

Plant Microtechnique

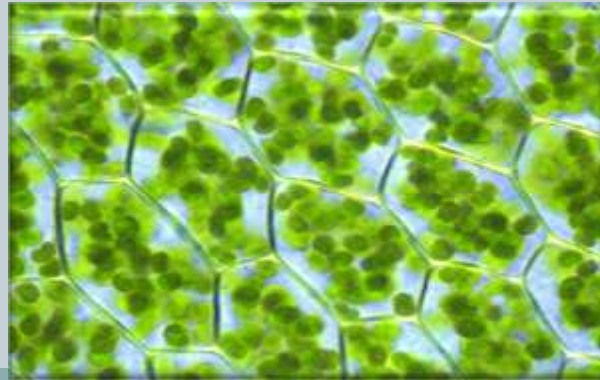
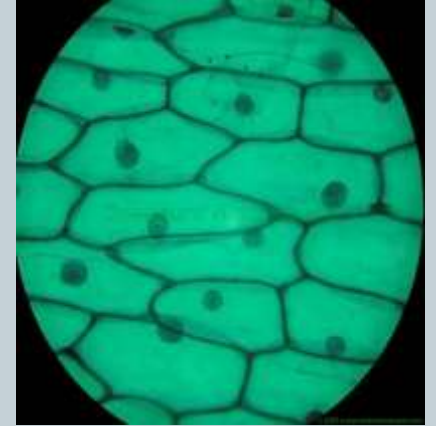
BOT 213



التحضيرات المجهرية النباتية

213 نبت

محاضره 5



4 - Maceration Method:



When studying individual or isolated cells, the transverse or longitudinal sections of the samples are not enough to clarify those cells, so Maceration Method used. Various solutions are used to separate a Plant samples into its individual cells. These solutions dissolve or weaken the **middle lamella** so that the cells are easily shaken or teased apart.

رابعاً . طريقة التفكيك Maceration Method

عند دراسة الخلايا المفردة أو المعزولة فإن القطاعات العرضية أو الطولية للعينات لا تكفي لتوضيح تلك الخلايا، ولذا يستعان بتفكيك خلايا وأنسجة العينة إلى خلايا منفصلة (معزولة) عن بعضها البعض، ويتم ذلك بإذابة **مادة الصفيحة الوسطى** التي تربط بين الجدر الخلوية وكذلك المواد الإضافية الأخرى، وتسمى هذه الطريقة بالتفكيك حيث يتم فيها فصل الخلايا بعضها عن بعض دون إلحاق الضرر بجدرها، وهناك عدة طرق للتفكيك تختلف حسب المواد المستخدمة، ومنها :

1 – Boiling water:

This method is used to macerate samples of a few soft woody tissues and cells and its cell walls consist of Pectic and cellulosic substances or separating limited layers of tissue, for example, Parenchyma tissues

أ - الماء المغلي : Boiling water :

تستعمل هذه الطريقة لتفكيك العينات النباتية الطرية قليلة الأنسجة الخشبية والتي تتكون جدر خلاياها من مواد بكتية وسليولوزية أو فصل طبقات محدودة من النسيج البرنشيمي مثلاً

2 - 5% sodium or potassium hydroxide solution:

This method is used to separate individual cells, Parenchyma tissues or lignified elements within Parenchyma tissues or a group of a few lignified cells.

ب - محلول 5 ٪ هيدروكسيد الصوديوم أو البوتاسيوم :

تستخدم هذه الطريقة لفصل خلايا الأنسجة البرنشيمية أو العناصر الملجننة الفردية المغمورة في النسيج البرنشيمي أو مجموعة من الخلايا قليلة التلجن.

3 - 10% chromic acid solution and 10% nitric acid

This method is used to macerate some of the tissue that consists of a single layer of cells as Almgannh in his palace some seeds or group of cells Almgannh submerged in the textile Albornchimi.



ج - محلول 10 % حمض الكروميك و 10% حمض النتريك :

تستعمل هذه الطريقة لتفكيك بعض الأنسجة التي تتكون من طبقة واحدة من الخلايا الملجننة كما في قصرة بعض البذور أو مجموعة من الخلايا الملجننة المغمورة في النسيج البرنشيبي.

4 -SCHULTZE'S MACERATION METHOD.



