كلية العلوم

القسم : **علم الحياة**

السنة : **الثالثة**

المادة : تنامي نباتي

المحاضرة : الاولى/عملي/

{{ A to Z مكتبة }}

Facebook Group : A to Zمكتبة

يمكنكم طلب المحاضرات برسالة نصية (SMS) أو عبر(What's app-Telegram)على الرقم 0931497960

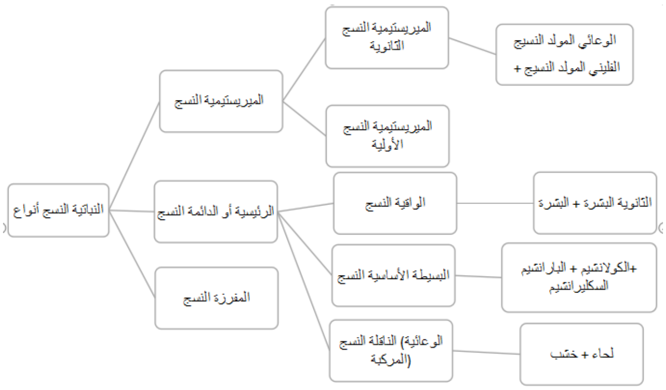
الدراسة العملية لمراحل التنامي النباتي

تتمتع النباتات الراقية ببنية مورفولوجية معقدة ونشاط فيزيولوجي متعدد، حيث تتألف أجسامها من أعضاء أساسية جذر ساق أوراق أزهار ويقوم كل عضو بتأدية وظيفة أو عدة وظائف خاصة.

يتألف كل عضو نباتي من النسج وفي كل نسيج مجموعة من الخلايا تؤدي الوظيفة الخاصة بها على سبيل المثال النسج الوعائية تشكل جملة كاملة تمتد بدون انقطاع في جميع أقسام النبات تصل من الجذور إلى الأوراق.

قد تختلف الخلايا المكونة لنسيج ما عن بعضها بالشكل والوظيفة أو الاثنين معاً.

أنواع النسج: تتشكل جميع النسج من البيضة الملقحة التي تنقسم بدورها عدة انقسامات خيطية لتعطي في النهاية نسجاً مختلفة والمخطط التالي يوضح ذلك:



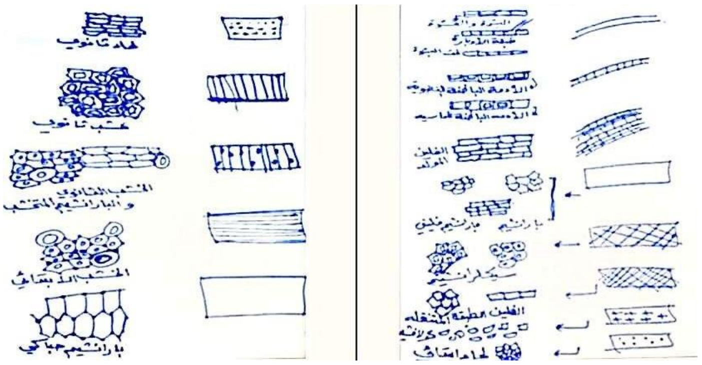
طرائق الرسم العملي للمحضرات النسيجية النباتية، وتكون الرسوم النباتية على نوعين:

1- الرسوم الإجمالية:

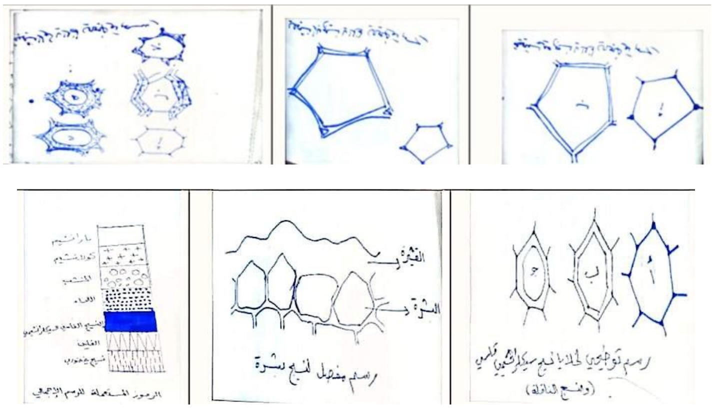
تهدف إلى ترجمة المقطع المراد دراسته إلى رموز يعبر كل منها عن نسيج معين ويستخدم هذا النوع من الرسوم لدراسة النسج النباتية تحت المكبرة أو تحت المجهر بأضعف تكبير ويجب عند الرسم الإجمالي مراعاة مايلي:

a. ترتيب النسيج بشكل متسلسل داخل القطاع النباتي.
b. تحديد مساحة كل نسيج داخل القطاع النباتي.
c. وضع رموز خاصة لكل نسيج.
d. نقل الرسم بشكل واضح ومرتب.

