جامعـــــة بنهـــا   دراسات عليا

كليـــة الزراعـــة   نموذج إجابة استرشادى لمادة: ميكروتكنيك نبات(٨٦٠٢)

قسـم النبات الزراعى   الفصل الدراسى الأول - العام الجامعى ٢٠١٩/٢٠١٨   الزمن : ساعتان

فرع: النبات الزراعى   (لائحة قديمة)   الدرجة الكلية : ٦٠ درجة

يجيب الطالب عن ثلاثة أسئلة فقط مما يأتى بشرط أن تتضمن السؤال الثالث:-

السؤال الأول:-أجب عن نقطتان فقط مما يأتى:-(اختيارى)

٢٠ درجة

١)عرّف علم الميكروتكنيك – ثم تكلم على كيفية أخذ العينات النباتية لدراسة تركيبها الداخلى مع ذكر أنواع التحضيرات المختلفة؟...١٠درجات

الإجابة

هو العلم الذى يختص بتعليم الطالب الأساليب الصحيحة لإعداد العينات النباتية و فحصها مجهرياً و حفظها بالطرق المناسبة وعلى أساس علمى سليم.

كيفية أخذ العينات النباتية لدراسة تركيبها الداخلى

وتؤخذ العينات النباتية من النبات وتوضع مباشرة فى محلول القتل و التثبيت للحفاظ على صورتها الطبيعية قبل القتل. ويراعى فى ذلك ١ ـ أن تكون العينات نظيفة.

٢ ـ تقطيع العينات فى حدود ٤ مم من الجذر و الساق و الأوراق.

٣ـأن تستخدم زجاجات مناسبة للعينات.

٤ـأن يغطى المحلول العينات و يزيد عليها بالضعف.

٥ ـ العينات الكبيرة يراعى تقسيمها و زيادة كمية المحلول.

٦ـيراعى غسل العينات بعد مدة القتل و التثبيت المناسبة ولو زادت المدة يراعى وضع كمية أخرى من المحلول الذى تطاير.

٧ ـ ألا تزيد مدة القتل عن المدة المناسبة لكل عينة.

أنواع التحضيرات/ ١ـمؤقتة مثل السلخ و الكشط و هرس و قطاعات عرضية.

٢ـنصف مستديمة.   ٣ـمستديمة.

****

٢) أذكر الخطوات المتتالية لإعداد شريحة نباتية باستخدام طريقة شمع البرافين – ثم تكلم عن إحداها من حيث تعريفها - المواد و الأدوات المستخدمة بها- ما يجب مراعاته عند إجرائها؟...١٠درجات

الإجابة

١ـتجميع العينات النباتية.   ٢ـعملية القتل و التثبيت للعينات.   ٣ـمرحلة غسيل العينات.

٤ـتجفيف العينات.   ٥ـالترويق.   ٦ـالطمر فى الشمع.   ٧ـتقطيع العينات.

٨ـصبغ الشرائح.   ٩ـتحميل العينات بالكندا بلسم.   ١٠ـفحص العينات و قياسها.

ثم يذكر الطالب تعريفها و أفضل المواد و الأدوات المستخدمة و ما يجب مراعاته فى خطوة واحدة فقط منها كما جاء فى المحاضرات النظرية و على سبيل المثال لأحد الخطوات:-

ـصبغ الشرائح/ نظرا لتعدد أنواع الصبغات فإن اختيار نوع الصبغة ،و طريقة الصبغ يتوقف على الغرض من الدراسة والمكون الخلوي المراد تلوينه ليسهل التعرف علية، حيث يتوقف على ذلك معرفة الطريقة الصحيحة لتجهيز الصبغة وكذلك الطريقة المثلى التي يمكن استخدمها فى صبغ (مفرد، مزدوج ....الخ). ولكي تتم عملية الصبغ بنجاح ويتم الحصول على قطاعات مصبوغة بطريقة جيدة لتحقق الهدف المنشود من عملية الصبغ يلزم أخذ بعض الاحتياطات.

أهم الاحتياطات التى يجب مراعاتها عند اختيار الصبغة:

أ ـ قدرة الصبغة على الارتباط بالمكونات الخلوية التي تتميز بها الخلية.
ب ـ أن يتم احتفاظ الجزء المصبوغ باللون المميز للصبغة أثناء العمليات التالية لعملية الصبغ(من مواد الترويق والتحميل).
ج ـ ثبات اللون لفترات طويلة حتى يمكننا الرجوع إلى القطاعات وفحصها مع مرور الزمن.
ويتوقف اختيار بعض أنواع الصبغات وطريقة الصبغ على نوع المثبت المستخدم فى تثبيت العينة مسبقا.

