

Plant Microtechnique

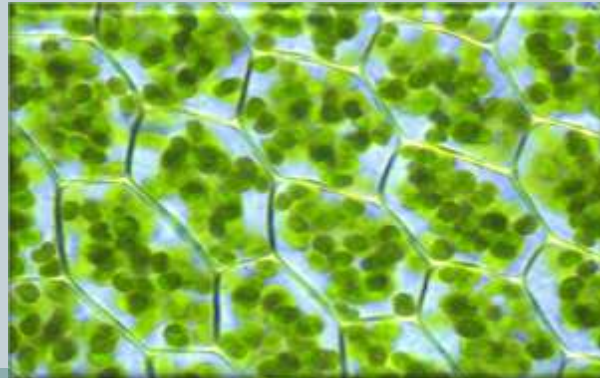
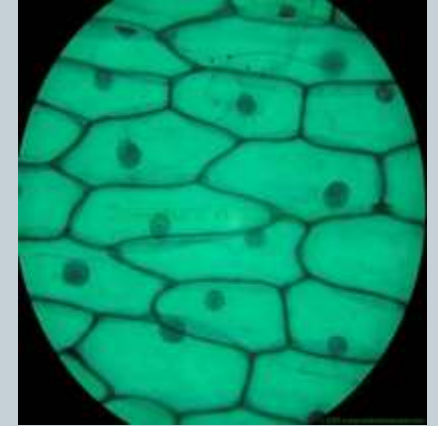
BOT 213



التحضيرات المجهرية النباتية

213 نبت

محاضره 7



Dehydration

Once material has been fixed, the next step is to slowly dehydrate the material to remove all the water. In order not to destroy the delicate tissues, this is done gradually in a series of different solutions.

في الخطوة السابقة قد تم التثبيت، وفي الخطوة التالية ستتم إزالة جميع المياه. من أجل عدم تدمير الأنسجة الحساسة، ويتم ذلك تدريجيا في سلسلة من المحاليل المختلفة.

نزع الماء (سحب) Dehydration

Plant cells and tissues contain a large amount of water, so it must be removed or dehydrated from the cells and tissues of the sample before it embedded in paraffin wax or other embedding materials. **The process of Dehydration is done gradually in a series of different solutions.** There are two Methods of Dehydration in case of using paraffin wax, for example,

The first Method: in which dehydrated solutions does not melt the paraffin wax and then transferred to another solution dissolves the wax .

The second method : Dehydrated solutions dissolves the paraffin wax .

تحتوي الخلايا والأنسجة النباتية على كمية كبيرة من الماء، لذلك يجب إزالته أو سحبه من خلايا وأنسجة العينة قبل أن تغمر بالشمع أو غيره من مواد الطمر، وعملية سحب الماء من العينة (أو العينات) تكون بمعاملة خلايا الأنسجة النباتية بسلسلة من محلول كيميائي يحتوي على زيادة تركيز متتالية من المادة مع انخفاض في تركيز الماء.

وهناك طريقتان لإزالة الماء وتهيئة العينة النباتية لتشبيعها في شمع البرافين مثلاً،
الطريقة الأولى: وفيها يسحب الماء من العينة بمادة لا تذيب الشمع (أو مادة الطمر) ثم تنقل بعد ذلك إلى مادة أخرى أو محلول يذيب الشمع (أو مادة الطمر).

أما الطريقة الثانية : فيكون المحلول النازع للماء هو في الوقت نفسه مذيب للشمع (أو مذيب لمادة الطمر).

Dehydration

Because melted is hydrophobic (immiscible with water), most of the water in a specimen must be removed before it can be infiltrated with wax. This process is commonly carried out by immersing specimens in a series of ethanol (alcohol) solutions of increasing concentration until pure, water-free alcohol is reached. Ethanol is miscible with water in all proportions so that the water in the specimen is progressively replaced by the alcohol. A series of increasing concentrations is used to avoid excessive distortion of the tissue.