2- **الرسوم المفصلة:** يتم فيها نقل المقطع المراد دراسته نقلا كاملا مفصلا بكل دقة وتكون الرسوم صورة مطابقة للقطاع المدروس وتنفذ الدراسة تحت المجهر وبالتكبير الكافي لدقة الرسم، ونستعرض فيما يلي بعض النماذج المختلفة للرسوم الاجمالية والرسوم المفصلة.



الشكل 1: **الرسوم الإجمالية للنسج النباتية**



الشكل 2: الرسم التفصيلي لبعض النسج النباتية ورموز الرسوم الإجمالية

طرائق إعداد المحضرات النسيجية

المحضرات النسيجية هي مقاطع رقيقة طولية أو عرضية يتم إجراؤها في الأعضاء النباتية أو الحيوانية يدوياً أو باستخدام الميكروتوم ومن ثم معالجتها وتلوينها بملونات حيوية خاصة ودراستها مجهرياً للتعرف على البنية الخلوية وفهم العديد من الوظائف الحيوية للنسج الحية.

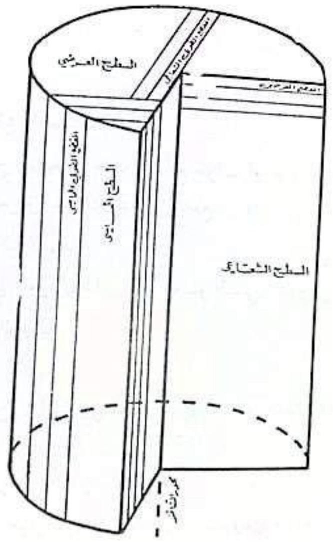
يمكن دراسة المحضرات النسيجية تحت المجهر بطريقتين:

1. دراسة المحضرات الحية.
2. دراسة المحضرات المثبتة.**أولاً: دراسة المحضرات الحية:** تتم دراسة المحضرات الحية بعد إعدادها مباشرة وذلك بوضع قطرة من الماء فقط على العينة المدروسة، وثم وضعها على شريحة زجاجية ودراستها تحت المجهر بالتكبير المناسب، ويمكن استخدام الملونات الحيوية المناسبة مثل أحمر كارمن المعتدل بتراكيز خفيفة جداً **لا تؤدي لقتل الخلية الحية.**

الجمهورية العربية السورية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة طرطوس – كلية العلوم
قسم علم الحياة

عند إعداد المحضرات النسيجية اليدوية يجب أن يتم مراعاة القواعد الآتية:

- يجب أن يكون المشرط المستخدم في التقطيع حاد جداً ونظيف
- أن تكون العينات نظيفة وغضة وعند إجراء التقطيع يوضع المشرط بشكل عمودي فوق العينة
- إجراء عدة مقاطع متتالية رقيقة جداً ونستبعد القطاعات غير الجيدة ونبقي الجيدة منها فقط
- نختبر جودة العينة بفحصها مباشرة تحت المجهر بعد وضعها على شريحة زجاجية مع قليل من الماء
- بعد التأكد من جودة العينة تنقل العينات للتلوين ببضع قطرات من أزرق الميتيلين لبضع دقائق وتغسل بالماء لإزالة آثار الملون
- و يوضع فوقها قليل من الغليسرين وتوضع فوقها الساترة ونخفف من الغليسرين الزائد بورق ترشيح وتدرس تحت المجهر



ملاحظة: يعد ملون أزرق الميتلين ملون جيد للدراسة الأولية لبعض النسج.