Schultze used strong nitric acid and potassium chlorate:

- 1 - Put the material, which should be in very small pieces, into a test-tube.
- 2 - pour on just enough **nitric acid** to cover it, and then add a few crystals of **potassium chlorate**.
- 3 - Heat gently until bubbles are evolved, and let the reagent act until the material becomes white. Four or five minutes should be sufficient. The fumes are disagreeable and are very injurious to microscopes.
- 4 - Pour the contents of the tube into a dish of water. After the material is thoroughly washed in water, it may be teased with needles and mounted, or it may be put into a bottle of water and shaken until many of the cells become dissociated.

د - طريقة سكالترز للتفكيك : Schultz's maceration process

تستعمل طريقة سكالترز لتفكيك الأنسجة التي تحتوي جدر خلاياها على نسبة كبيرة من مادة الجنين (جدر ملجنة) وهي طريقة سريعة وفعالة ويمكن إجراؤها أثناء الدروس العملية.

1 - ضع العينة، المقطعة قطع صغيرة جدا، في أنبوب اختبار.

2 - صب عليها ما يكفي من **حمض النيتريك** للتغطية، ومن ثم إضافة عدد قليل من **بلورات كلورات البوتاسيوم**.

3 - سخن بلطف حتى تصاعد الفقاعات، اترك الكاشف يعمل لأربع أو خمس دقائق حتى تصبح العينة بيضاء. "الأبخرة كريهة الرائحة وهي ضارة جدا للمجاهر".

4 - صب محتويات الأنبوب في طبق يحتوي على الماء واغسل جيدا بالماء، ويمكن تحريكها بالابرة، أو قد توضع في زجاجة من الماء - **علبة ماء** - وتهتز حتى تنفصل الخلايا.

5 - Sectioning Method or Microtomy:

Preparation of large botanical specimens that can not be examined directly under Light Microscope must be cut into small pieces, involve to **schedules appropriate time**, and **use of certain solvents**, according to the nature of these samples. It is the first step to prepare a slide of the plant material for microscopic investigation. **Fresh** or **preserved materials** are cut into thin sections at suitable plane. It is essential to cut **section thin enough** to observe the details at the required level. **Hand sectioning is carried out with sharp razor**. Uniform section of given thickness can be obtained by special Machines called **Microtome**. Prior to microtome sectioning, material is processed which involves the following steps:

- | | |
|---------------|------------------|
| 1 – fixation. | 2 – dehydration. |
| 3 – Clearing | 4 – Sectioning |
| 5 – embedding | 6 – Staining |
| 7 - Mounting | |



5 - طريقة القطع أو الميكروتوم:

إعداد العينات النباتية الكبيرة التي لا يمكن فحصها مباشرة تحت المجهر الضوئي يجب أن تقطع إلى قطع صغيرة، وتستخدم بعض المذيبات، وفقا لطبيعة هذه العينات وفقا جدول زمني معين . هذه هي الخطوة الأولى لإعداد شريحة من العينات النباتية للفحص المجهرى . يتم قطع العينات الطازجة أو المحفوظة ل اجزاء رقيقة لمشاهدة التفاصيل في المستوى المطلوب او القوة المطلوبه بوضوح . يتم إجراء التقطيع والتجزئ باستخدام اله حاده قد تطون مشرط او شفره حاده . يمكن الحصول على قسم موحد من سمك معين من قبل آلات خاصة مثل ادوات التشريح .

خطوات طريقة الميكروتوم :

- 1 - التثبيت.
- 2- نزع الماء.
- 3 - الترويق والتشذيب
- 4 - التقطيع
- 5- الطمر
- 6- الصبغ
- 7 - التحميل

FIXATION

التثبيت

FIXATION:



FIXATION is the process of separating and killing tissues and save them as much as possible to the status during the life, which kept the cellular components fixed without any change or damage. It has the ability to kill and fix tissues and cells of samples quickly before the change processes that occur as a result of **Autolysis** by certain enzymes or activity of micro-organisms.

FIXATION is rapid coagulation components of tissues and cells at the status that they were before death. The best **Fixatives** characteristics by the following :

التثبيت : هو عملية فصل وقتل الأنسجة وحفظها قدر الإمكان بحالة جيدة، والتي تبقى المكونات الخلوية ثابتة دون أي تغيير أو ضرر. عملية التثبيت لديها القدرة على قتل الأنسجة وخلايا العينات بسرعة قبل عمليات التغيير التي تحدث لها نتيجة **التحلل التلقائي** من قبل بعض الإنزيمات أو نشاط الكائنات الحية الدقيقة.

