مقرر 213 نبت (تحضيرات مجهرية) العملي

إعداد الأستاذة: منى سليمان الوهيبي

2007-1428

مقدمة

يعتبر علم التحضيرات المجهرية Microtechnique من أهم العلوم التجريبية التي أدت وما زالت تؤدي خدمة كبيرة لكل فرع من فروع علوم الحياة كالتشريح، علم الميكروبيولوجيا، علم الوراثة، وعلم الأجنة، وعلم المورفولوجيا، كما يلعب دورا هاما في تطوير الدراسات الطبية والتشريح البشري.

ويشمل علم التحضيرات المجهرية تحضير العينات سواء كانت نباتية أو حيوانية.

وقد عرفة Sass (1956) بقوله: هو علم يتكون من 3 نشاطات متداخلة مع بعضها البعض هي:

1. تحضير العينة للدراسة المجهرية.
2. الاستعمال الصحيح للمجهر وما يتعلق ه من أجهزة مساعدة لتفسير ودراسة العينة.
3. تدوين ورسم النتائج.

ولتطور هذا العلم وتقدمة فقد قسم إلى 3 أقسام هي:

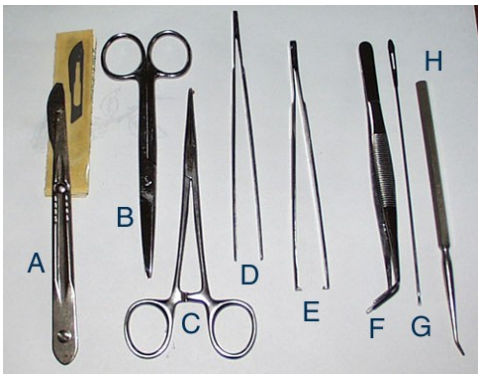
1. تحضيرات مجهرية نباتية Plant microtechnique.
2. تحضيرات مجهرية حيوانية Animal microtechnique.
3. تحضيرات مجهرية طبية Clinical microtechnique.

ولا يقتصر علم التحضيرات المجهرية على تحضي العينات فقط، بل يشمل اختيار العينات، وكذلك اختيار الكواشف والمواد القاتلة والمثبتة، واختيار الصبغات المناسبة، والإلمام بطرق تحضيرها والحصول على عينات جيدة سواء كانت كاملة أو مجزأة، والوسائل المستخدمة في تحضيرها ثم فحصها، لذا فهو يعتبر علما متطورا وغير ثابت ويعتمد على الابتكارات والتجريب.

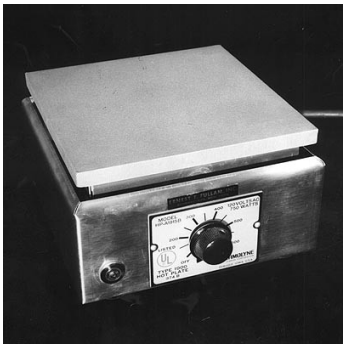
وفي هذا المقرر سوف ندرس أساسيات تحضير العينات النباتية المجهرية وغير المجهرية لأهمية كل منها لدراسة النبات .

بعض الأدوات والأجهزة المستخدمة في التحضير المجهري

مجهر ضوئي مركب



أدوات تشريح للطالبة



منضدة تدفئة الشرائح Hot plate

شرائح واغطية وعلب تشريح

حمامات مائية

أوعية صبغ Staining jars

ميكروتوم لتقطيع قوالب الشمع

الدرس العملي (1):

تحضير العينات النباتية غير المجهرية (الكبيرة)
و
جمع و تحضير العينات النباتية المجهرية

تحضير العينات النباتية غير المجهرية (الكبيرة) :

العينات غير المجهرية الكبيرة: يقصد بها النبات الكامل أو جزءاً منه يحتفظ به جافاً أو رطباً للرجوع إليه عند الحاجة، إما في المعشبة أو المتاحف وقاعات الدراسة.

وينقسم إلى نوعين من التحضير هما :

- التحضير الجاف .
- التحضير الرطب.

أولاً: التحضير الجاف Dry preparation:

تستخدم طريقة التحضير الجاف لحفظ معظم النباتات ذات الأجسام الكبيرة كاملة أو جزء منها على هيئة فرع أو غصن يمثل النبات كاملاً.

الشروط التي يجب مراعاتها عند تحضير العينة تحضيرا جافا:

1. أن تكون كاملة الأجزاء كأن تحتوي على سيقان وأوراق.
2. أن تكون في حالة الإزهار إذا كانت من النباتات الزهرية أو مثمرة، لأن ذلك يسهل التعرف على العينة.

إضافة لذلك فان العينات النباتية تتميز بصفات ظاهرية يجب أن يعنى بها لتبقى محتفظة بشكلها عند عرضها.

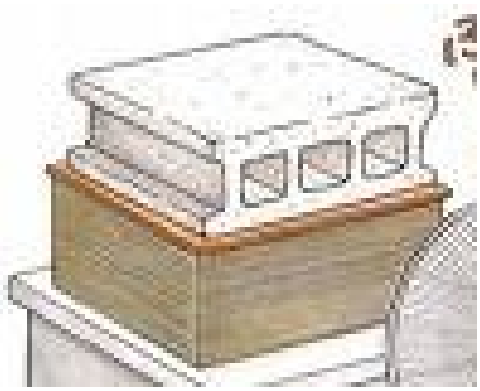
ولتحضير العينات تحضيراً جافاً يمكن استخدام الطريقة التالية:

طريقة الضغط Pressing:

تحضر معظم النباتات للعرض في حالة جافة أما كاملة أو أجزاء منها وذلك بوضع النبات أو جزءاً منه على فرخ من الورق أو أوراق الجرائد، ويتم ذلك بوضع النبات بطريقة توضح صفاته الخارجية بحيث تفرد أجزاء النبات على الورقة بطريقة تجعلها واضحة، كأن تفرد الأوراق أو الأزهار أو الثمار إذا كانت متجمعة. ويجب

فصل كل عينة نباتية عن الأخرى بفرخ أو أكثر من الورق حسب حالة النبات، كما يفضل أن تستعمل أوراقا ضد الدهون بين العينة وورق الجرائد لمنع التصاق النبات بالورقة التي تقع أعلى منها عند نزعها أو التصاق جزءا منها وذلك بعد عملية الضغط.

ويستخدم لعملية الضغط جهاز بسيط التركيب ويتكون من إطارين خارجيين من المعدن أو الخشب إما على هيئة شبكة أو صفيحة يعرف بالضاغط توضع العينات المراد تجفيفها بين الإطارين ثم يربط الإطاران معا كما في الشكل (1).

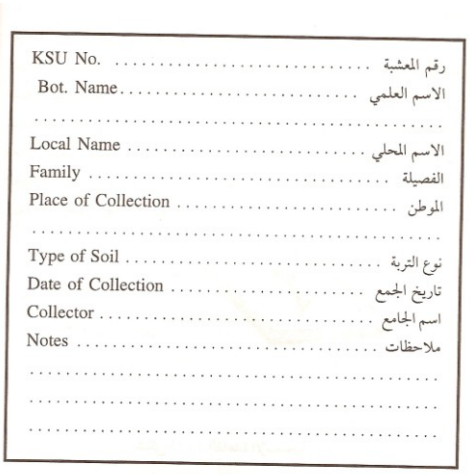


شكل (1)

بعد تمام عملية التجفيف تنقل العينة الجافة إلى نوع خاص من الورق المقوى المعروف بأوراق المعشبة Herbarium sheets حيث يتم عرضها أو حفظها في المعشبة شكل (2)، (3).

ولتثبيت العينة النباتية في المعشبة تستعمل مادة لاصقة، اختيار المادة اللاصقة يعتمد على حجم العينة وكذلك رغبة الأشخاص القائمين عليها فالعينات النباتية

الصغيرة يمكن تثبيتها على الورقة بقليل من الصمغ يوضع على الجزء الملامس للورقة وفي مواضع معينة مما يتيح الثبات للعينة دون التشويه لمظهرها العام.


KSU No. ..... رقم المعشبة
Bot. Name..... الاسم العلمي
.....
Local Name ..... الاسم المحلي
Family ..... الفصيلة
Place of Collection ..... الموطن
.....
Type of Soil ..... نوع التربة
Date of Collection ..... تاريخ الجمع
Collector ..... اسم الجامع
Notes ..... ملاحظات
.....
.....
.....

شكل (2)

شكل (3) ورقة معشبية النموذجية

ثانياً: التحضير الرطب Wet preparation:

تحتاج العينات النباتية التي تحفظ وتهيأ للعرض إلى معاملة أولية بمحلول مثبت (محلول حفظ) فعند إزالة النبات أو جزء منه تبدأ الأنسجة بالتحلل زمن ثم يتشوه الشكل الخارجي للنبات.

❖ محاليل الحفظ المستخدمة في التحضير الرطب:

1. الكحول الايثيلي بتركيز 70%.
2. الكحول الايثيلي + الفورمالين 5%.