تختلف طرق أخذ المقاطع النسيجية لعينة ما باختلاف الهدف من دراستها يمكن أن يتم إجراء مقطع عرضي عند دراسة البنية الداخلية لساق مثلا او طولي إذا أردنا دراسة توزع الأوعية ومتابعة مجرى النسغ فيها أو مماسي إذا كان الهدف دراسة تنضد الطبقات السطحية من النسج النباتية او ملاحظة الثغور ...الخ.

ثانياً: دراسة المحضرات المثبتة: لإعداد المحضرات المثبتة يجب أولاً عمل مقاطع رقيقة في الأعضاء النباتية المختلفة (الجذور– الساق – الأوراق– ....الخ) يمكن من خلالها رؤية المكونات الداخلية بوضوح بواسطة العدسات العينية ومن ثم اتباع عدد من الخطوات التحضيرية يتم فيها معالجة المحضرات **فيزيائيا أو كيميائياً بهدف قتل الخلايا وتثبيتها**، ولتحقيق ذلك لا بد من تحضير العينة النباتية الحية والتي تمثل عضو نباتي كامل حيث تقطع الساق والجذر والأوراق الكبيرة إلى قطع متساوية بطول 1 إلى 2سم بينما الأوراق الصغيرة تبقى كماهي ومن ثم يتم اتباع المراحل الآتية:

1- **التثبيت:** وهو قتل الخلايا الحية سريعاً دون المساس بمكوناتها الداخلية ويتم ذلك عن طريق استخدام طرائق التثبيت الفيزيائية أو الكيميائية، ويتم **التثبيت الفيزيائي** عن طريق التسخين مما يؤدي إلى تغير شكل البنية الخلوية، أو التجفيف في درجات الحرارة العادية أو التبريد ويمكن استخدام بروتوكول freezing drying لتجفيف النسج الخلوية بالتبريد دون تغير بنيتها.

بينما **بالتثبيت الكيميائي** يستخدم محلول يتركب من بضعة مواد كيميائية لقتل الخلايا وتثبيتها مع المحافظة على مكونات النسيج أو الخلية بحالة مشابهه لوضعها عندما تكون حية وذلك من خلال قيام مواد القتل والتثبيت بوقف جميع العمليات الفيزيولوجية داخل الخلية

الحية ويجب أن تحتوي جميع المثبتات البيولوجية على مواد تستخدم لقتل الخلايا وأخرى للتثبيت علماً أن مواد القتل أسرع نفوذية من مواد التثبيت، وتقوم المثبتات عموماً بمايلي:

a. تلعب دوراً في تثبيط أنزيمات التحلل الذاتي.
b. تعمل على إيقاف تحلل النسيج النباتي الناتج عن تحلل بعض الأحياء الدقيقة كالبكتيريا.
c. تحفظ الخلايا من الانتباج أو التقلص الأسموزي نتيجة تعرضها لعمليات التجفيف والتشرب اللاحقة.
d. يزيد من قدرة النسج على تقبل صبغة ملون معين دون غيرها.
e. تقوية النسج لمقاومة التقطيع.

التلوين ودراسة المقاطع النسيجية

تستخدم ملونات عديدة للكشف عن طبيعة النسيج النباتي، وسنذكر منها بعض الملونات التي سنستخدمها في دراسة التنامي النباتي وأهمها طريقة التلوين المضاعف باستخدام أحمر كارمن الشبي وأخضر اليود.

بعض أنواع الملونات وطريقة تحضيرها:

صبغة أحمر كارمن:

تتركب من صبغة الكارمن الحامضية 10غ + 10غ من هيدروكسيد البوتاسيوم+ ماء مقطر 200 مل+ فورمالين 1مل أو بلورة ثيمول + 100 مل كحول 50%.

طريقة التحضير: تضاف الصبغة 10 غ إلى حمض الخل 45% ويغلى في حمام مائي لمدة خمس دقائق وثم يبرد ويرشح ويجفف ليتكون الكارمن الحامضي ومن ثم يؤخذ منه 1 غ ويضاف إلى 10غ هيدروكسيد البوتاسيوم مع 200 مل ماء مقطر ويسخن حتى تذوب الصبغة ويرشح الخليط ويضاف بلورات الثيمول لمنع التعفن.

أما أحمر كارمن الشبي فيحضر كالتالي: يضاف 500 مل من الماء المقطر إلى 20 غ من شب البوتاس مع 5 غ من مسحوق أحمر كارمن في وعاء زجاجي ويغلى المزيج لمدة 20 دقيقة على نار خفيفة ومن ثم يبرد ويرشح.

