and incubate the exposed dishes for 2-6 weeks under suitable conditions for the growth of algae
- d - follow the steps for streak plating.

ا- العزل من الهواء الجوي

ا - حضر بيئة الآجار قي طبق بتري

ب - عرض الطبق مكشوفاً للهواء الجوي وبوضع عمودي لمدة 5 – 10 دقائق بسرعة تعادل سيارة تسير بسرعة 50 – 70 كيلو في الساعة.

ج - غط وأقلب الطبق ثم حضن الأطباق لمدة 2 - 6 أسابيع في ظروف مناسبة لنمو الطحالب.

د - أتبع خطوات طريقة الطبق المخطط السابقة.

B- Purification:

Often some physiological studies, Biochemistry on algae need pure culture. The isolation of **algal units** by **Capillary pipette** or **Streak plate** methods be used to liberated **algal units** from pollutants. Centrifugation and Ultrasonic vibrations can separate contaminated objects from algal units.

1 – Centrifugation:

Purification process conducted by repeat washing. transfer algal units through the liquid environment and centrifugation

ب . عملية التنقية Purification :

كثيراً ما تُجرى بعض الدراسات الفسيولوجية والكيمياء حيوية على الطحالب الدقيقة، والتي تحتاج إلى مزارع نقية، وأن طريقة عزل الوحدات الطحلبية بعملية الطبق التخطيطي قد تمكن من إجراء هذه الدراسات مباشرة، (الوحدات الطحلبية المعزولة بطريقة الماصة الشعرية ربما يحدث معها تلوث بالكائنات الأخرى التي تصاحب الوحدات الطحلبية) ولكن يمكن فصل تلك الكائنات الملوثة طبيعياً باستخدام الذبذبات فوق الصوتية **Ultrasonic vibration**، كما قد يتم التخلص من هذه الكائنات الملوثة والمصاحبة للوحدات الطحلبية إما بالقتل أو بتثبيط النمو بمواد كيميائية.

1. طريقة الطرد المركزي :

تجرى عملية التنقية بالغسيل وبتكرار نقل الوحدات الطحلبية خلال البيئة السائلة والطرد

المركزي

2 - Ultrasonic :

This method is described by Brown and shows (1962). Used Ultrasonic water bath with a low-power 90 K cycles / second. **Algal units** will be separated from pollutants .



2 . المعاملة فوق الصوتية Ultrasonic Treatment :

لقد وصف هذه الطريقة كل من براون وبيشوف (1962م) Brown and Bischoff ، ويستخدم لهذه الطريقة حمام مائي فوق صوتي Ultrasonic water bath بقوة منخفضة 90 كيلوسيكال في الثانية (90 K cycles/s) فيتم تخلص الوحدات الطحلبية من الملوثات طبيعياً كما أن الوحدات الطحلبية تتحرر من الملوثات بتكرار عمليتي الغسيل والطرْد المركزي والذي يؤدي إلى الحصول على مزرعة طحلبية نقية.

4 - Preparation of higher plant samples:

To prepare a complete samples of higher plants.
small leaves or **small parts of large leaves** or **flower parts** or **stripped leaf and stems epidermises**, and **other parts**. Two methods include:



4 - تحضير عينات النباتات الراقية:

يمكن تحضير عينات كاملة من النباتات الراقية كالأوراق الصغيرة أو أجزاء من الأوراق الكبيرة أو أجزاء الزهرة أو سلخات بشرة الأوراق والسيقان وغيرها، ومن هذه الطرق ما يلي:

A - Clearing method:



This technique is suitable for the preparation of the **whole samples**. proposed by **Shobe and Lersten (1967)** which demonstrated extraordinary ability to prepare all of the **fresh specimens** or **dry samples** that taken from **Herbarium** it can be done to plant leaves as follows

أ - تحضير العينة بالترويق Clearing method :

وهذه التقنية المناسبة لتحضير العينات الكاملة اقترحت من قبل شوب وليرستين (1967م) Shobe and Lersten والتي أثبتت قدرة فائقة على تحضير كل من العينات الحية الطازجة أو الجافة المأخوذة من المعشبة Herbarium. ويمكن عملها للأوراق النبات كما يلي

Leaf fragments :

1 – Place a fresh rectangular **leaf fragment** about 0.5 cm on a slide with its upper or lower surfaces against the slide.

2. Place a drop of **chloral hydrate fluid** and carefully balance a cover glass.

3. Fill in the space under the **cover glass** with **clearing fluid** and heat gently for few seconds, cool it and

observe **the specimen** with low magnification of a bright-field microscope.

قطع الأوراق :

1- ضع قطعة مستطيلة ورقة طازجة حوالي 0.5 سم على شريحة السطح العلوي أو السفلي تجاه الشريحة.

2. ضع قطرة من السوائل الهيدرات كلورال Chloral hydrate ثم ضع غطاء الزجاج بتوازن وبغناية.

3. املا الفراغ تحت غطاء الزجاج بسائل الترويق وسخن بلطف لبضع ثوان، قم بتبريده وافحص العينة بالمجهر تحت قوة التكبير الصغرى واضاءة جيدة.