نظرًا لأن المادة المنصهرة كارهة للماء (غير قابلة للامتزاج بالماء)، فيجب إزالة معظم الماء من عينة قبل تشريبها بالشمع. يتم تنفيذ هذه العملية عادة عن طريق غمر العينات في سلسلة من الإيثانول (الكحول) محاليل متزايدة في التركيز حتى النقية خالي من الماء. يتم استخدام سلسلة من التركيزات المتزايدة لتجنب تشويه المفرط للأنسجة.

A- Fluids not dissolve waxes:

1- Ethyl alcohol

2- Isopropyle alcohol

3- Acetone

4- Glycerin

5- 2.2 Dimethoxypropane

1-Fluids not dissolve waxes:

1 - Ethyl alcohol

Commercial solution is 95% ethyl alcohol, while the absolute is completely free of water, usually used 95% ethyl alcohol for dehydration of the plant samples

2- Isopropyle alcohol

It used as Ethyl alcohol

3 - Acetone

It does not cause any problems, it is always the alternative of ethyl alcohol

4 - Glycerin

Used with algae and soft thin samples, and the high boiling point of glycerin limit water loss by evaporation.

أولاً - محاليل غير مذيبة للشمع :

يمكن تقسيم محاليل نزع الماء إلى مجموعتين عند استخدام شمع البرافين كمادة لطمر العينات النباتية :

أولاً - محاليل غير مذيبة للشمع ومنها :

1 - الكحول الإيثيلي Ethyl alcohol:

المحلول التجاري هو تركيز 95% كحول إيثيلي، أما المطلق فهو الخالي تماماً من الماء، وعادة يستعمل لسحب الماء من الأنسجة النباتية تراكيز تصاعدية من الكحول الإيثيلي معمولة من المحلول التجاري تركيز 95%.

2 - أزوبروبيل الكحول Isopropyl alcohol :

يمكن أن يستعمل كالمحلول السابق.

3 - الأستون: Acetone

نازع جيد للماء وشرائه لا يسبب أي مشاكل مما يجعله دائماً البديل للكحول الإيثيلي، والطريقة المتبعة في استعمال الأستون كمادة نازعة للماء هي كما في الكحول الإيثيلي، ولكن الأستون شديد التبخر، ويجب مراعاة ذلك عند الاستعمال.

4 - الجلسرين: Glycerin:

يستعمل الجلسرين كمادة نازعة للماء وخاصة مع الطحالب والعينات الطرية الرقيقة، ونقطة الغليان العالية للجلسرين تحد من فقدان الماء بالتبخر.

5 - **Rapid Dehydration of Plant Material:**

A rapid and simple procedure was used for chemical dehydration of plant tissue during sample preparation for light and electron microscopy. Chemically fixed tissues were washed with distilled water and then rapidly dehydrated with 2,2-dimethoxypropane.

Complete dehydration of plant material can be accomplished in one step using 2,2-dimethoxypropane (DMP). This chemical reacts with any water present to form **Methanol** and **Acetone**. The image after use of DMP is not different from that of other dehydrating procedures in common use.

5- (طريقة التجفيف السريع للمواد النباتية)

2.2 داي ميثوكسي بروبان: 2.2 Dimethoxypropane

هي الطريقة المعروفة باختصار (دي. إم. بي. D.M.P) وهي جيدة وسريعة في نفس الوقت، وقد اقترحها مولر وجاك (1975) Mullar and Jacks، وذلك باستخدام مادة (2.2 داي ميثوكس يبروبان) كعامل نازع للماء، ففي خلال دقيقة أو دقيقتين من غمر العينة في المحلول وبوجود الماء في الأنسجة يتحول هذا المحلول والماء إلى كحول ميثيلي (ميثانول) وأستون مختصراً سلسلة نزع الماء بالمواد الأخرى، ويمكن أن تبقى العينة في (DMP) لعدة ساعات دون إتلافها.