❖ كيفية تحضير العينة للعرض:

أي للعرض في المتاحف والقاعات الدراسية ويتم ذلك بتثبيت العينة النباتية إلى لوح من الزجاج يلاءم الجرات Jars المستعملة شكل (4) وتثبت العينة إلى اللوح بعدة طرق:

1. استعمال خيط رفيع من النايلون خلال ثقوب معينة في اللوح ويجب أن تكون العقد مخفية خلف اللوح وغير مرئية في الجهة المواجهة للعرض.
2. استعمال مادة لاصقة لا تذوب في المحلول المثبت أو شريط لاصق أيضا لا يذوب في المحلول الحافظ أو المثبت.

شكل (4)

جمع و تحضير العينات النباتية المجهرية:

العينات النباتية المجهرية هي تلك العينات الصغيرة من النبات التي تفحص تحت المجهر الضوئي لتوضيح تراكيبها الدقيقة التي لا يمكن رؤيتها وفحصها بالعين المجردة.

❖ جمع العينات النباتية:

إن كيفية جمع العينات النباتية له أهمية كبيرة للتحضيرات، فكلما كان الجامع على دراية وعلم بطبيعة النبات والعينات التي يرغب في تحضيرها كلما كانت النتائج ايجابية وجيدة تجعل من العمل قيمة علمية تنعكس نتائجها على ما يعرض أو يفحص تحت المجهر.

لذا لابد من مراعاة الملاحظات التالية قبل البدء في جمع العينات:

1. يجب اختيار العينة النباتية الصالحة واستبعاد التالفة أو المجروحة.
2. يجب قتل وتثبيت العينة مباشرة بإحدى المثبتات التي تلاءم وطبيعة العينة.
3. إذا لم تقتل أو تثبت فيجب حفظها بإحدى المحاليل الحافظة لمدة معينة أو حتى وقت الحاجة لاستعمالها.
4. يجب اختيار العينات المصابة إذا كان الهدف من جمع العينة هو دراسة الأمراض النباتية.
5. يجب عزل العينات المصابة عن العينات السليمة كل على حدة في أوعية خاصة.

❖ أنواع تحضير العينات:

يعتمد تحضير العينة على حاجة الفاحص ومدى استعماله لها . وينقسم تحضير العينات إلى 3 أقسام هي:

1. التحضير المؤقت:

تحضر العينة تحضيرا مؤقتا عادة بتحميلها الماء ويتم ذلك بأخذ قطرة من الماء و وضعها على شريحة زجاجية نظيفة ثم توضع العينة المراد فحصها وتغطى بغطاء الشريحة وتفحص حالاً لأن الماء سريع التبخر.

2. التحضير نصف المؤقت:

يستعمل هنا الجلسرين بدل قطرة الماء كما يستعمل أيضا بعض المواد الكيميائية مثل:

أ- اللاكتوفينول Lactophenol و يتكون من:

20مل فينول ذائب + 20مل حمض اللاكتيك + 40مل جلسرين + 20مل ماء.

ب- الجلسرين الفينولي Phenol-glycerin ويتكون من :

20 مل فينول + 40 مل جلسرين + ماء.

3. التحضير المستديم :

ويقصد بالتحضير المستديم هو تحضير العينات سواء كاملة كالنباتات كبيرة الحجم والتي لا يمكن تحميلها كاملة على الشريحة لفحصها تحت المجهر. وتعتبر العينات المحضرة بهذه الطريقة هي أفضل أنواع التحضيرات لأنه يجعلها محتفظة بشكلها وتركيبها لعدة سنوات يمكن الرجوع إليه متى دعت الحاجة إلى ذلك، كالعينات التي تستخدم للدروس العملية والعينات البحثية التي يتطلب الأمر الاحتفاظ بها للرجوع إليها متى أراد الباحث أو غيره ذلك.

عملي (2): طرق تحضير العينات النباتية المجهرية وتطبيقاتها

يختلف تحضير العينات النباتية 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 method.
4. طريقة التفكيك Maceration method.
5. طريقة التقطيع Sectioning method.

طريقة الهرس Squash method:

في بعض الأحيان يضطر الباحث إلى دراسة التراكيب الداخلية للعينة التي لا تظهرها القطاعات، ففي هذه الحالة يلجأ للهرس ليتمكن من إظهار التراكيب الداخلية والعلاقات التي تربطها ببعض.

وتجرى عملية الهرس بوضع العينة على الشريحة وتغطى بغطاء الشريحة ثم يضغط على غطاء الشريحة حتى تظهر المكونات الداخلية إلى الخارج وبالتالي يمكن مشاهدتها تحت المجهر ويجب أن يكون غطاء الشريحة متساويا لتفادي كسرة.

متى تستخدم هذه الطريقة (الهرس) ؟

تستخدم لدراسة الابواغ Spores الموجودة داخل الحوافظ البوغية، أو لدارسة أطوار الانقسام الاختزالي Meiosis التي تحدث داخل الخلايا الجنسية مثل حبوب اللقاح (المتك)، أو لدراسة الانقسام غير المباشر Mitosis في القمم النامية (المرستيمات) للسيقان والجذور.

وفي هذا الدرس سوف نفحص القمم النامية لجذور البصل *Allium cepa* للتعرف على أطوار الانقسام الميتوزي بطرقة الهرس.

لماذا نستخدم جذور البصل بالذات ؟

لأن جذور البصل تعتبر من أفضل العينات للدراسة عند الطالب المبتدئ لسهوله تحضيرها ومن ثم سهولة فحصها.

وسوف نستخدم طريقة فولجين Feulgen لتحضير العمل، وتتلخص الطريقة بالخطوات الآتية:

1. **إنبات الجذور:** تستحث الساق القرصية لنبات البصل على إنتاج الجذور بوضع الأبصال في بياكر زجاجية مملوءة بالماء بحيث تكون الساق القرصية مغمورة بالماء، للحصول على جذور مناسبة في الطول تترك لمدة تتراوح بين (3-5) أيام حسب درجة الحرارة.

2. **القتل والتثبيت Killing & Fixation:**
   - تقطع القمم النامية لجذور البصل بطول (1-1,5) سم.
   - تغسل الجذور بماء مقطر للتخلص من أي مواد عالقة بها.
   - توضع الجذور في محلول مثبت يتكون من الكحول الايثيلي 70% وحمض خليك ثلجي بنسبة (1:3بالحجم) وتترك لفترة تتراوح بين 12-24 ساعة.
   - تغسل الجذور مرتين بالماء المقطر للتخلص من آثار المثبت.

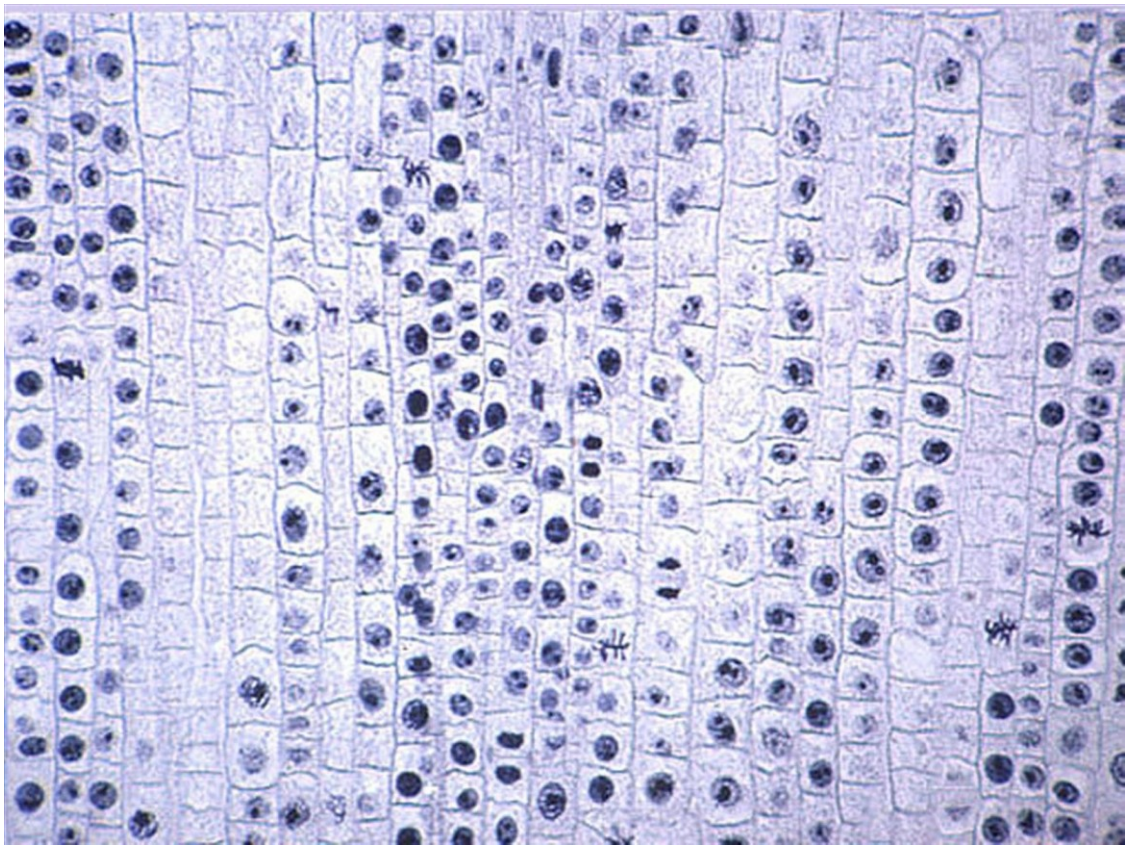
3. **التحليل Hydrolysis :** تنقل الجذور إلى أنبوبة اختبار تحتوي على حمض الهيدروكلوريك العياري (1N) HCL وتوضع في حمام مائي عند درجة حرارة 60 ْم لمدة 12 دقيقة فقط.