B - Stripped epidermis:

To study the **characteristics** of the **Epidermal cells**. There are several methods to prepare the plant samples, the simplest is performed stripping the epidermis layer of the leaf or stem of the plant, to study the types of **epidermal cells**, **stomata** , **trichomes** and **Cuticle**.



ب - تحضير سلخات بشرة النبات Epidermal strips :

لدراسة صفات خلايا البشرة **Epidermal characters** هناك عدة طرق لتحضير العينات النباتية، وأبسط هذه الطرق هي التي تجرى بسلخ طبقة البشرة نفسها من على العضو النباتي كالورقة أو الساق لدراسة أنواع خلايا البشرة والثغور **Stomata** والشعيرات **Trichomes** والأدمة **Cuticle**

Stripped epidermis Method:

- 1- Take a fresh leaf of a plant.
2. Stretch and break it by applying pressure.
3. While breaking it, keep it stretched gently so that some peel projects out from the cut.
4. Remove this peel and put it in a Petri dish filled with water and add a few drops of safranin.
5. Wait for few minutes and then transfer it onto a slide.
6. Gently place a cover slip over it.
7. Observe under microscope. When observed under Microscope. **Outermost layer of cells called EPIDERMIS (dermal tissue) is seen.**



Leaf Epidermis

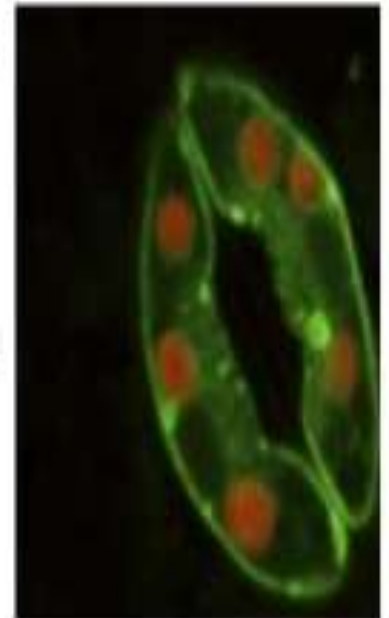
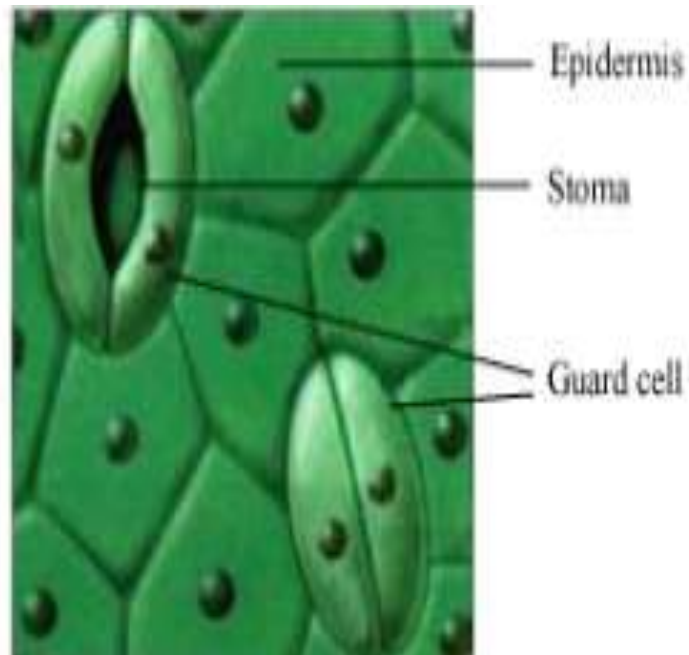
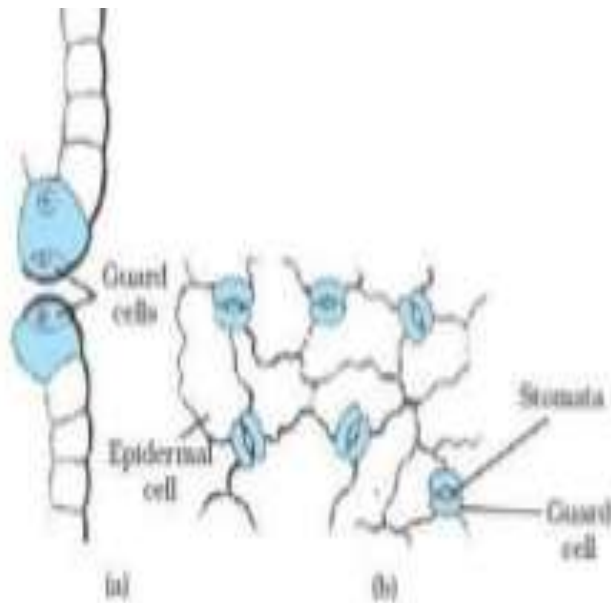




1- طريقة تحضير سلخه للبشره :