2 - Fluids dissolve wax

1 - Normal Butyl Alcohol (Butanol)

2 - Tertiary Butyl Alcohol

2 - Dioxane

1 - Normal Butyl Alcohol (Butanol) :

Wash the sample placed in the fixative with water, then dehydrate by ethyl alcohol until the concentration of 30%, then the sample is moved to No. 1 in the Table below, and then follow the other concentrations to the end of the number (8) in the same table.

Water	ethyl alcohol	Normal Butyl Alcohol	No
70	20	10	1
60	25	15	2
45	30	25	3
30	30	40	4
20	25	55	5
10	20	70	6
0	15	85	7
0	0	100	8

ثانياً - محاليل مذيبة للشمع :

1- بوتانيل الكحول العادي (بيوتانول) :

Normal Butyl Alcohol (Butanol) :

تغسل العينة الموضوعة في المثبت بالماء، ثم يسحب الماء بالكحول الإيثيلي حتى تركيز 30 % ، ثم تنقل العينة إلى رقم (1) في الجدول رقم (5) التالي، ومن ثم تتبع التراكيز الأخرى إلى نهاية الرقم (8) في الجدول نفسه.

2 - Tertiary butyl alcohol (TBA)

The following TBA / Isopropyl alcohol schedule is based on Johansen (1940). Of the best materials used to pull water from the tissue, using a contest, but starting from the concentration of 50% alcohol as table

Isopropyl alcohol is the secondary alcohol,
tert-butyl alcohol is the tertiary alcohol

	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4	Step 5	Step 6	Step 7	Step 8
Approx Total % Alcohol	50	70	85	95	100	Pure TBA	Pure TBA	Pure TBA
Times	2hrs	o/night	1hr	1hr	1hr	1 hr	1 hr	1 hr

2 - ثالث بوتائل الكحول : Tertiary Butyl Alcohol

من أفضل المواد المستعملة لسحب الماء من الأنسجة، ويستعمل كسابقة، ولكن ابتداء من تركيز 50% كحول كما في الجدول رقم (6).

3 – Dioxin

Dioxin (Di-ethylene dioxide) miscible with water of material, a highly toxic and must be wearing gloves when you use it. Under the fume hood. It is not recommended for use because its severe toxicity. Plant sample washed with water after the fixation and then pass on the solutions of dioxin and water in the ratio shown in the table 1 below

Then the sample kept in absolute dioxin for 4- 12 hours. Preferably. Use two changes in absolute dioxin for 4 to 8 hours in each, and then infiltrate in wax. The samples that fixed with (FAA), and then washed in 50% ethyl alcohol .It transferred to the concentrations shown in Table2 blow for 4- 12 hours.

3 - ديو كسين Dioxane : الديوكسين (ثاني أكسيد ثنائي الإثيلين) مادة قابلة للإمتزاج بالماء، شديدة السمية، ويجب لبس قفازات عند استخدامها، وتحت غطاء الأبخرة، ولا ينصح باستخدامها لسميتها الشديدة. تغسل العينة النباتية بعد المثبت بالماء ثم تمرر على محاليل من الديوكسين والماء بالنسب الموضحة في الجدول رقم (1).

Dioxane	Water	Dioxane	Water
1	1	1	2
2	1	2	1
Dioxane absolute	-	Dioxane Absolute	-

Table 1

تترك العينة في الديوكسين المطلق مدة 4- 12 ساعة، ويفضل عمل تغييرين في مادة الديوكسين المطلق لمدة 4- 8 ساعات في كل منهما، ثم تشرب بالشمع. أما العينات التي تثبت في محلول (FAA)، تغسل في 50% كحول إثيلي فتنتقل إلى التراكيز المبينة جدول رقم لمدة 4- 12 ساعة.

Table 2

Note:

There are also other solvents including: Ether, Aniline, Carolyn , Chloroform, Cedar Wood Oil, Bergamot Oil, Ether Oil, Carbon Disulfide, Petrol Hydrocarbons, can be used to remove water from the plant sample but not in common use.