لماذا توضع في الحمض ؟ الحمض يساعد على تفكك الخلايا عن بعضها، كما يهيئ الحمض النووي DNA للتحرر من مجموعة الالدهيد الموجودة في السكر الخماسي المرتبط به ليتمكن من التفاعل مع الصبغة المستخدمة فيما بعد.

4. **الصبغ Staining :** تنقل الجذور إلى بيكر نظيف وتغمر بصبغة (الفوشين القاعدي) لفترة تتراوح بين 15-20 دقيقة في درجة حارة الغرفة، بعد هذه الفترة نلاحظ تلون القمم النامية باللون البنفسجي الغامق.

5. **الهرس Squashing:** بعد إتمام عملية الصبغ تؤخذ شريحة زجاجية ويضع في وسطها قطرة صغيرة من حمض الخليك 45% وينقل إليها جذر البصل ثم تفصل القمة النامية عن باقي الجذر ويتخلص منه، يوضع بعد ذلك غطاء الشريحة بحرص على قمة البصل المصبوغة وتهرس من فوق الغطاء بحرص شديد حتى لا ينكسر الغطاء .

الأدوات المطلوبة للفحص: مجهر ضوئي، شرائح زجاجية وأغطية شرائح، ملقط تشريح، مشرط، ورق ترشيح، جذور بصل محضرة ومصبوغة بالطريقة أعلاه.



بعد أجراء التجربة ارسمي أطوار الانقسام الميتوزي التي تعرفتي عليها في شريحتك؟

عملي(3): تحضير حبوب اللقاح بطريقة الهرس

تختلف طرق تحضير حبوب اللقاح تبعا لنوعية فحصها كما يلي :

1. تحضير حبوب اللقاح للفحص تحت المجهر الضوئي.
2. تحضير حبوب اللقاح للفحص تحت المجهر الماسح SEM.
3. تحضير حبوب اللقاح للفحص تحت المجهر النفاذ TEM.

سوف ندرس تحضير حبوب اللقاح للفحص تحت المجهر الضوئي فقط:

(تكون في طريقتين نموذجيتين للحصول عليها الرجوع لكتاب أساسيات تحضير العينات النباتية للدكتور عبدالله الدعيجي).

نستخدم هنا طريقة سهلة ومبسطة لتحضير حبوب اللقاح.

الأدوات المطلوبة : براعم زهرية ناضجة، ملقط مدبب، ابره تشريح، مشرط دقيق، ماء ، صبغة صفرانين ، زجاجة ساعة، شرائح وأغطية.

طريقة العمل:

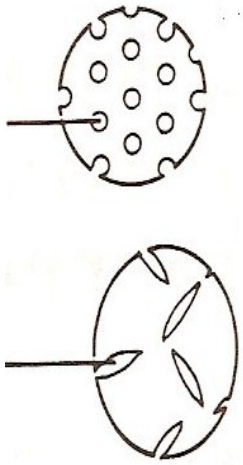
1. توضع البراعم الزهرية في وسط زجاجة ساعة نظيفة وجافة.
2. بواسطة ملقط وإبرة تشريح تفصل المتوك عن الخيوط وباقي أجزاء الزهرة عموما ويتخلص منها ولا نبقي غير المتوك.
3. تمزق المتوك بحرص شديد بواسطة المشرط أو الإبرة أذا كان المتك كبير وواضح ، أو باستخدام قضيب زجاجي مدبب تهرس المتوك إذا كانت صغيرة ورقيقة، تستبعد بقايا المتوك على جوانب زجاجة الساعة ولا يترك إلا حبوب اللقاح التي تم تجميعها من المتوك في وسط زجاجة الساعة.
4. تؤخذ حبوب اللقاح بواسطة ماصة دقيقة وتوضع في وسط شريحة زجاجية نظيفة ثم تضاف قطرات من صبغة الصفرانين إلى حبوب اللقاح وتغطى بغطاء الشريحة.

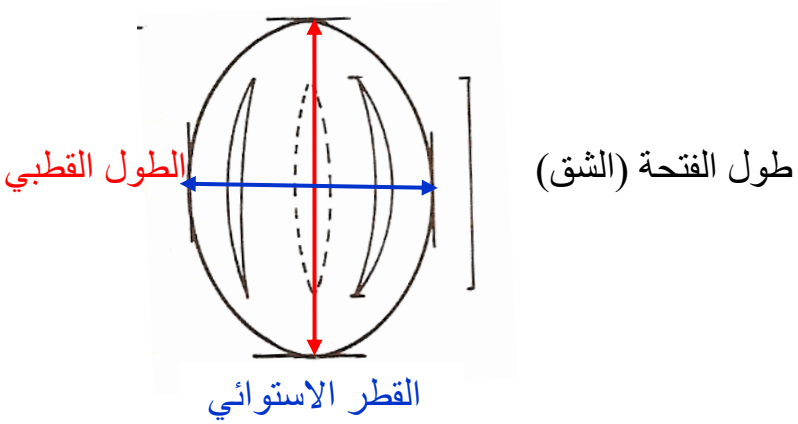
5. تفحص الحبوب تحت المجهر الضوئي باستخدام القوة 40× للتعرف على شكل وعدد فتحات الإنبات بالنسة لحبة اللقاح.

عند دراسة حبوب اللقاح لابد من اخذ بعض الصفات بعين الاعتبار مثل:

- أنماط فتحات الإنبات (شق بيضاوي مستطيل، ثقوب مستديرة، مختلط من الشقوق والثقوب).
- عدد فتحات الإنبات .
- تركيب السطح (أملس، شوكي).
- أطوال حبوب اللقاح (الطول القطبي، القطر الاستوائي، طول لفتحة).

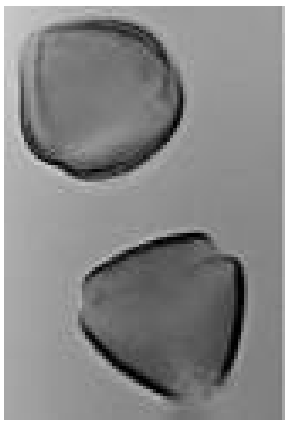
حبة لقاح تبين تركيب السطح

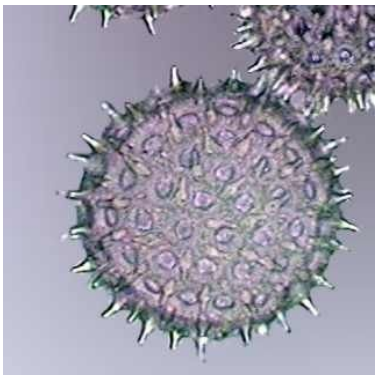




رسم تخطيطي لحبة اللقاح توضح مستويات الأطوال

ابوتيلون *Abutilon sp* الخبازية Malvaece





ارسمي حبوب اللقاح التي فحصتيها وصفي شكلها وعدد فتحات الإنبات؟

(عملى 4): تحضير عينات النباتات الراقية

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

1. تحضير سلخات بشرة النبات Epidermal strips:

تستخدم هذه الطريقة لدراسة صفات خلايا البشرة وهنك عدة طرق لتحضير العينات النباتية وابسطها هي التي تجرى بسلخ طبقة البشرة نفسها من على العضو النباتي مباشرة كالورقة أو الساق لدراسة أنواع خلايا البشرة ، والثغور، والشعيرات، والأدمة.

2. تحضير العينة بالترويق Clearing method:

تغمر الأوراق النباتية بمحلول الكلوركس المركز لمدة 24 ساعة للتخلص من صبغة الكلوروفيل داخل الأنسجة.

الأدوات المطلوبة:

أوراق نباتية طازجة + أوراق نباتية معاملة بالترويق، شفرة حادة، ملقط مدبب، شرائح وأغطية، صبغة الأخضر الضوئي (الخفيف)، مجهر ضوئي.

طريقة العمل :

- تجهز العينات المراد فحصها وذلك بغسلها بالماء الجاري لأزاله الأتربة والغبار إذا كانت العينة طازجة وغير معاملة، كما تغسل بالماء الجاري للتخلص من الكلوركس إذا كانت العينة معاملة.
- يمسك العضو النباتي باليد اليسرى وبواسطة مشرط حاد باليد اليمنى يتم عمل شق بسيط من على السطح.

- باستخدام ملقط مدبب يتم سحب السلخة بحذر وكلما كانت السلخة شفافة كلما كانت أفضل .
- عند وضع السلخة على الشريحة نتأكد أن الجزء العلوي للبشرة هو المواجه للفحص وليس ناحية الشريحة الزجاجية.
- يمكن فحصها مباشرة أو صبغها بالأخضر الخفيف، ثم توضع قطرة من الجلسرين ثم تغطى السلخة بغطاء الشريحة.

بالطريقة السابقة يمكن فحص :

1- فتحة الثغر وقياسها بواسطة الصفيحة العينية، وتقدي عدد الثغور باستخدام الصفيحة العينية الشبكية لدراسة عدد الثغور في وحدة مساحة معينة.