أخضر اليود: 500 مل من الماء المقطر مع 5 غ من مسحوق أخضر اليود ويحرك جيداً لكي يختلط المزيج.

ولتحضير الملون الذي يستخدم في التلوين المضاعف نقوم بإضافة 500 مل من محلول أحمر كارمن الشبي مع 1.25مل من محلول أخضر اليود فنحصل على الملون الذي يستخدم في عملية التلوين المضاعف والذي يلون الغلاف البكتوسللوزي بالأحمر الفاتح (زهري تقريباً) مثل اللحاء وأما الغلاف المتخشب مثل خلايا نسيج الخشب فيتلون باللون الأخضر.

الهيماتوكسيلين: تذوّب الصبغة في الكحول أو الماء ليصبح هيماتين وهو المسؤول عن اللون ويستخدم معها مظهر من الحديد أو الألمنيوم وتكون الصبغة بلون أحمر بوجود الحمض وأزرق بوجود الأسس. ويتم تحضيرها كالتالي:

أولاً تحضير مظهرات اللون وهي أملاح المعادن: كبريتات الحديد، كبريتات النحاس.......

Ferous sulphat (iron), copper sulphat, tatrtaric acid, aluminum ammonium sulphat (ammonia alum)))

ثانياً: تحضير الصبغة: 10 غرام من صبغة الهيماتوكسيلين + 100 مل كحول ايتيلي

يتم خلط الصبغة مع مظهر اللون وإجراء التلوين ويسمى ذلك **صبغ مباشر** أو يتم الصبغ أولاً ومن ثم المعاملة بالمظهر ويسمى ذلك صبغ غير مباشر.

الصبغة السابقة تحتاج لأشهر لاستخدامها لذلك يتم تحضير الصبغة بإضافة 5مل كحول ايتلي إلى 100 مل ميثيل سلفات و5 مل ماء مقطر و50 مل ماء عادي (لوجود الكالسيوم فيه) مع إضافة آثار من بيكربونات الصوديوم وتمزج المكونات وتستخدم ملون ومظهر للون بالوقت ذاته.

صبغة الفوكسين القاعدي: من الصبغات الخلوية المستخدمة للجدر الخلوية وتحضر بإذابة محلول الصبغة في الكحول 70% وهي صالحة لصبغ النوى. وتصلح للمحضرات النباتية والحيوانية والجراثيم ومن أنواعها:

فوكسين كربول: فوكسين قاعدي 0.3 غرام + 10مل كحول 95% + 5مل فينول+ ماء مقطر 95 مل. تذاب الصبغة في الكحول ويضاف الفينول وتترك أسبوع ومن ثم ترشح قبل الاستخدام.

فوكسين زيل: فوكسين قاعدي 1غرام+ 10 مل كحول مطلق+ 5 غرام فينول وتحضر على مراحل حيث تخلط المكونات الثلاثة السابقة وتتكون عجينة ومن ثم تغسل العجينة 10 مرات بالماء المقطر في كل مرة 10 مل ويجمع محلول الغسل في دورق سعة 100 مل لعدة ساعات ومن ثم يرشح ويستخدم للصبغ، وعادة يتم الصبغ به لمدة 10- 20 دقيقة ويستخدم حمض الخليك كمظهر للون.

الفوكسين الحامضي: 15 مل من الفوكسين 5% + 15 مل حمض البكريك + 50 مل ماء مقطر، ويضاف لهذا لمحلول 25 مل حمض HCL المركز. **(إذا ذكر اسم فوكسين فقط يكون مقصود الفوكسين الحامضي).**

أزرق الايثلين: طرائق تحضيرها:

1أولاً: -2 غرام صبغة + 100 مل كحول ايتلي 95% ومظهر اللون يتكون من كحول ايتلي 95% مع بضع قطرات HCL (يمكن الصبغ ومن ثم استخدام مظهر اللون).

ثانياً: لاكتو فينيل أزرق الايثلين: 10 غرام فينول + 10 مل ماء مقطر (تسخين حتى الذوبان) ويضاف 10 مل غليسيرين + 10 مل حمض اللاكتيك ومن ثم يذاب 1غرام من أزرق الايثلين في المحلول الناتج.