وهناك أيضا المذيبات الأخرى بما في ذلك:

الأتير،

الأنيلين،

كارولين،

الكلوروفورم،

زيت خشب الارز،

زيت البرغموت،

زيت الأثير، ثاني كبريتيد الكربون، البنزين الهيدروكربونات، ويمكن استخدامها لإزالة المياه من عينة النبات ولكن ليست شائعة الاستخدام.

What is The process of Dehydration? And its methods of using paraffin wax?

It is done gradually in a series of different solutions. There are two Methods

A- **Dehydrated solutions does not melt the paraffin wax**

- | | |
|-----------------------|-------------------------|
| 1- Ethyl alcohol | 4- Glycerin |
| 2- Isopropyle alcohol | 5- 2.2 Dimethoxypropane |
| 3 - Acetone | |

B - **Dehydrated solutions melt the paraffin wax .**

- 1 - Normal Butyl Alcohol (Butanol)
- 2 - Tertiary Butyl Alcohol
- 2 - Dioxane

ما هي عملية التجفيف او نزع الماء؟ وما طرق استخدام شمع البرافين؟

يتم ذلك تدريجياً في سلسلة من الحلول المختلفة. هناك طريقتان
أ- المحاليل المجففة لا تذوب شمع البارافين:

1- الكحول الإيثيلي

2- كحول الأيزوبروبيل

3 - الاسيتون

4- الجلسرين

5-2-2 ثنائي ميثوكسي بروبان

ب- المحاليل المجففة تذوب شمع البارافين.

1 - كحول بوتيل عادي (بوتانول)

2 - كحول بوتيل ثلاثي

3 - ديوكسان

Clearing

Clearing is the process of removing depositions suspended in water or other liquids by using natural or chemical means. **Clearing** means transfer plant sample from the dehydrated solutions to a solutions dissolves paraffin waxes. if dehydrated solution does not dissolve the wax, for example, **Clearing** means removing of alcohol or any other substance within the sample tissues, which leads to difficulties in the cutting process. If the dehydrated solution melts the wax, it is unnecessary to the process of **Clearing** . samples can be directly transfer to Infiltration.

There are several types of **Clearing** media but a good solution is the one which has the following characteristics:

- 1 - Fast **Clearing** without distortion of the components of the sample tissues.
- 2 - **Slow evaporation**.
- 3 - **Lack of a foul (bad)odor**.
- 4 - **Nontoxic**.
- 5 - Not flameable.
- 6 - **Easy to remove**.
- 7 - **Its ability to melt the infiltration media**.

الترويق Clearing

هي عملية ترسيب الشوائب المعلقة في الماء أو غيره من السوائل باستخدام وسائل طبيعية أو كيميائية، ويُعني به أيضاً نقل العينة النباتية من الوسط النازع للماء إلى وسط يذيب مادة التشريب، فإذا كان الوسط النازع للماء وسط لا يذيب مادة التشريب، فإنَّ المقصود به إزالة الكحول أو أي مادة أخرى من داخل أنسجة العينة، والتي تؤدي إلى صعوبات عند عملية التقطيع.

أما إذا كانت المادة المستخدمة في نزع الماء تذيب الشمع (انظر عملية نزع الماء - الفصل الخامس)، فإنه لا داعي لعملية الترويق ويمكن إجراء التشريب مباشرة. وهناك عدة أنواع من أوساط الترويق ولكن أجودها ما يتميز بالصفات التالية:

1. سرعة الترويق دون إحداث تشويه لمكونات العينة.

2. بقاء التطاير.

3. عدم وجود رائحة كريهة.

4. غير سام.

5. غير مشتعل.

6. سهولة التخلص منه.

7. قدرته على إذابة مادة التشريب.