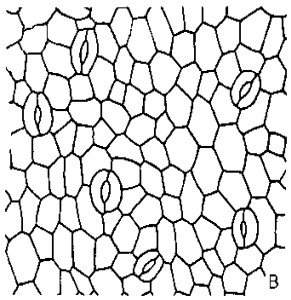
2- أنواع الثغور: غير متساوية الخلايا المساعدة، غير منتظمة الخلايا المساعدة ، متعامدة الخلايا المساعدة ، متوازية الخلايا المساعدة ، شعاعية الخلايا المساعدة.

3- **شكل خلايا البشرة:** مستطيلة، مضلعة، دائرية، مضلعة مستديرة .....الخ، جدر خلاياها في منظر سطحي هل هي متموجة أو مستقيمة.

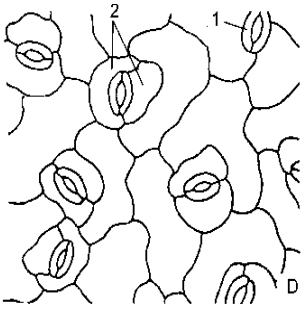
4- **طبقة الأدمة:** تظهر السلخة ما إذا كانت الأدمة ملساء أو مخططة، رقيقة أو سميكة.

5- **الشعيرات:** توضح أنواع الشعيرات غدية أو لاغدية، متفرعة أو غير متفرعة.

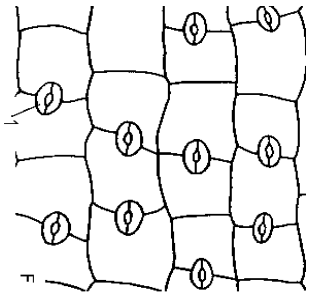
أشكال الثغور



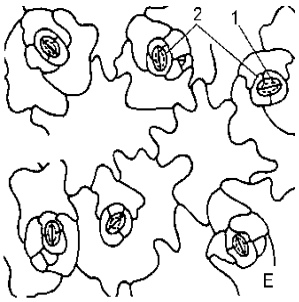
ثغر شعاعي الخلايا المساعدة



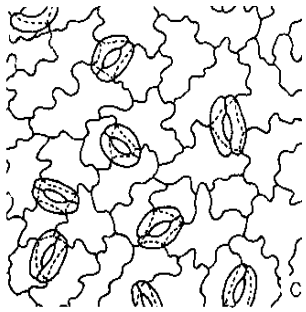
ثغر متوازي الخلايا المساعدة



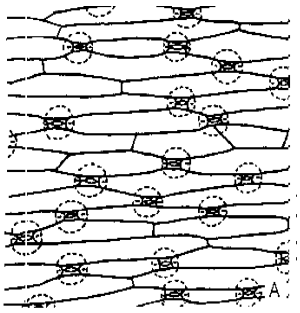
ثغر متعامد الخلايا المساعدة



ثغر غير متساوي الخلايا المساعدة



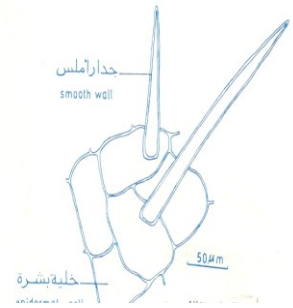
ثغر غير منتظم الخلايا المساعدة

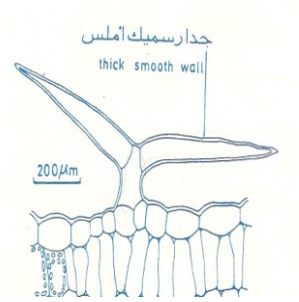


ثغر بدون خلايا مساعدة
(ذوات الفلقة الواحدة)

أشكال الشعيرات

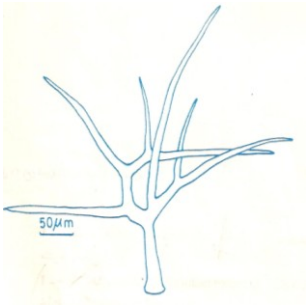
(1) الشعيرات اللا غدية





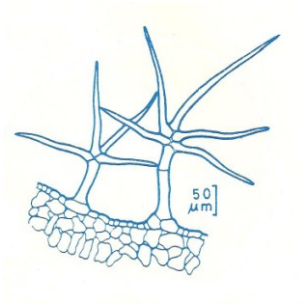
شعيرات بسيطة وحيدة الخلية

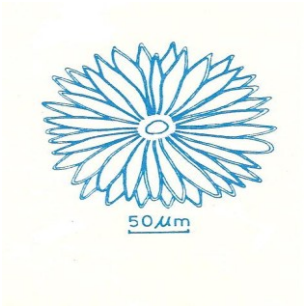
شعيرة عديدة الخلايا متفرعة



شعيرة وحيدة الخلية متفرعة

شعيرة عديدة الخلايا وحيدة الصف

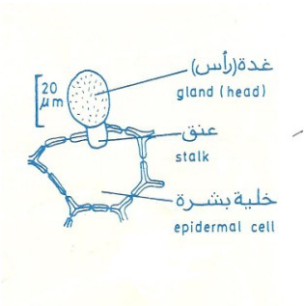




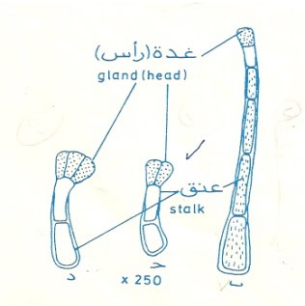
شعيرة عديدة الخلايا متفرعة

شعيرة قرصية

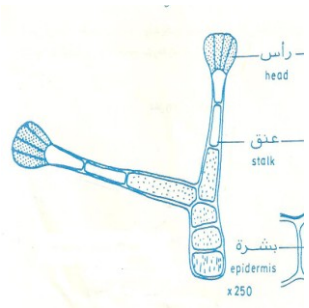
(2) الشعيرات الغدية



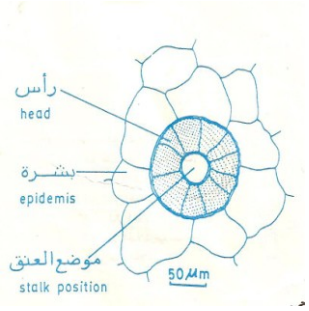
غدة وحيدة الرأس وحيدة العنق



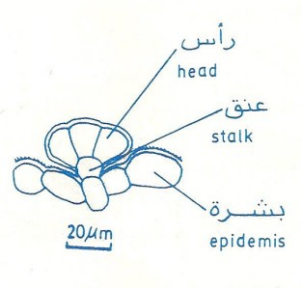
عنق وحيد الصف عديد الخلايا
الرأس: وحيد، ثنائي،عديد (الخلية)



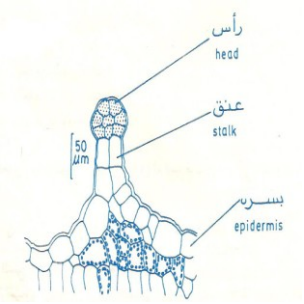
شعيرة متفرعة ذات عنق عديد الخلايا
وحيد الصف متفرع



شعيرة ذات عنق وحيد الخلية عديد
خلايا الرأس



شعيرة ذات عنق وحيد الخلية
عديد خلايا الرأس (منظر جانبي)



شعيرة ذات عنق ورأس عديدي الخلايا

2. عد الثغور باستخدام بصمة طلاء الأظافر:

يمكن استخدام طلاء الأظافر Nail varnish بوضعه مباشرة على سطح ورقة النبات (السطح السفلي للورقة)، يتم نزعه بعد عدة دقائق ويحمل على شريحة زجاجية ويفحص ويتم عد الثغور مباشرة.

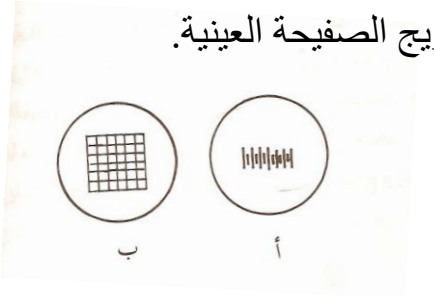
3. عد الثغور باستخدام الشريط اللاصق:

يمكن استخدام الشريط اللاصق Sello tape لعد الثغور فقط. وذلك بلصقه مباشرة سطح ورقة النبات (السطح السفلي للورقة)، يتم نزعه بعد عدة دقائق ويحمل على شريحة زجاجية ويفحص ويتم عد الثغور مباشرة.

4. عد الثغور باستخدام العدسة الميكرومترية:

تتكون الصفيحة الميكرومترية من قرصين من الزجاج بينهما صفيحة مدرجة إلى 10 أقسام تدريجا عشوائيا وقياسها يعتمد على تكبير المجهر، لذلك يستعان بشريحة مسرحية معروفة التدريج لتعيين أبعاد تدريج الصفيحة العينية.

أ- شريطية ب- مربعة



(تكون الشريحة المسرحية مقسمة إلى 10 أقسام كبيرة كل قسم منها مقسم إلى 10 أقسام صغيرة، كل قسم من الأقسام الصغيرة يساوي 10 ميكروميترات، إذن يصبح طول تقسيم الشريحة المسرحية 1000 ميكروميتر أي 1ملم) ويمكن معايرة الصفيحة العينية باستخدام الشريحة المسرحية كما يلي:

1. توضع الشريحة المسرحية تحت العدسة الشيئية قوة تكبير 10× مع استعمال عدسة عينية قوة تكبيرها 10× ويضبط المجهر حتى نرى تدريج الشريحة المسرحية الميكرومترية واضحا.