أهم الاحتياطات الواجب مراعاتها أثناء عملية الصبغ:

١ ـ أن يتم تجهيز الصبغات بالطريقة السليمة وبالتركيز المطلوب.
٢ – ان يتم تحديد طريقة الصبغ (مفرد ، مزدوج ،.....الخ)حسب ما سبق ذكره .
٣ ـأن تكون أواني الصبغ المستخدمة نظيفة. ٤ ـيجب تكتب البيانات بوضوح على أواني الصبغ المستخدمة .
٥ ـ أن يتم إحكام غلق أواني الصبغ وخاصة الموجود بها مذيبات. ٦–أن يتم تغيير الكحول المطلق و المذيب كل فترة.

الخطوات الرئيسية لإجراء عملية الصبغ :

أ ـ إعداد القطاعات للصبغ (١ـ إزالة شمع البرافين. ٢ـ التميوء)
ب ـ اختيار طريقة الصبغ ج ـ طرق الصبغ (مفرد ،مزدوج، ثلاثي ، متعدد)
مثال لتسلسل احواض الصبغ المفرد و المزدوج

****

٣) بماذا تفسر: ١ـيفضل استخدام الميكروتوم الثلجى عند تحضير و تقطيع بعض العينات؟.....١٠درجات
حيث يستخدم فى حالة العينات الطبية السريعة و العينات النباتية التى لا تتحمل درجات الحرارة العالية فى طريقة شمع البارافين.

****

٢ـسقوط شرائط العينات فى أول أحواض الصبغ المحتوية على الزيلول؟
وذلك نتيجة استخدام لاصق غير جيد او استخدام شرائط الجيلاتين بدلا من مسحوق الجيلاتين الناعم عند تحضير لاصق هوبت.

****

السؤال الثانى:-أجب عن ما يأتى:-(اختيارى) ٢٠ درجة

١)من الخطوات المؤثرة و الهامة فى إعداد الشرائح المستديمة للفحص المجهرى خطوة القتل و التثبيت لذا أجب عن النقاط التالية:-

الإجابة

أ) عرّف القتل و التثبيت ثم اذكر ما هى شروط المثبت الجيد؟.....٤درجات
هو استخدام محلول يتركب من بضعه مواد كيمائية فى عملية قتل وتثبيت العينات .وبذلك يتم المحافظة علي مكونات النسيج أو الخلية بحالة مشابهة ، قدر الإمكان.

–شروط المثبت الجيد:

١ـسرعة نفاذة خلال النسيج حتى تتمكن من وقف العمليات الحيوية بأسرع وقت ممكن..

٢-قلة تأثيره الفيزيائي والكيمائي علي مكونات النسيج حتى لأتسبب له اى انكماش وتلف.
٣- عدم تغير تركيبة بمرور الوقت. ٤- سهولة استعماله.
٥- اعتدال سعره وخاصة بعد ارتفاع أسعار المواد الكيمائية ،حيث يعتبر السعر من العوامل المحددة لاختيار المثبت.
٦-لايوثر في قابلية الأنسجة للصبغ بل يجب أن تساعده على قبول الصبغة.
٧-يجلط محتويات البروتوبلازم ويجعله في حالة ناعمةSmooth.
٨ -يكسب البروتوبلازم صلابة لتحمل العمليات المتتابعة حتى عملية الطمر.
٩ -يقلل من ظهور الإشكال الغير حقيقية artifacts إثناء عملية الفحص المجهرى) تظهر هذه الإشكال نتيجة ارتباط بعض المواد المستخدمة بمكونات الخلية.

****

ب) بماذا تفسر: ١-عادة ما تستخدم المثبتات فى شكل مخاليط ولا تستخدم كمثبتات منفصلة؟.....٤درجات
لايمكن لمحلول واحد أن يتضمن جميع المميزات السابقة ، ولذلك يتم تحضير محاليل التثبيت بخلط محلولين اواكثر فمثلا الكحول يقتل الخلايا وينتشر داخل الأنسجة بسرعة ولكنة يسبب انكماش السيتوبلازم ،أما حمض ألخليك الثلجي يمنع هذا الانكماش ، أما ثنائي كرومات البوتاسيوم فإنها تسبب انكماشا للعينات ولذلك يستعمل معه الفورمالدهيد الذي يقلل من هذا الضرر حيث يعمل على انتفاخ العينة، أما حمض رابع أكسيد الازميوم يحافظ على التراكيب الخلوية ولكنة لايحافظ على النواة.لذلك إن اختيار خليط مواد القتل والتثبيت بغرض المحافظة على الشكل الخارجي والمكونات الداخلية وكذلك التركيب النووي للعينة عملية هامة.