Clearing Reagents

- 1 - Xylene
- 2 - Chloroform
- 3 - Clove Oil
- 4 - Trichloroethylene
- 5 - Benzene
- 6 - Bergamot Oil
- 7 - Cider-wood Oil

Clearing Reagents

1 - Xylene (Xylol): Samples must be completely dehydrated before being gradually brought into pure Xylene. The pure xylol needs to be changed several times. The transfer from Xylene to paraffin must also be gradual and is just as tedious a process. Every trace of xylol must be removed from the samples before they embedded, otherwise the paraffin will crystallize. samples tend to become excessively hardened if left too long in Xylene. Xylene is still the prime reagent for clearing sections previous to mounting in balsam or other resinous medium. Xylene should always be free from water and acids.

ومن أوساط الترويق المستخدمة في تحضير العينات ما يلي:

1 - الزيلين (زيلول) Xylene : يجب أن تكون العينات جافة تماماً قبل أن وضعها تدريجياً في الزيلين النقي. يحتاج الزيلول النقي إلى تغييرات عدة مرات. النقل من الزيلين إلى البارافين يجب أيضاً أن تكون تدريجية وهي عملية شاقة. يجب إزالة كل آثار الزيلول من العينات قبل الغمر، وإلا فإن البارافين سوف يتبلور. من سلبيات الزايلين أنه يسبب انكماشاً للنسيج إذا ما ترك فيه لمدة طويلة. زيلين لا يزال الكاشف الرئيسي لترويق القطاعات قبل تحميلها باستخدام كندا بلسم أو غيرها من أوساط التحميل الراتنجية. يجب أن يكون الزيلين دائماً خالية من الماء والأحماض.

و يعتبر الزايلين Xylene من أفضل أوساط الترويق الشائعة حتى الآن والمستخدم في مختبرات التحضير المجهرية، حيث أنه لا يتطاير بسرعة وأنه يضيف على النسيج شفافية تدل على إتمام عملية الترويق، كما يمكن نزع بالتبخير من الأنسجة أثناء عملية التشريب، ودرجة غليانه حوالي 140 5م، كما أنه رخيص الثمن، ولكن من سلبيات الزايلين أنه يسبب انكماشاً للنسيج إذا ما ترك فيه لمدة طويلة.

2 - Chloroform:

Chloroform is the indicated clearing reagent for some kinds of material and occasionally had to be used in place of xylol before the butyl alcohols came into use. In the final stages of infiltration it is more easily removed than xylol but not so readily as the butyl alcohols. Equal parts of chloroform and carbon bisulphide sometimes constitute an excellent clearing agent. **Chloroform hardens celloidin.** It has been accused of delicate stain combinations, consequently one should avoid spoiling using it on stained slides.

2 - الكلوروفورم Chloroform: كاشف لبعض أنواع المواد وأحياناً يستخدم بدلاً من الزيلول قبل دخول الكحول بيوتيل حيز الاستخدام. في المراحل النهائية من الترويق يتم إزالتها بسهولة أكبر من زيلول ولكن ليس ذلك بسهولة مثل الكحول بيوتيل. الكميات المتساوية من الكلوروفورم وكبريتيد الكربون تشكل أحياناً عامل ترويق ممتاز. الكلوروفورم يصلب السليلويدين. قد يتسبب في إتلاف بعض الصبغات ، وبالتالي يجب تجنب استخدامه على الشرائح الملون.

يستعمل بقلّة لترويق العينات النباتية، ودرجة غليانه منخفضة 61 °م، تأثيره على الأنسجة قليل، فهو لا يسبب انكماشاً أو تقسية مقارنة بالزايلين، كما أنه سريع التبخر لذا فإن إزالته من الأنسجة سهلة وسريعة.

3 - Clove Oil:

The reagent most commonly used for clearing sections on the slide before mounting in balsam is clove oil. Before the mounting is done, all traces of the oil should be removed by washing the slide in xylol, otherwise the stains are **apt** to **fade** . عرضة للتلاشي . Clove oil renders tissues brittle if they remain in it for any length of time. Clove oil contains about 82% eugenol. While no data are on record, eugenol may conceivably be substituted for clove oil if necessary, but it is far more expensive.