2. توضع العدسة العينية التي تحتوي على الصفيحة المدرجة عشوائيا بدلا من العدسة العينية العادية ويضبط المجهر حتى يرى كل من التدريجين.
3. تحرك الشريحة المسرحية الميكرومترية حتى تنطبق علامة الصفر في الشريحة المسرحية الميكرومترية على الصفر في الصفيحة العينية المدرجة.
4. تقرأ جميع الأرقام الصغيرة للصفيحة العينية المساوية لأقسام الشريحة المسرحية الميكرومترية الصغيرة كما هو موضح في المثال التالي :
5. تتم المعايرة تحت القوة كما يلي:

بما أن 62 قسما من الصفيحة العينية الميكرومترية = 95 قسما من الشريحة المسرحية الميكرومترية.

1قسم من الشريحة المسرحية الميكرومترية = 10 ميكروميتر

إذن 62 قسما من الصفيحة العينية الميكرومترية = 950 ميكرومترا.

إذن 1 قسم من الصفيحة العينية الميكرومترية = 950/62

= 15,3ميكروميتر

❖ **اذكري طريقة التحضير الذي استخدمتيها لفحص شريحتك، واكتبي:**

اسم النبات، شكل خلايا البشرة، أنماط الشعيرات، وطرز الثغور مع الرسم.

(عملي 5): تحضير العينة باستخدام طريقة التفكيك
Maceration method

عند دراسة الخلايا المفردة أو المعزولة فان القطاعات العرضية أو الطولية لا تكفي لتوضيح تلك الخلايا ، لذا يستعان بطريقة التفكيك للحصول على خلايا معزولة (منفصلة) عن بعضها البعض.وينم ذلك بإذابة مادة الصفيحة الوسطى التي تربط بين الجد الخلوية حيث يتم فصل الخلايا عن بعضها دون إلحاق الضرر بجدرها وهناك عدة طرق للتفكيك تختلف باختلاف المواد المستخدمة ومنها:

الأدوات المطلوبة: عينة نباتية (ساق، جذر، ورقة)، مشرط، ملقط مدبب، شرائح وأغطية، محلول الفلوروجسينول، محلول الهيدروكلوريك HCL .

1. طريقة الماء المغلي:

تستعمل هذه الطريقة لتفكيك العينات النباتية الطرية قليلة الأنسجة الخشبية والتي تتكون جدر خلاياها من مواد بكتينية وسيليلوزية أو فصل طبقات محدودة من النسيج البرانشيمي مثلا.

طريقة العمل:

- تقطع العينة النباتية (ساق، جذر، ورقة) إلى أجزاء صغيرة وتوضع في بيكر وتغمر بالماء.
- تغلى العينة على اللهب لمدة ساعتين أو أكثر (حسب كمية الأنسجة المتخشبة) حتى يمكن تفكيكها بسهولة بإبرة تشريح.
- تزال جميع الأنسجة المرئية الكبيرة.
- يضاف إليها قطرة جلسرين المخفف الماء ثم تغطى بغطاء الشريحة وتفحص تحت المجهر.

2. محلول NaOH أو KOH:

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

طريقة العمل:

- تؤخذ أجزاء صغيرة من العينة المراد تفكيكها وتوضع في أنبوبة اختبار ويضاف إليها كمية كافية من محلول NaOH أو 5% KOH.
- توضع أنبوبة الاختبار في الخطوة السابقة في حمام مائي لتغلي لمدة 20-30 دقيقة.
- يؤخذ قليل من العينة وتوضع على شريحة زجاجية ثم تفكك بإبرتي تشريح ويضاف إليها قطرة من محلول الجلسرين المخفف ثم تغطى بغطاء الشريحة وتفحص (إذا لم تتفكك العينة بسهولة يمكن زيادة مدة الغليان).

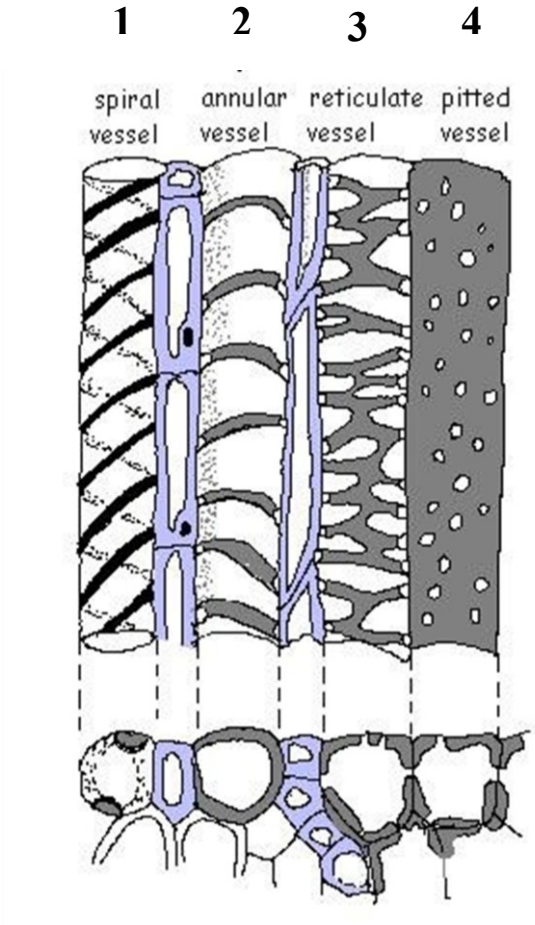
3. طريقة سكالتيز للتفكيك Schultz's maceration process:

تستخدم هذه الطريقة لتفكيك الأنسجة التي تحتوي جد خلاياها على نسبة كبيرة من اللجنين (جدرها ملجننة) .

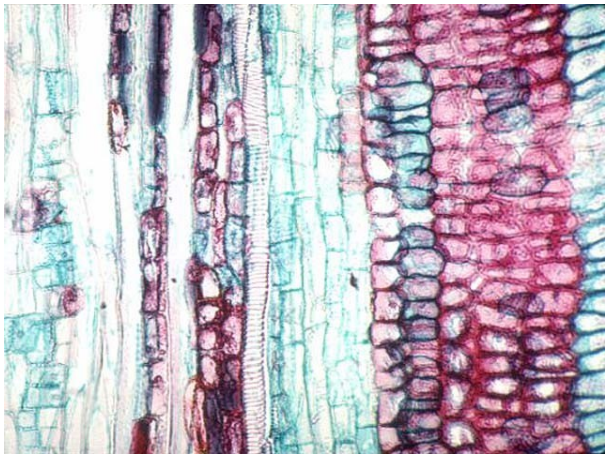
طريقة العمل:

- تؤخذ أجزاء صغيرة من العينة المراد تفكيكها وتوضع في أنبوبة اختبار ويضاف إليها كمية كافية من محلول 50% حمض النيتريك وقليل من بلورات كلورات البوتاسيوم.
- توضع أنبوبة الاختبار في الخطوة السابقة في حمام مائي لتغلي لمدة 20-30 دقيقة.
- تترك أنبوبة الاختبار في الحمام المائي لتغلي في غرفة الأمان (الهود) نظرا لتصاعد أبخرة من أكسيد النيتروجين والكلورين ذوي الرائحة الغير مقبولة والضارة.
- إذا توقف تصاعد الأبخرة يضاف بلورات البوتاسيوم.

- يؤخذ قليل من العينة وتوضع على شريحة زجاجية ثم تفكك بإبرتي تشريح ويضاف إليها قطرة من محلول الجلسرين المخفف ثم تغطى بغطاء الشريحة وتفحص.



رسم يوضح أنواع التغلظ في الخشب:
1) حلزوني 2)حلقي 3)شبكي 4)منقر



صورة فوتوغرافية بواسطة المجهر الضوئي تبين التغلظ في الخشب

- **اذكري نوع التغلظ في اوعيه الخشب التي حصلتي عليها في شريحتك وارسميها واذكري طريقة التحضير.**

(عملي 6): الكشف عن بعض مكونات جدار الخلية باستخدام عينات نباتية محضرة بواسطة التقطيع اليدوي

يتكون جدار الخلية النباتية من هيكل سيليلوزي يوجد معه مركبات أخرى مختلفة، ويتلخص التركيب الكيمائي لأهم مكونات الجدار الخلوي في الآتي:

سيليلوز، هيميسيليلوز، بكتين، لجنين، سيوبرين، السيليكا، كيوتين، كيتين، جيلاتين، كالوس، مركبات أخرى مثل التانينات، الصموغ، الراتنجات.

الأدوات المطلوبة: عينة نباتية (ساق، جذر، ورقة)، مشرط، ملقط مدبب، شرائح وأغطية، محلول الفلوروجسينول، محلول الهيدروكلوريك HCL ، صبغة سودان3، محلول اليود، محلول حامض الكبريتيك بتركيز 66%، صبغة الصفرانين.