****

٢-ظهور بقع سوداء عند فحص العينات النباتية بعد الصبغ؟.....٤درجات
يرجع هذا عادة الى زيادة مدة بقاء العينات في محاليل القتل و التثبيت عن المدة المناسبة لهذه الانسجة فيما يعرف بالـ Over fixation.

****

جـ) أذكر أهم نوع من محاليل المثبتات المستخدمة مع العينات المختلفة و كيفية تحضيره؟.....٤درجات

محلول الفورمالين– الحامض -الكحول FAA يتكون من:

كحول إيثيل ٥٠ أو ٧٠	٩٠ سم ٣
حامض خليك ثلجي	٥سم ٣
فورمالدهيد (٣٧%)	٥سم ٣

هو مثبت شائع الاستعمال للنماذج النباتية وتستغرق مدة التثبيت حوالى ١٨ ساعة. يمكن تغيير كمية كل من حامض الخليك الفورمالين، وذلك تبعا لنوع العينة المراد دراستها .في حالة دراسة الأنسجة الخشبيةWoody tissues تستخدم كميات أقل من حامض الخليك وكميات أكبر من الفورمالين مثل ، محلول بليس، وذلك لكون الفورمالين بطئ الدخول في مثل هذه الأنسجة ويستعمل محلول FAA للنماذج لفترات طويلة دون أن يلحق أي ضرر بالنسيج. يفضل استخدام كحول Preservative كحافظ ٥٠ % في حالة النماذج الرهيفة، وكحول ٧٠ % في حالة النماذج الأكثر صلابة مثل السيقان والجذور.

****

٢) بماذا تفسر: ١-استخدام محلول اليود للكشف عن حيوية حبوب اللقاح؟.....٤درجات
لأن حبوب اللقاح الخصبة تحتوى على يزيد محتواها من النشا و المعروف ان اليود يحول لون النشا الى اللون الازرق عكس حبوب اللقاح العقيمة التى يقل محتواها من النشا فيظل لونها بلون اليود الفاتح فيسهل تمييز الخصبة عن العقيمة عند الفحص.

****

٢- يجب تقطيع العينات كبيرة السمك الى أجزاء صغيرة (½ أو ¼ أو أقل من ذلك) عند خطوة أخذ العينات ووضعها فى المحاليل المختلفة؟
حتى نضمن تخلل محلول القتل و التثبيت و كل المحاليل فى الخطوات المتتالية الى كل الخلايا فى العينة و بالتالى تتم كل الخطوات بصورة سليمة.

****

السؤال الثالث: أجب عما يأتى(أجبارى)

٢٠ درجة

١)أكتب ما تعرفه عن : Numerical aperture - Chromatic aberration - أذكر الصفات التشريحية التى يمكن قياسها فى قطاع عرضى لورقة نبات ذات فلقتين؟.....١٠درجات

العيب أو الخطأ اللونى (Chromatic defect) Chromatic aberration-

وهو يحدث عند مرور الضوء الأبيض كضوء أشعة الشمس فى العدسة وضعة مثل فيؤدى ذلك الى تشتت هذا الضوء بالإنكسار مما يؤدى الى تحليلة الى ألوان الطيف المعروفة لأننا نعلم أن الضوء الأبيض مكون من مجموعة أنواع من الأشعة ذات موجات ضوئية مختلفة الطول و اللون ويختلف معامل انكسار كل منهافى الزجاج وعلى فأن الأشعة الحمراء والبرتقالية التى تقع عند نهاية الأشعة المتحللة(وهى أطول فى الطول الموجى) تنكسر بدرجة أقل و بذلك تتجمع بعيداً عن البؤرة الحقيقية التى تتجمع فيها الأشعة الزرقاء و البنفسجية وهذا ما يعبر عنه هنا بـ Chromatic aber. أى العيب الذى يعطى زركشة (Fringes) أو هالات (Halos) من الألوان فى الصورة المشاهدة.

والعدسة التى تستخدم لتصحيح هذا الخطأ تسمى Semiachromatic وتوجد عادة فى الميكروسكوب عدسة أو أكثر تصحح هاذين الخطأين وتسمى بأسم Apochromatic المشتق من Aplanatic و Chromatic.