ثالثاً: أزرق الايثلين 1- 2 غرام + 100 مل ماء مقطر + 2 مل حمض الخل الثلجي.

رابعاً: 15 مل فينول 5%+ 1 مل صبغة أزرق الميثلين 6% + حمض الخل الثلجي 4مل وتترك لمدة ساعة ومن ثم ترشح.

أخضر المالاكيت: صبغة قاعدية وتستخدم بنسبة 0.5– 3 % بالماء أو 0.5% في الكحول 95% وإذا استخدم لوحده تترك القطاعات فيه لمدة دقيقة واحدة. وإذا استخدم الصفرانين يوضع المقطع في الصفرانين لمدة 20 دقيقة ومن ثم ينقل إلى أخضر المالاكيت لمدة 20د فتظهر خلايا الخشب خضراء بينما السيتوبلازم واللحاء حمراء اللون.

طريقة التلوين المضاعف:

أ- توضع المقاطع الرقيقة جداً (0.5) مم في زجاجات ساعة ويضاف هيبوكلوريت الصوديوم أو الكالسيوم 4–5 % (المحلول التجاري المسمى ماء جافيل) ويترك لمدة تتراوح ما بين 15 – 20 دقيقة حيث يتم قتل الخلايا وتحلل المواد البروتوبلاسمية وتبقى الأغلفة الخلوية (قد توضع لمدة أقل من دقيقة وحتى 5 دقائق إذا كان النسيج النباتي فتياً).

ب- تغسل المقاطع النسيجية إلى زجاجة ساعة تحوي الماء النقي لمدة 1–2 دقيقة للتخلص من آثار الهيبوكلوريت والمواد الخلوية الذائبة فيه.

ت- تنقل المقاطع إلى زجاجة ساعة تحوي حمض الخل وتترك 2 دقيقة وذلك لجعل وسط النسج المدروسة حمضيا لإجراء التلوين المضاعف.

ث- توضع النسج في محلول التلوين المضاعف لمدة 3–5 دقائق ولمدة أقل بالنسبة للنسج الفتية (قمم نامية، براعم حديثة النمو).

ج- تنقل المقاطع إلى زجاجة ساعة تحوي ماء عادي نظيف للتخلص من بقايا الملون.

ح- تحفظ المقاطع في زجاجة ساعة تحوي غليسيرين ومن ثم تنقل إلى شريحة زجاجية وترتب لتدرس تحت المكبرة للتعرف على الشكل العام ومن ثم تحت المجهر للتعرف على الشكل التفصيلي.

2- **حفظ العينات النسيجية:** عند الحصول على عينات جيدة تستخدم عدة طرق لحفظ العينات ومن أهمها الحفظ باستخدام بلسم كندا، وتتم عملية الحفظ على الشكل الآتي؛

- توضع العينات الملونة والجاهزة للاستخدام في وعاء زجاجي يحوي الكحول بتركيز 50% ومن ثم تنقل إلى أوعية أخرى تحوي كحول 75% ومن ثم كحول 100% حتى يتم إزالة الماء من العينة بشكل تام.
- تنقل العينات إلى وعاء تحوي الكزايلول لعدة مرات للتخلص من آثار الكحول.
- توضع العينات على شريحة زجاجية مع بضع قطرات من بلسم كندا وتغطى بساترة.
- توضع الصفيحة في محم بدرجة 50م لمدة 48 ساعة لتتم عملية التجفيف ومن ثم تحفظ لفترات طويلة بدرجة حرارة الغرفة.
- ويمكن حفظ المقاطع النسيجية بالغراء الغليسريني وذلك بوضع قطرات من الغليسرين فوق العينات، ونغطي المقاطع بساترات ونسخنها حتى الجفاف ومن ثم تحفظ لفترات طويلة بدرجة حرارة الغرفة.