- 1- خذ ورقة نبتة طازجة.
2. قم بمدّها وكسرّها عن طريق الضغط
3. أثناء كسرّها ، حافظ على شدّها برفق حتى تخرج القشره من القطع
4. انزع هذه القشره وضعه في طبق بتري مملوء بالماء وأضف بضع قطرات من السافرانين.
5. انتظر بضع دقائق ثم انقله إلى شريحة
6. ضع غطاء الشريحة فوقها برفق
7. افحصها تحت المجهر. يلاحظ طبقة خارجية من الخلايا تسمى EPIDERMIS (البشره)

Leaf Epidermis



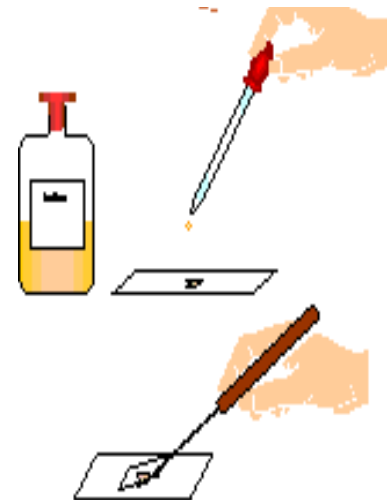
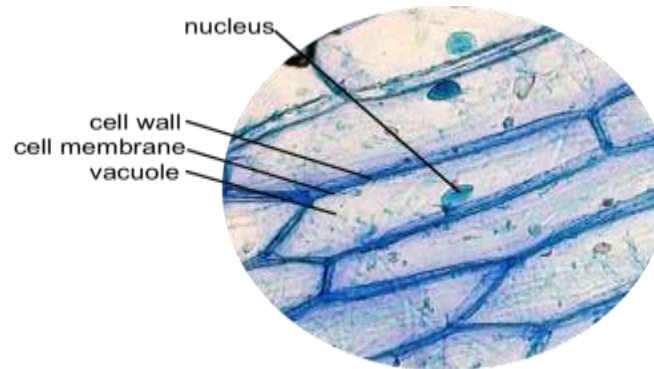
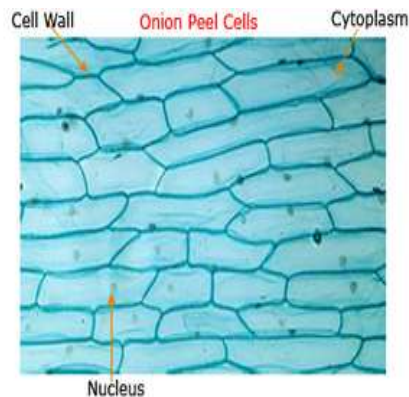
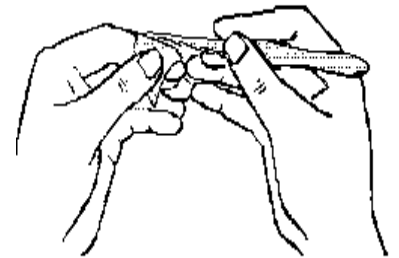
Stripped epidermis of onion:



1. make wettable a perfectly clean slide (pass it through the flame of a spirit lamp, or a Bunsen burner, a couple of times on both sides).
2. put a drop of water (or stain) in the center, and lay on it the sample, if possible with the face that was attached to the mesophyll downwards.
3. Add a small drop of water (or stain) so that it does not dry out.
4. Holding one bar with forceps, with a sharp scalpel cut with care next to the bar, freeing that end of the peel.
5. Carefully apply the coverslip with common precautions and if it seems necessary, absorb a little liquid so that the weight of the coverslip flattens the epidermis.
6. The result is a peeling of a very good size of **Onion Epidermis**.



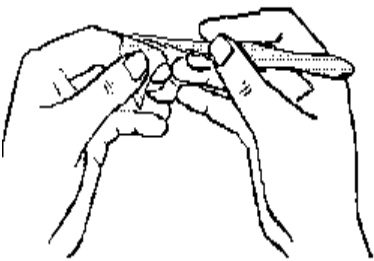
Detach epidermis from leaf



2- تحضير سلخات بشرة البصل Stripped : epidermis of onion



Detach epidermis from leaf



1- حضر شريحة نظيفة تماما ويمكن تبليلها (مررها على لهب مصباح كحولي، أو الموقد بنسن بضع مرات على كلا الجانبين).

2 - ضع قطرة من الماء (أو صبغة) في المركز، ضع العينة على الوجه المقابل للنسيج الوسطي. (الذي كان متصل بالنسيج الوسطي) .

3 - إضف قطرة صغيرة من الماء (أو صبغة) بحيث لا تجف.

4 - امسك العينة بيدك أو بملقط ويمكن اتخاذ ساتر للحماية، واقطع بمشرط حاد مع الحرص لتحرير

جزء بسيط للغاية من البشرة ثم قم بنزعها.

5 - ضع غطاء الشريحة بالطريقة الشائعة ويمكن سحب القليل من السائل من تحت الغطاء بحيث يتنزن الغطاء وتصبح العينة مسطحة .

6 - ستحصل على جزء جيد من بشرة البصل جاهزة للفحص تحت المجهر الضوئي.