1. الكشف عن السيليلوز Cellulose:

يكون السيليلوز الهيكل الأساسي للجدر الخلوية وهو عبارة عن مركب كربوهيدراتي عديد التسكر يتكون من سلسلة من طويلة من وحدات سكر الجلوكوز (2000-8000 جزئ). يوجد في الجدر الخلوية غير الملجننة (جدر ابتدائية، ثانوية) مثل جدر خلايا القشرة والنخاع في الساق والجذر وخلايا النسيج الوسطي للورقة، وجدر الخلايا الإنشائية (المرستيمية).

- يحمّل أحد القطاعات العرضية لساق نباتية على شريحة زجاجية نظيفة.
- توضع قطرة من محلول اليود وتترك لبضع ثوان.
- توضع قطرة من محلول حامض الكبريتيك بتركيز 66% على نفس القطاع.
- توضع قطرة من الجلسرين على العينة و تغطى بغطاء الشريحة وتفحص.

تصطبغ الجدر السيليلوزية باللون الأزرق عند إضافة اليود ثم حامض الكبريتيك بتركيز 66%.

2. الكشف عن اللجنين Lignin:

يوجد في الصفائح الوسطية والجدر الابتدائية والجدر الثانوية لأوعية وقصيبات الخشب والخلايا الاسكلارنشيمية، واللجنين يكسب الخلايا القوة والصلابة وهو مادة غير كربوهيدراتية معقدة.

- يحمل أحد القطاعات العرضية لساق نباتية على شريحة زجاجية نظيفة.
- توضع قطرة من فلوروجسينول نتبعها بقطرة من محلول الهيدروكلوريك HCL وتترك لبضع دقائق حتى نرى تلون اللجنين باللون الأحمر.
- توضع قطرة من الجلسرين على العينة وتغطى بغطاء الشريحة وتفحص.

تأخذ الجدر الملجننة:

- لونا اصفر عند معاملتها بمحلول من كبريتات الانيلن.
- كما تتلون بلون الأحمر عند معاملتها بالفلوروجيسنول + حمض الهيدروكلوريك.
- وعند إضافة صبغة الصفرانين لمدة 5 دقائق.

3. الكشف عن الكيوتين Cutin:

يغلب وجودة في الجدر الخارجية لخلايا البشرة، توجد منه طبقات فوق البشرة مكونة الأدمة، وهو مادة دهنية غير منفذة للماء والغازات.

- يحمل أحد القطاعات العرضية الطازجة لورقة نبات الدفلة على شريحة زجاجية نظيفة.
- توضع قطرة من وتترك لفترة وجيزة مع التسخين على لهب هادئ.
- يتلون الكيوتين بلون برتقالي إلى احمر .

- توضع قطرة من الجلسرين على العينة وتغطى بغطاء الشريحة وتفحص.

يصطبغ الكيوتين بلون احمر عند معاملته بصبغة سودان3 Sudan3.

اكتبي نتيجة الكشف عن مكونات الجدار الخلوي التي قمت بالعمل عليها وناقشي النتيجة.

(عملي 6): التحضير المستديم للعينة النباتية باستخدام طريقة التقطيع Microtomy

يعتمد تحضير العينات الكبيرة التي لا يمكن فحصها مباشرة تحت المجهر الضوئي والتي يحب تقطيعها إلى أجزاء صغيرة، على الالتزام بجداول زمنية مناسبة ومعينة باستخدام محاليل ذات نسب معينة أيضا من المواد الأولية تتلاءم وطبيعة تلك العينات.

وللحصول على قطاعات ذات نوعية جيدة من عينات مطمورة بشمع البرافين أو أي وسط طمر آخر، فان هذه العملية لا تتم آليا ولكنها تمر بخطوات ذات تنظيم معين.

وهناك بعض العوامل التي تؤثر في عملية التقطيع يجب الانتباه لها وهي :

1. نوع السكين ودرجة حدتها وزاوية ميلها.
2. وسط الطمر.
3. نوع النسيج النباتي.
4. مهارة القائم بعملية التقطيع وخبرته في هذا المجال.
5. إتباع الخطوات التي تسبق عملية التقطيع كالقتل والتثبيت، ونزع الماء، وعملية الترويق والتشريب ثم الطمر وتحميل العينة على آلة التقطيع.

ونظرا لأهمية عملية التقطيع واحتياجها إلى خطوات عديدة يجب إتباعها بدقة، منها :

- القتل والتثبيت.
- نزع الماء.
- الترويق.

- التشريب.
- الطمر.
- التقطيع وإزالة مادة الطمر.
- الصبغ والتحميل على الشرائح الزجاجية.

الخطوة الأولى: القتل والتثبيت Killing & Fixation

يعرف التثبيت بأنة العملية التي يتم فيها فصل وقتل الأنسجة وحفظها على الحالة التي كانت عليها أثناء الحياة قدر الإمكان، وهي العملية التي تحفظ المكونات الخلوية ثابتة دون أن يصيبها أي تغير أو تلف. وأفضل المثبتات هو ما تكون له القدرة على تخلل الأنسجة والخلايا بسرعة قبل حدوث عمليات التغير التي تحصل نتيجة للتحلل الذاتي بفعل بعض الأنزيمات أو نشاط عدد من الكائنات الحية الدقيقة. وهناك العديد من المحاليل المثبتة للأنسجة الخلوية، وسوف نستخدم في عملية القتل والتثبيت محلول الفورمالين الكحولي FAA ويحضر هذا المحلول بمزج المحاليل الأولية التالية:

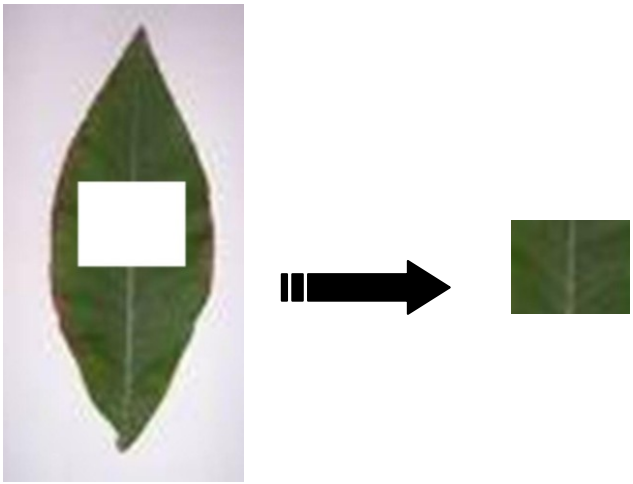
90 مل كحول ايثيلي 50% أو 70%	Ethanol alcohol
5 مل فورمالين 40%	Formalin
5 مل حمض الخليك الثلجي	Glacial acetic acid

الأدوات المطلوبة: أوراق وسيقان نباتية طازجة وغضة، شفرات، أوعية زجاجية، محلول FAA.

طريقة العمل:

- تقسم العينات على المجموعات فمجموعات تأخذ الساق ومجموعات تأخذ الأوراق.
- يؤخذ من الساق خمس أجزاء لكل مجموعة بحيث يكون طول الجزء 1سم، كذلك يؤخذ من الأوراق 5 قطع لكل مجموعة مساحة كل قطعة 1سم^2 تحتوي على العرق الوسطي كما في الشكل (1) .

- توضع القطع المتماثلة لكل نبات في وعاء زجاجي مناسب وتغمر بمحلول FAA وتغطى ، ويكتب على الوعاء اسم المجموعة، و اسم النبات، ونوع العينة (ساق، ورقة)، وتترك لفترة تتراوح بين 12-24 ساعة.



شكل (1)

الخطوة الثانية: نزع الماء Dehydration

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

وهناك طريقتين لإزالة الماء وتهيئة العينة النباتية لتشبيعها في شمع البرافين مثلا، الطريقة الأولى : وفيها يسحب الماء من العينة بمادة لا تذيب الشمع ثم تنقل بعد ذلك إلى مادة أخرى أو محلول يذيب الشمع. أما الطريقة الثانية : يكون المحلول النازع للماء هو في الوقت نفسه مذيب للشمع.

وسوف نستخدم هنا الطريقة الأولى باستخدام محلول غير مذيب للشمع وهو الكحول الايثيلي الذي يحضر في تراكيز متدرجة تبدأ من 80%، 90%، 100%.

نستكمل التحضير بعد مرور 24 ساعة من وضع العينات في محلول القتل والتثبيت FAA.

- يسكب محلول FAA بحرص شديد حتى لا تسقط العينات النباتية (القطاعات).
- تضاف كمية مناسبة من الكحول الايثيلي 80% إلى العينات النباتية (القطاعات) في نفس الوعاء الزجاجي المستخدم وتترك لمدة ساعتين في هذا التركيز من الكحول.
- يسكب الكحول الايثيلي 80% بحرص شديد حتى لا تسقط العينات النباتية (القطاعات) ويستبدل بكمية أخرى من الكحول الايثيلي بتركيز 90% وتترك لساعتين أيضا.
- بعد مرور ساعتين يسكب الكحول الايثيلي 90% بحرص شديد حتى لا تسقط العينات النباتية (القطاعات) ويستبدل بكمية أخرى من الكحول الايثيلي بتركيز 100% وتترك لساعتين أيضا.
- بعد مرور ساعتين يسكب الكحول الايثيلي 100% بحرص شديد حتى لا تسقط العينات النباتية (القطاعات) ويستبدل بكمية أخرى من الكحول الايثيلي بتركيز 100% وتترك مدة 24 ساعة.