التثبيت هو التخثر السريع لمكونات الأنسجة والخلايا في الحالة التي قبل الموت.
أفضل المثبتات خصائص يجب ان تكون كالتالي :

The fixatives must have the following properties:

1. It should prevent autolysis & putrefaction of the cell.
2. It should penetrate evenly and rapidly.
3. It should harden the tissues
4. Increase the optical density
5. Should not cause shrinkage or swelling of the cells
6. Must not react with the receptor sites & thus must not interfere with the staining procedure.
7. It must be cheap and easily available
8. Good fixative is most important factors in the production of satisfactory results in histopathology. Following factors are important:



- 1- يجب أن تمنع الانقسام الذاتي والتعفن للخلية.
 2. يجب أن تخترق الأنسجة بالتساوي وبسرعة.
 3. يجب أن تصلب الأنسجة
 4. زيادة الكثافة البصرية وإيضاح الرؤية للأنسجة تحت المجهر .
 5. لا ينبغي أن يسبب انكماش أو تورم أو انتفاخ في الخلايا
 6. يجب ألا تتفاعل مع مواقع المستقبلات ، وبالتالي يجب ألا تتداخل مع إجراءات الصبغ.
 7. يجب أن تكون رخيصة ومتاحة بسهولة.
 8. المثبت الجيد من أهم الأسباب لإنتاج عينات ونتائج مرضية في التشريح.
- أهم العوامل للمثبتات لإعطاء نتائج جيدة :**

Continued: Aims of Fixation

1. Fresh samples
2. Proper penetration of sample tissue by fixatives
2. Correct choice of fixatives



No fixative will penetrate a piece of tissue thicker than 1 cm.
For dealing with specimen thicker than this, following methods are recommended:

1. Solid organ: (e.g. ,stem, root ,and wood)

Cut slices as necessary as but not thicker than 5 mm.



1. العينات تكون طازجة
2. اختراق المثبت لأنسجة العينة بشكل صحيح
3. الاختيار الصحيح للمثبتات

ليس هناك مثبت يخترق قطعة من الأنسجة أسمك من 1 سم .وللتعامل مع العينة السميكة ويوصى بالطرق التالية:

1. الاجهزة الصلبة: (مثل الساق. الجذر والخشب) تقطع العينات حسب الضروره ولكن ليس أكثر سمكا من 5 ملم.

TYPES OF FIXATIONS:

There are three common ways of classifying fixation: **acidic fixation** vs. **basic**, **coagulant** vs. **non-coagulant**, and **additive** vs. **non-additive**.



هناك ثلاث طرق شائعة لتصنيف التثبيت:

- ✓ التثبيت الحمضي والقاعدي،
- ✓التخثر وغير التخثر ،
- ✓ والإضافة وغير الإضافة.

TYPES OF FIXATIVES:



1 - Acidic and Basic fixatives

- a - Acidic fixatives: preserves **chromosomes**, **Nucleoli**, and the **spindle apparatus**, while dissolving **Nucleoplasm** and **Mitochondria**.
- b - Basic fixatives: preserves **Nucleoplasm**, **Mitochondria** and dissolves **Chromatin** and **Spindle apparatus**.

انواع المثبتات :

- المثبتات الحمضية والقاعدية : Acid and basic fixatives
- المثبتات المخثرة وغير المخثرة : Coagulant and Non-coagulant fixatives
- المثبتات اضافية وغير اضافية : Additive and Non-additive fixatives

تصنيف المثبتات :

1 - المثبتات الحمضية والقاعدية : Acid and basic fixatives

- أ- المثبتات الحمضية : وتستعمل لتثبيت وحفظ الكروموسومات والأنوية والخيوط المغزلية (أي تستعمل لتثبيت وقتل الأجسام الحمضية) ، كما أنها تذيب البلازما النووية والأجسام السبحية.
- ب- المثبتات القاعدية : وتستعمل لتثبيت الأجسام القاعدية مثل الأجسام السبحية والبلازما النووي وأحياناً النويات.

2 - Coagulant and Non-coagulant fixatives



a - **Coagulant fixatives** cause cytoplasm to become opaque (غير شفاف) and congeal into a netlike structure. such as : Ethanol, Methanol, Picric acid, Mercuric chloride, Acetone, and Chromium trioxide.

b - **Non-coagulant fixatives** do not disrupt the cytoplasm put transform it into a transparent gel. Examples of fixatives of this kind are glutaraldehyde, formaldehyde, acrolein, potassium dichromate, acetic acid and osmium tetroxide.