الجمهورية العربية السورية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة طرطوس – كلية العلوم
قسم علم الحياة

هناك العديد من الملونات (الصبغات) التي يمكن استخدامها ويمكن تلخيص أهمها وطريقة تحضيرها في الجدول الآتي:

الصبغة	التركيز	المذيب: ماء	المذيب: كحول	ملاحظات
١ - الفوكسين الحامضى	٥و ١جم	ماء -----	--------- %٧٠	
٢ - ازرق الثيلين	١-٢ جم	-----	% ٥٠	
٣ - التوليدين	١ جم	ماء	-------	
٤-ازرق الانيلين	٢ -٥ ١- ٢	ماء -----	--------- % ٩٠	
٥-ازرق فيتوكسين	٥ جم	ماء	----------	٢ مل حمض خليك ثلجى لكل ١٠٠مل صبغة
٦- الايوسين	٥ جم ٥وجم	ماء -----	-------- %٩٥	يضاف ٢مل Hcl (١ع)
٧- الاريثروسين	١ جم	-----	% ٩٥	
٨-الأخضر السريع	٥ و جم	-----	% ١٠٠	
٩-السفرانين	١جم	ماء	% ٩٥	
١٠-البرتقالي الذهبى (ج)	١جم	ماء	% ٩٥	يضاف ٤مل Hcl(١ع)
١١-ازرق الانيلين	٢-٥ جم	ماء	% ٩٥	يضاف ٢مل حمض خليك ثلجي للمحلول المائي
١٢- احمر كونجو	٥جم	ماء	- -----	٢مل حمض خليك ثلجى لكل ١٠٠ مل صبغة
١٣ -اخضر النفثول	٢٥ جم	ماء	- -----	يضاف ٣مل حمض كبريتيك
١٤- اخضر الملاكيت	٥و -٣ جم	ماء	---------	
١٤- البنسيو	١جم	ماء	-------	
١٥- الأخضر الضوئي	٥و - ١ جم	-	% ٩٥	
١٦ الفوكسين القاعدي	٥جم	قليلة	%٧٠	
١٧-أزرق فيتوكسين	٥جم	ماء	-- ------	٢مل حمض خليك ثلجى لكل ١٠٠ مل صبغة
١٨- البنفسجي المتبلور	١ -٢ جم	قليلة	%٩٥	
١٩-احمر المتعادل	١جم	ماء	----------	
٢٠ – سودان ٣ & ٤	١ جم	ماء	% ٧٠- ٥٠	

اعمل على تطبيق التجارب الآتية بإشراف مدرس العملي

تجربة1: خذ عينة بذور لنبات من ثنائيات الفلقة والمنقوعة سابقاً بالماء:

1. **وانزع برفق الغشاء الرقيق الذي يغلفها وباعد بين الفلقتين**
2. **انزع الجنين النباتي وضعه على شريحة زجاجية**
3. **لون مباشرة باستخدام أزرق الميتلين أو أحمر كارمن وذلك بالتنسيق مع مشرف مجموعتك، وادرسه تحت المجهر على التكبير 4 ومن ثم 10 وارسم ما تشاهد رسماً إجماليا ومن ثم رسما توضيحيا**

(علماً ان نوع الخلايا التي يمكن مشاهدتها في جنين النبات هي ميرستيمية وبارانشيمية).

تجربة2: خذ غصنا غضاً للعينة النباتية التي أمامك وقم بإجراء مايلي:

1. **مقطع عرضي وآخر طولي في الساق ومقطع مماسي لبشرة الساق أو الورقة.**
2. **ضع المقاطع متتالية على شريحة زجاجية وادرسها مباشرة تحت المجهر (دون ساترة).**
3. **بعد ذلك ارفع الشريحة عن المجهر وضع المقاطع السابقة في زجاجة ساعة تحوي ملون أزرق الميتلين واتركها لمدة دقيقة.**
4. **اسحب الملون بمساعدة مشرفك، وضع بضع قطرات من الماء وانتظر لمدة دقيقة.**

أعد المحضرات السابقة إلى الشريحة وضع فوق كل منها نقطة غليسرين وغطها بساترة وادرسها تحت المجهر.

ارسم ما تشاهد بعد التلوين رسماً إجماليا ومن ثم تفصيلي على ورقة التقرير الخاصة بمجموعتك.

الجمهورية العربية السورية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة طرطوس – كلية العلوم
قسم علم الحياة

جلسة العملي الأولى

المادة: بيولوجيا تنامي نباتي	عنوان الجلسة: طرائق إعداد المقاطع النباتية	التاريخ:

أسماء طلاب الفئة / س3 علم الحياة.						
السلامة المهنية والتزام الطالب 3درجات						
إنجاز التقرير 7 درجات						
الدرجة النهائية 10 درجات						

بيولوجيا التنامي النباتي
د. ريم إبراهيم