الخطوة الثالثة: الترويق Clearing

هي عملية ترسيب الشوائب المعلقة في الماء أو غيرة من السوائل باستخدام وسائل طبيعية أو كيميائية ، ويعني به أيضا نقل العينة النباتية من الوسط النازع للماء إلى وسط يذيب مادة التشريب، فإذا كان الوسط النازع للماء لا يذيب الشمع مثلا فالمقصود به إزالة الكحول أو أي مادة أخرى من داخل أنسجة العينة والتي تؤدي إلى صعوبات عند عملية التقطيع. وسوف نستخدم محلول الزايلين (الزيلول) Xylene لاستكمال التحضير.

وسوف نستخدم هنا محلول الزايلين (الزيلول) Xylene لاستكمال التحضير تراكيز متدرجة ممزوجا بكميات متفاوتة من الكحول الايثيلي كما يلي:

1. كحول ايثيلي : زيلول 1:3
2. كحول ايثيلي : زيلول 1:1
3. كحول ايثيلي : زيلول 3:1

نستكمل التحضير بعد مرور 24 ساعة من وضع العينات في الكحول الايثيلي بتركيز 100%:

- يسكب الكحول الايثيلي 100% بحرص شديد حتى لا تسقط العينات النباتية (القطاعات) ويستبدل بكمية مناسبة من محلول كحول ايثيلي : زيلول 1:3لمدة ساعتين ثم نتخلص منه.
- يسكب محلول كحول ايثيلي : زيلول 1:3 بحرص شديد حتى لا تسقط العينات النباتية (القطاعات) ويستبدل بكمية مناسبة من محلول كحول ايثيلي : زيلول 1:1لمدة ساعتين ثم نتخلص منه.
- يسكب محلول كحول ايثيلي : زيلول 1:1 بحرص شديد حتى لا تسقط العينات النباتية (القطاعات) ويستبدل بكمية مناسبة من محلول كحول ايثيلي : زيلول 3:1 لمدة ساعتين ثم نتخلص منه.
- يسكب محلول كحول ايثيلي : زيلول 3:1 بحرص شديد حتى لا تسقط العينات النباتية (القطاعات) ويستبدل بكمية مناسبة من محلول زيلول مطلق لمدة 24 ساعة.

الخطوة الرابعة: التشريب Infiltration

تتلخص عملية التشريب بزيادة تدريجية لتركيز مادة التشريب (شمع البرافين) وتقليل مادة الترويق، وتتطلب عملية تشريب الأنسجة النباتية المحافظة على درجة حرارة الشمع بحيث تصبح أعلى قليلا من درجة انصهاره.

منى سليمان الوه

نســتكمل التحضــير بعــد مــرور 24 ســاعة مــن وضــع العينــات فــي محلــول زيلول مطلق لمدة 24 ساعة:

يضاف بضع بلورات من شمع البرافين إلى العينات المغمورة بالزيلول المطلق وكلما ذابت بلورات الشمع نضيف بلورات جديدة ، وهكذا لمدة تتراوح بين 24 إلى 48 ساعة وتوضع أثناء ذلك في فرن على درجة حرارة 50°م وهي مغطاة بغطاء الوعاء المستخدم، بعد مرور 48 ساعة يضاف مزيد من بلورات الشمع مع فتح الغطاء حتى يتطاير الزيلول وتتشرب العينة الشمع تماما .

عملي (7): استكمال خطوات التثبيت المستديم للعينات النباتية

الخطوة الرابعة: الطمر Embedding

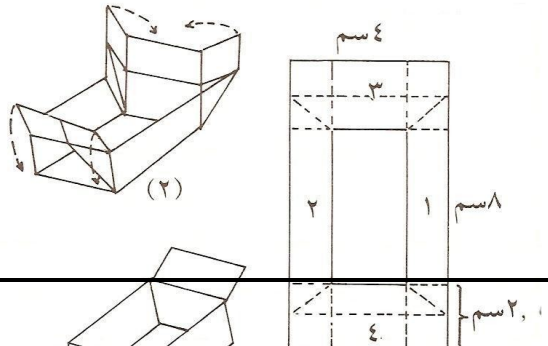
الطمر هو دفن العينات النباتية المراد قطعها بجهاز التقطيع بكمية من وسط الطمر، لتصبح على هيئة قالب صلب يجعلها صلبة ومتماسكة أثناء مرورها على سكين القطع، كما أنها تساعد في تثبيت العينة على حاملها عند استخدام جهاز التقطيع.

وطرق الطمر عديدة وتختلف تبعا لنوع مادة الطمر المستخدمة وسوف نستخدم في تحضيرنا هذا طريقة **شمع البرافين Paraffin wax method:**

يعتبر شمع البرافين احد مشتقات البترول الخام الذي يتألف من سلسلة طويلة مشبعة لهيدروكربون الميثان، أما الشمع التجاري فهو خليط من الهيدروكرونات العالية $CH_3(CH_2)_nCH_3$ (n تتراوح بين 21-34 درة كربون)، كما انه لا يذوب في الماء أو الكحولات بأنواعها المختلفة أو الجلسرين لهذا فانه عند تنقيته يفضل صهره بالماء الساخن عن طريق استخدام حمام مائي فتترسب الشوائب إلى أسفل المزيج ومن ثم يسهل فصلها ويصبح الشمع نقيا بعد التبريد، ويعتبر شمع البرافين من أفضل أوساط الطم ومن أكثرها شيوعا.

نستكمل تحضير العينات بعد أن يتطاير الزيلول وتتشرب العينة الشمع تماما :

- عمل قالب ورقي ليتم طمر العينات فيه، ويتم صنع القالب الورقي بالطريقة الموضحة بالرسم :

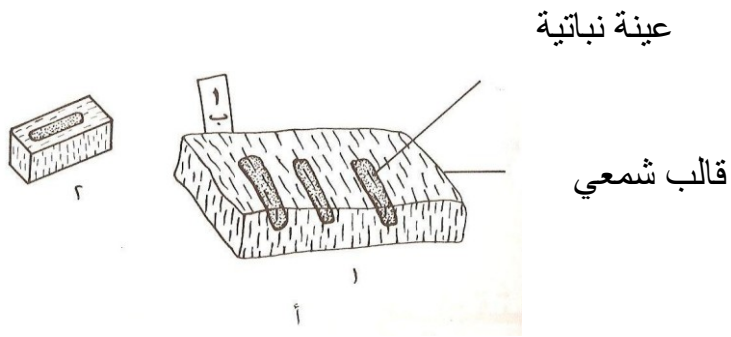


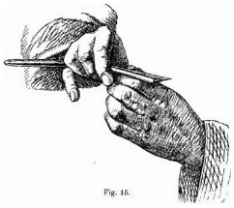
تقص ورقة مستطيلة بطول 8سم وعرضها 4سم، ثم يثنى إلى الداخل 1سم من الحافة الموازية لطول الورقة من كلا الجانبين (2,1)، وحوالي 2,5سم من الجهة الموازية لعرض الورقة من كلا الجانبين (4,3)، ثم تثنى الأجزاء المرتفعة من (4,3) اى الخلف لتعمل على إحكام وتماسك الأركان وبذلك يصبح القالب جاهزا لصب الشمع المنصهر.

- تصب محتويات أنبوة العينات ما فيها من شمع البرافين وعينات في القالب المناسب مع تنسيق العينات بملقط يسخن على لهب بنزن وجعلها في نظام خاص بأسرع ما يمكن.
- الإسراع في تجميد السطح العلوي للقالب بإمرار تيار هواء خفيف وذلك بالنفخ البسيط من الفم على سح القالب ثم يوضع بعد ذلك القال في حمام ثلجي حتى يتجمد.
- تكتب البيانات اللازمة على القالب (نوع العينة، اسم المجموعة، اتجاه القالب إذا كانت العينة المستخدمة ورقة).
- تخزن القوالب الشمعية في مكان بارد لحين تقطيعها بجاز التقطيع (الميكروتوم).

الخطوة الخامسة: التشذيب Trimming

هي عملية إزالة الشمع الزائد حتى يتم الحصول على قالب مربع أو مستطيل بقدر الإمكان، أو على الأقل يجب أن تكون الحافتين العليا والسفلى للقالب متوازيتين، لأن العينة المطمورة بشمع البرافين (القوالب الشمعية) لا يمكن استخدامها مباشرة بعد عملية الطمر حيث أن شمع البرافين لا يحيط بالعينة بالتساوي من جميع جوانبها أو أن القالب الشمعي يحوي أكثر من عينة.