Non-coagulant fixatives very often stabilize tissues to such an extent that they are protected from disruption by the use of subsequent coagulant reagents during post-fixation or dehydration.

2 - المثبتات المخثرة وغير المخثرة : : Coagulant and Non-coagulant fixatives

أ- **المثبتات المخثرة : Coagulant fixatives** وهي التي تسبب تخثر بروتين البروتوبلازم وتحويله إلى تركيب شبكي يسمح للشمع بالنفاذ وإعطاء العينة صلابة كافية عند التقطيع، كما أنه يقوم بتقوية الروابط البروتينية والمحافظة عليها من التكسر، ومع ذلك فهو يعطي بعض الحقائق المصطنعة للعينة المثبتة، وهي ذات أعداد كثيرة ومنها الأيثانول (الكحول الأيثلي)، والمثانول، والكروميوم، وحمض الكبريتيك، وكلوريد الزئبق، والأسيتون.

ب - **المثبتات غير المخثرة Non-coagulant fixatives** وهي التي لا تسبب تخثراً شبكياً للبروتين ولكنها تثبته بشكله الطبيعي، ومنها الفورمالدهيد، والجلوترالدهيد، والأكرولين، وأكسيد الأزيموم، وحمض الخليك، وثاني كرومات البوتاسيوم، وبعض هذه المثبتات تذيب الخلايا والأنسجة والمقاومة للتخثر، وتُخثر مواداً أخرى خلال زيادة التثبيت والعمليات المتتالية معطية بذلك تثبيثاً مزدوجاً.

3 - Additive and Non-additive fixatives:

Additive Fixatives : cross-link with proteins in cells, strengthening cell structure and insuring tissue preservation. **Examples of additive fixatives** are the aldehydes. **Non Additive Fixatives** that react with the tissue, but do not add onto or combine with the tissue in order to act on it. The non-additive or denaturing fixatives act primarily by dissociating water molecule from the tissue proteins resulting in a change in the tertiary structure. **For example**, methyl and ethyl alcohol coagulate protein but are not added to the tissue. This causes water- soluble proteins to become insoluble, a process that is largely irreversible. **Because of the complexity of fixation and the great variety of agents used, the terms additive and non additive are not now commonly used.**

3- مثبتات إضافية أو غير إضافية : Additive and Non-additive fixatives

المثبتات الإضافية : هي مركبات تتحد مع التراكيب الخلوية خاصة البروتينات وتصبح جزءاً منها، مثل الألددهيدات، وذلك عن طريق تكوين روابط أيونية **Ionic bonds** أو تساهمية **Covalent bonds** تتصل بالمجموعات الجانبية لواحد أو أكثر من الأحماض الأمينية المكونة للبروتين.

أما المثبتات غير الإضافية : فهي تعمل على نزع جزيئات الماء من البروتين مما يجعل المجموعات الفعالة **Active groups** حرة من جزيئات الماء، مما يتيح لها تكوين روابط مع بعضها البعض وتعمل على تخثر البروتين. أي تحول البروتينات القابلة للذوبان في الماء لغير قابلة للذوبان، وهي عملية غير عكسية إلى حد كبير. بسبب تعقيد التثبيت واعداد كبيرة متنوعة من العوامل المستخدمة، المصطلحات مثبتات إضافية أو غير إضافية ليست شائعة الاستخدام الآن .

What is an additive fixative?

Fixative that chemically link to the tissue, changing the tissue by its addition

Examples of additive fixatives

Formaldehyde, Glutaraldehyde, glyoxal, mercuric chloride, potassium dichromate, zinc salts, picric acid.



ماهو المثبت المضاف (الإضافي)؟ المركب الذي يتحد مع التراكيب الخلوية خاصة البروتينات وتصبح جزءاً منها

الثبت هو الربط الكيميائي بالأنسجة وتغييرها عن طريق الإضافة

أمثلة على المثبتات المضافة : الفورمالديهايد، جلوتارالدهيد، جليوكسال، كلوريد الزئبق، ثنائي كرومات البوتاسيوم، أملاح الزنك، حمض البكريك.

What is a non-additive fixative?

Fixatives that react with the tissue, but do not add onto or combine with the tissue in order to act on it.

Examples of non-additive fixatives?

Methanol, Ethanol, and acetone



ماهو المثبت الغير مضاف ؟

المثبتات المركبات أو المثبتات التي تتفاعل مع الأنسجة ولكن لا تتحد معها.