4 - Trichloroethylene:

fluid is an excellent substitute for xylol. When used as a clearing agent, extraction of stains has not been observed. Paraffin is completely soluble in it, as is balsam. It has been claimed . That slides cleared.

3 - زيت القرنفل Clove oil :

هو الكاشف الأكثر استخداما لترويق القطاعات على الشريحة قبل التحميل في بلسم. لكن قبل التحميل في بلسم يجب إزالة آثار الزيت بغسل الشريحة في زيلول، وإلا عمل على إزالة الصبغات - كالصفرائين - . زيت القرنفل يجعل الأنسجة هشة إذا بقيت لوقت طويل. وهو لا يمتزج مع محلول كندا بلسم لذا يجب تمرير العينة في مادة الزايلين قبل تحميلها في كندا بلسم.

4 - ثالث كلورواثيلين Trichloroethylene :

السائل بديل ممتاز للزيلول في الترويق، لا يؤثر على الصبغات كما أنه يذيب كندا بلسم، كما هو البلسم. وهو غير مشتعل او سام إلا إذا استنشق مباشرة بكمية كبيرة،

5 - Benzene:

This fluid work almost as well as xylol. Great care must be taken when using this fluid because of its explosive character.

6 - Bergamot Oil:

This was a favorite with the older botanists. One may begin with the material in 95% alcohol and, by adding a drop at a time, gradually replace the alcohol with the oil. Some oil will remain in the material after embedding, but this is sometimes more advantageous than otherwise. Bergamot oil does not affect coal-tar dyes if used in the clearing of stained preparations.

5 - البنزين Benzene :

يعمل كالزيلول ولكن يجب توخي الحذر الشديد عند استخدامه بسبب سرعة انفجاره واشتعاله. هو من أوساط الترويق رخيصة الثمن يتخلل الأنسجة بسرعة ولا يحدث انكماشاً لها، لا يجعلها هشة، درجة غليانه 80⁵م، لهذا فهو يتبخر بسرعة في فرن الشمع، سريع الاشتعال، وبخاره سام مهما انخفضت تراكيزه.

6- زيت البرغموت Bergamot Oil:

يفضله كبار علماء النبات. يمكن احلاله بدل الكحول 95% تدريجيا ، لكن يبقى بعض الزيت في المادة بعد الترويق وهذا له فائدة. ولا يؤثر زيت البرغموت على أصباغ قطران الفحم إذا استخدمت في ترويق العينات المصبوغة.

7 - Cedar-wood Oil:

Good cedar oil is not easy to obtain. There is one type for immersion lenses and another for clearing. Most of the cedar oil on the market has been adulterated with xylol or other solvents. If there is much danger of the material becoming too brittle (هش) . Use like xylol, but a less close series of percentages may be used. Clearing is rather slow. Samples may be left in cedar oil indefinitely without obvious damage

7 - زيت خشب الأرز Cedar-wood oil :

زيت الأرز جيد وليس من السهل الحصول عليه. منه نوعين. معظم زيت الأرز في السوق مغشوش بزيلول أو غيرها من المذيبات. تصبح المواد فيه هشة للغاية. ويستخدم مثل الزيلول، يمكن أن تترك العينات في زيت الأرز فترات طويلة دون ضرر واضح. يستخدم للعينات النباتية الرقيقة الشفافة، درجة غليانه 168 - 237 °م، يتميز بأنه لا يسبب تقسية للأنسجة عند تركها فيه لفترة طويلة، كما أنه بطيء التخلل للأنسجة، ويحتاج فترة طويلة لإخراجه من الأنسجة، إذ يجب تغيير مادة التشريب ثلاث مرات قبل البدء بعملية الطمر، ويعتبر مرتفع الثمن مقارنة بأوساط الترويق الأخرى، ولا يمتزج مع محلول كندا بلسم بسهولة.