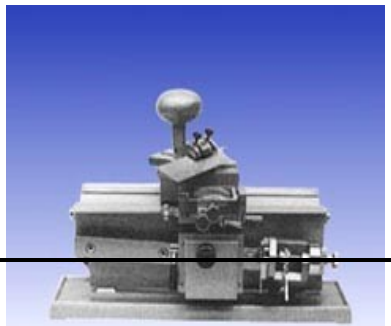


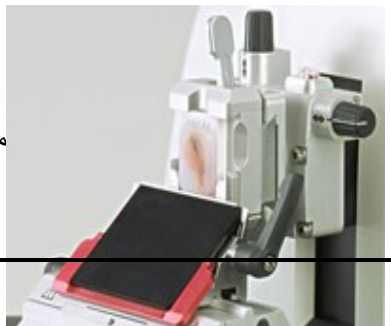


الخطوة السادسة: التقطيع Sectioning

المقصود بالتقطيع :الحصول على قطاعات رقيقة للعينة لكي يتسنى فحصها تحت المجهر، فانه يستخدم جهاز خاص يسمى جهاز التقطيع الميكروتوم Microtome ويوجد على عدة أنواع مختلفة ولكنها تشترك بتراكيب معينة مثل : السواعد المساندة للسكين، قوالب العينات، التدريج الميكرومتري وجميعها تهدف إلى الحصول على قطاعات رقيقة للعينة يمكن فحصها تحت المجهر. ويمكن أن تختلف عن بعضها البعض في نوع الحركة، تثبيت السكين،المواد المستخدمة في عملية الطمر وتثبيت العينة للتقطيع.

جهاز تقطيع (ميكروتوم) يدوي





على من يقوم بعملية القطع مراعاة بعض الأمور التي من شأنها إنجاح عملية التقطيع (لطفي والحاج ،1984) :

أجهزة تقطيع (ميكروتومات) آلية

1. أن يكون جهاز التقطيع [illegible] شمعية يجب إزالتها بفرشاة مناسبة.
2. أن يكون جهاز التقطيع خاليا من أي مشاكل ميكانيكية .
3. قبل تثبيت السكين وقالب الشمع في جهاز التقطيع يجب أن يكون الدولاب اليدوي محبوسا (فصل التيار الكهربائي أثناء تثبيت القالب الشمعي) لأن ذلك يعطي أمانا للطالب بحيث يتجنب أي جرح من السكين.
4. أن تكون سكين القطع نظيفة وحادة، ومثبتة بإحكام في مكانها الصحيح وبالناوية المناسبة لعملية القطع، إذ يجب إمالة السكين حتى يلامس حدها القاطع وجه قالب الشمع بالقدر المناسب.
5. توفر الأدوات التالية بالقرب من القائم بعملية التقطيع: ملقط أو حامل للمقاطع، علب ورقية لحفظ المقاطع، قنينة زايلين و فرشاة صغيرة لتنظيف حد سكين القطع.
6. بعد التأكد من الأمور السابقة يمكن للطالب أن يباشر عملية القطع التي تبدأ بفك حبس الدولاب اليدوي وتقريب السكين باتجاه قالب الشمع بحيث تكون المسافة بينهما حوالي 2 ملم، بعد ذلك يعاد تثبيت السكين وقالب الشمع بشكل محكم وتبدأ عملية القطع بعد تعيين سمك المقطع الذي يقترح أن يكون 10 ميكرون.
7. بعد الحصول على عدة مقاطع يجب التأكد بأن مقاطع الشمع تحتوي على النسيج، عندئذ ترفع المقاطع بواسطة حامل المقاطع أو فرشاة رسم إلى علبة ورقية لحفظها لحين تحميلها على شرائح فيما بعد.

عملي (8): استكمال خطوات التثبيت المستديم للعينات النباتية

الخطوة السادسة: تحميل القطاعات وتثبيتها على الشرائح وإزالة مادة الطمر

بعد الحصول على عدة مقاطع تحمل على شرائح زجاجية نظيفة لتهيئتها لعملية الصبغ ويتم ذلك بإتباع الخطوات التالية:

1. يجب أن تكون الشرائح الزجاجية نظيفة تماما لأن الشرائح الغير نظيفة تتسبب في سقوط المقاطع عنها أثناء عملية الصبغ.
2. أن يتوف وسط إلصاق مناسب ويعمل هذا الوسط على التصاق المقاطع بالشرائح ، وهناك أوساط لصق متنوعة وسنستخدم في تحضيرنا هذا طريقة **ماير Mayeŕs Albumen** وهي :

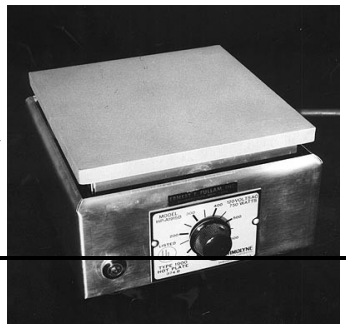
بياض بيض 50مل

جليسرول 50مل

ساليسلات الصوديوم أو ثايمول 1غم

يرج بياض البيض أولا في نقاط قليلة من حمض الخليك المخفف . ثم تضاف المكونات الأخرى وترج جيدا.

3. نبدأ عملية تحميل المقاطع وذلك بمسح الشريحة الزجاجية بقطرة من محلول ماير بطرف السبابة، ثم توضع المقاطع بحرص شديد حتى لا تتقطع، يكتب على الشريحة نوع العينة (ورقة، ساق) واسم الطالبة.
4. بعد تحميل المقاطع على الشرائح توضع على صفيحة تدفئة Hot plate عند درجة حرارة 40 °م لمدة 24 ساعة، استعدادا لعملية الصبغ.



عملي (9): استكمال خطوات التثبيت المستديم للعينات النباتية

الخطوة السابعة: الصبغ Staining

الصبغ عملية حاسمة جدا في التحضير المجهري، ذلك انه بدون صبغ مناسب فانه يصعب تمييز مكوناتها وبالتالي تفقد عملية التحضير أهميتها.

تعتمد عملية الصبغ على عوامل فيزيائية و كيميائية، فمن ناحية فيزيائية تعتمد العملية على عوامل طبيعية مثل الامتصاص والادمصاص والخاصية الشعرية والانتشار والتناضح. ومن الناحية الكيميائية تعتمد العملية على التفاعل الكيميائي بين شق موجب أو سالب في الصبغ وبين مجموعات كيميائية معينة في النسيج.

وسوف نستخدم صبغتين هما الأخضر الضوئي (الخفيف) والصفرانين لصبغ القطاعات حيث تصطبغ الخلايا البرنشيمية أو ذات الجدر الرقيقة عموما باللون الأخضر (صبغة الأخضر الضوئي) أما الخلايا ذات الجدر الغلظة أو الملجننة فتصطبغ باللون الأحمر (صبغة الصفرانين) ويتم الصبغ بإتباع الخطوات التالية:

خطوات الصبغ

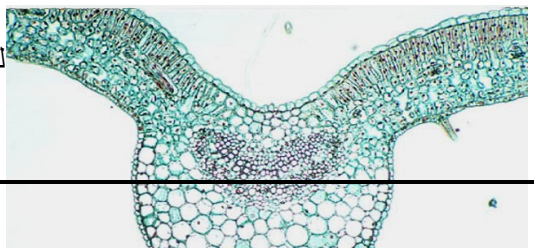
المحلول	المدة بالدقائق
زيلول مطلق	20 دقيقة
1زيلول : 1كحول	1-2 دقيقة
كحول 100%	1 دقيقة
كحول 96%	1 دقيقة
كحول 80%	1 دقيقة
كحول 70%	1 دقيقة
كحول 50%	1 دقيقة
صبغة الصفرانين	30 دقيقة
كحول 50%	1 دقيقة
كحول 70%	1 دقيقة
كحول 96%	1 دقيقة
صبغة الأخضر الضوئي	1-1/2 دقيقة
كحول 100%	1 دقيقة
كحول 96%	1 دقيقة
1زيلول : 1كحول	1-2 دقيقة

عملية

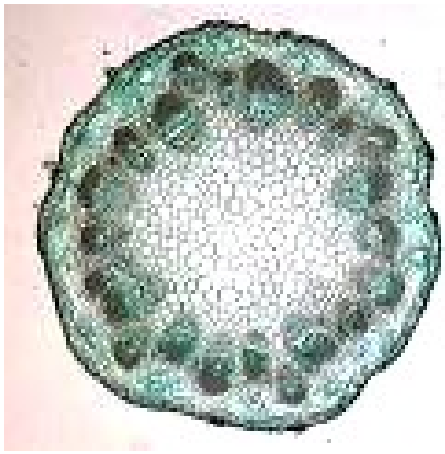
زيلول مطلق	1 دقيقة

بعد ذلك يوضع كمية مناسبة من وسط التغطية (D.P.X) على القطاعات وتغطى بغطاء الشريحة بحرص حتى لا تتكون فقاعات هوائية ثم توضع في فرن عند درجة حرارة 50°م لمدة 24 ساعة حتى يجف وسط التغطية ثم تفحص.

عملي (10): فحص القطاعات المصبوغة ومقارنتها بقطاعات مصبوغة جاهزة



ق.ع لورقة نبات من ذوات الفلقتين



ق.ع لساق نبات من ذوات الفلقتين

المراجع

1. الدعيجي، عبدالله، مليجي، عبدالسلام، عبد الفتاح،جلال (1997): أساسيات تحضير العينات النباتية.دار الخريجي للنشر والتوزيع، الرياض، المملكة العربية السعودية.
2. لطفي،رمسيس، الحاج،حميد (1984): دليل مختبر التحضير المجهري الضوئي. دار جون وايلي واولادة، نيويورك.
3. جميع الصور أدرجت من عدد من المواقع على الشبكة العنكبوتية (الانترنت).

تم بحمد الله

إن أصبت فمن الله

وان أخطأت فمن نفسي والشيطان

منى الوهيبي