أمثلة على مثبتات غير المضافة: الميثانول، الإيثانول، الأسيتون

<i>Fixing agent</i>	<i>Additive</i>	<i>Coagulant</i>
Acetic acid	No	No
Acetone	No	Yes
Chromium trioxide	Yes	Yes
Ethanol	No	Yes
Formaldehyde	Yes	No
Glutaraldehyde	Yes	No
Mercuric chloride	Yes	Yes
Methanol	No	Yes
Osmium tetroxide	Yes	No
Picric acid	Yes	Yes
Potassium dichromate	Yes	No
Trichloroacetic acid	Yes	Yes

What is a coagulant fixative?

Fixative which produces aggregation of protein molecules, granulation, and precipitation



Examples of coagulant fixatives?

Mercuric chloride, zinc salts, picric acid, ethanol, methanol, acetone, potassium dichromate below pH 3.5

ما هو المثبت التثخثر؟

مثبت الذي ينتج تجمع او تراكم جزيئات البروتين، التحبيب، الترسيب

كلوريد الزئبق، أملاح الزنك، حمض البكريك، الإيثانول، الميثانول، الأسيتون، ثنائي كرومات البوتاسيوم تحت الرقم الهيدروجيني 3.5

Properties of an Ideal Fixative:



1. Prevents autolysis and bacterial decomposition.
2. Preserves sample tissues in their natural state
3. and fix all components.
4. Make the cellular components insoluble
5. to reagent used in tissue processing should

1. Preserves sample tissues volume.
2. Avoid excessive hardness of sample tissues
3. Allows enhanced staining of sample tissues
4. Should be non-toxic and non-allergic for user.
5. Should not be very expensive

خصائص المثبت المثالي:

- 1 يمنع التحلل الذاتي والتحلل البكتيري.
- 2 يحافظ على عينة الأنسجة في حالتها الطبيعية
- 3 ويثبت جميع المكونات.
- 4 جعل المكونات الخلوية غير قابلة للذوبان
- 5 الكاشف المستخدم لمعالجة الأنسجة لا بد أن:

- 1 يحافظ حجم عينة الأنسجة.
- 2 تجنب الصلابة المفرطة لأنسجة العينة
- 3 يسمح لتعزيز صبغ أنسجة العينة
- 4 يجب أن تكون غير سامة وغير حساسية للمستخدم.
- 5 لا ينبغي أن تكون مكلفة

What is the result of a coagulant fixative?

Meshwork through which other solutions can easily penetrate



What is a non-coagulant fixative?

Fixatives that form a gel which is difficult for subsequent reagents to penetrate.

Considered inferior to coagulant fixatives.

Example of non-coagulant fixative?

Cross-links formalin forms with amino groups of amino

Acids Also potassium dichromate above pH 3.5, glyoxal, glutaraldehyde



ما هو المثبت غير المخثر؟

المثبتات التي تشكل هلام الذي يصعب على الكواشف اللاحقة للاختراق.

يعتبر أقل شأنا من مثبتات التخر.

مثال على تثبيط غير تخر

**أشكال روابط الفورمالين مع مجموعات أمينية من الأحماض الأمينية أيضا ثنائي
كرومات البوتاسيوم فوق الرقم الهيدروجيني 3.5، جليوكسال، جلوتارالدهيد**

Factors affecting fixation:

1 – Temperature

- Affects the morphology of the tissue.
- It will increase the rate of penetration
- It will also increase the rate of autolysis and diffusion of cellular components.

2 – Size

- Ideal size of the tissue should be 5 mm thick.

3 - Volume ratio

- Volume of fixative is at least 15 to 20 times greater than volume of plant samples.



ثانياً - العوامل المؤثرة على التثبيت :

هناك العديد من العوامل التي تؤثر على فعالية المثبت لتثبيت العينة، ومنها :

1 - درجة الحرارة Temperature :

يُجرى التثبيت في الغالب عند درجة حرارة الغرفة العادية، ولا تزيد عن 40 °م في معظم المثبتات. عندما يتم جرح أو خدش الخلايا فإن قوامها الداخلي يتحلل طارداً عدداً من الإنزيمات من بعض العضيات الخلوية، وسرعان ما تحلل تركيب البروتوبلازم إذا لم تغسل أو تمنع من التفاعل، ويزداد هذا التحلل بازدياد درجة الحرارة. ولهذا فإن تثبيت العينة عند درجة 40 °م يعني تثبيتاً أفضل للعينة، كما وُجد أن استعمال مثبت (F.A.A) المبرد يكون أفضل تثبيتاً من كونه يُجرى في درجة الغرفة العادية لبعض العينات النباتية .

2 - حجم العينة Size: يتراوح حجم العينة بين 1 - 2 سم، إذا زاد عن ذلك الحجم فإن المثبت لا يستطيع أن يتخلل العينة، وخاصة الأجزاء الوسطية منها، ولهذا كلما كانت العينات صغيرة الحجم، كلما كانت عملية القتل والتثبيت سريعة وفعالة وذات نتائج إيجابية.

3 - حجم السائل المثبت Volume ratio : يجب أن يبقى السائل القاتل والمثبت ثابت التركيز بقدر الإمكان طوال فترة القتل والتثبيت. ولضمان ذلك يجب استخدام كمية كبيرة من المحلول قد تصل إلى عشرة أضعاف حجم العينة، كما يجب تحريك أو هز العينة حتى نضمن وصول المثبت إلى جميع أجزائها، وخاصة الجزء الملامس لقاع أو جوانب الزجاجاة المستخدمة.

4 – **Time** Minimum fixation time for 5mm Plant samples is 12 hrs.

5-**The pH** should be kept in the physiological range of less than 7 chemistry,
) used to specify the **pH** (potential of hydrogen) is a numeric scale (acidity or basicity of an aqueous solution)

6 – **Autolysis** In biology, autolysis, more commonly known as self-digestion, refers to the destruction of a **cell** through the action of its own **enzymes**. It may also refer to the digestion of an enzyme by another molecule of the same enzyme.

In Plant cell There are some organelles called Microbodies when exposed to the decomposition produces some Enzymes known as Cathepsins which starts reverse its activity after the death of a cell, where it breaks down and analyze the protein molecules and convert it to amino acids and then distort cell components.

4- **مدة التثبيت Time**: تختلف مدة التثبيت حسب طبيعة المثبت واختلاف خلايا وأنسجة العينة. فبعض المثبتات يمكن ترك العينة فيها لمدة طويلة أو لحين الحاجة إليها دون إلحاق أي ضرر بها. وبعضها يجب عدم ترك العينة فيها أكثر من المدة اللازمة لعملية التثبيت، نظراً لأنها تلحق الضرر بالعينة، حيث تصبح العينة هشة قابلة للتفتت مما له أثر سلبي للحصول على قطاعات جيدة.

5- **الرقم الهيدروجيني pH** : يميل الرقم الهيدروجيني للعينات النباتية إلى الحامضية أقل من الرقم 7،

6 - **التحلل الذاتي Autolysis** : يوجد بالخلية النباتية بعض العضيات منها الأجسام الدقيقة Microbodies التي عند تعرضها للتحلل تفرز بعض الإنزيمات المعروفة بمجموعة الكاثبسين Cathepsin التي يبدأ نشاطها العكسي بعد موت الخلية، حيث تقوم بتكسير وتحليل جزيئات البروتين، فتعمل على تحليل العضيات الخلوية وتشويه مكوناتها عما كانت عليه قبل موتها.

7 - Permeability

Permeability rate plays an important role on the effectiveness of the fixative solution, Penetration (refers to the ability of the solution to diffuse into the tissue) the more quick Penetration of fixative solution has a good effect on the killing of the sample and short fixation, and gave positive results.



8 - Osmolality

- The addition of a buffer to the fixative solution may alter the osmotic pressure exerted by the solution.
- Hypertonic solutions give rise to cell shrinkage whereas hypotonic and isotonic fixatives result in cell swelling and poor fixation.



7- معدل النفاذية : يلعب معدل النفاذية دوراً كبيراً على فعالية المحلول المثبت، فكلما كان معدل النفاذية سريعاً كلما كان المحلول المثبت ذو تأثير جيد على قتل العينة وتثبيتها بوقت قصير، وأعطى نتائج إيجابية.

8- الأسموزية Osmolality: إذا تركت العينة في محلول ذو تركيز معين فسوف تخضع مكوناتها لظاهرة الانتفاخ أو التقلص الأسموزي. ولهذا يجب أن يكون المحلول متعادل الأسموزية أو يحتوي على محاليل أولية منها ما يعمل على انتفاخ العينة والآخر يعمل على تقلصها وانكماشها، ومن ثم يحصل اتزان أسموزي ذو تأثير متكافئ على حجم العينة.