****

- Numerical aperture : مقياس درجة الوضوح

وهو يمثل بكسر عشرى أو رقم صحيح (هو واحد)وبجواره كسر عشرى يكتب على العدسة الشيئية وهذا الرقم مهم جدا إذ يمثل ما يعرف بمقياس درجة الوضوح – وقد يسبق هذا الرقم الحرفين (N.A.) وهى أختصار Numerical aperture وتوجد معادلة للحصول على هذا الرقم هى N.A. = n. sin U

(N.A.) وهى أختصار Numerical aperture أى درجة الوضوح و n = معامل إنكسار الضوء للوسط الذى تمر فيه الأشعة بين الشيئية والمرئى

وu= ٢/١ زاوية مخروط الأشعة الداخلة إلى الشيئية ونحصل عليها من جدول خاص (جدولGay ١٩٣٦) أو من منتجى أجهزة الميكروسكوبات و Sin أى جيب الزاوية

ودرجة الوضوح N.A. تعبر عن قوة تمييز العدسة الشيئية المستخدمة للمرئيات وتوجد علاقة بين N.A. وقوة التكبير لأى عدسة شيئية فلو كانت قوة التكبير صغيرة جدا فدرجة توضيح الأجزاء تكون منخفضة كذلك لو كانت N.A. منخفضة جدا فإن درجة توضيح الأجزاء ستكون منخفضة ولوكانت قوة التكبير أكبر من اللازم عن N.A. فسترى صورة كبيرة ولكنها لن تكون واضحة.

وبوجه عام يجب عدم أستخدام شيئيات الميكروسكوب المركب مع العينات المستخدمة فى الحصول على تكبير يزيد عن ١٠٠٠مرة قدر N.A. هذا بالنسبة للشخص سليم النظر أما بالنسبة للشخص ضعيف النظر فيكتفى بتكبير ٧٠٠- ٨٠٠ مرة قدر N.A. .

****

-يعدِّد الطالب الصفات التشريحية التى يمكن قياسها فى قطاع عرضى لورقة نبات ذات فلقتين كما يأتى:

Certain anatomical features of dicots. leaf

1) Thickness of upper epidermis cuticle layer
2) Thickness of Lower epidermis cuticle layer
3) Upper epidermis thickness
4) Lower epidermis thickness
5) Palisade tissue thickness
6) Spongy tissue thickness
7) Thickness of blade
8) Thickness of collenchyma layers below the upper epidermis at midrib
9) Thickness of collenchyma layers above the lower epidermis at midrib
10) Thickness of upper fibers layers in the vascular bundle
11) Thickness of xylem tissue
12) Number of xylem vessels in the vascular bundle
13) Thickness of widest xylem vessel in the vascular bundle
14) Thickness of phloem in the vascular bundle
15) Thickness of lower fibers layers in the vascular bundle
16) Length of midrib vascular bundle
17) No. of vascular bundle in midrib
18) Thickness of leaf midrib

****

٢)قارن بين فكرة عمل الميكروسكوب الضوئى المركب والميكروسكوب الإلكترونى - أذكر أجهزة القياس والفحص للشرائح النباتية ثم إشرح إحداها بالتفصيل ؟.....١٠درجات

الإجابة

- يقارن الطالب بين فكرة عمل الميكروسكوب الضوئى المركب والميكروسكوب الإلكترونى كما يأتى:

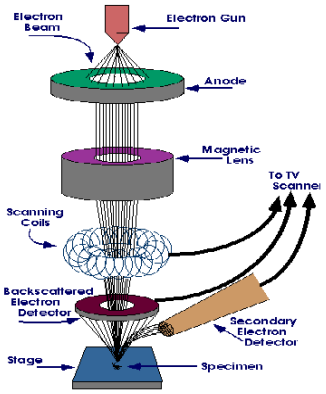
قوة التكبير عند المجهر الضوئي تتراوح بين: 1500x للمجهر الضوئي عالي الجودة ، 25x للمجهر البسيط أو المجهر التشريحي وهي Magnification power (M.P.) وتساوي حاصل ضرب العينية × الشيئية لذلك مهما بلغت قوة التكبير عند الضوئي فلن تصل إلى أن تعطي تفاصيل واضحة داخل الخلية ومكوناتها خاصة مع الكائنات الدقيقة الحية مثل البكتريا و غيرها وتعتمد قوة التكبير على قوة التمييز و التبيين وذلك بسبب ما يعرف بقوة التبيين أو قوة التمييز Resolution power (R.P.)

أما عن قوة التكبير عند المجهر الإلكتروني النفاذ وصلت في ذلك الحين إلى 600,000 مرة فيمكنه أن يظهر أجساماً تصل من الصفر إلى أقل من جزء من مائتي جزء مما تظهره أحسن المجاهر الضوئية وذلك بفضل ما يعرف بقوة التمييز وهي أضعاف عن قوة التمييز في المجهر الضوئي وتساوي تقريباً ألف ضعف
لذا تغلبت المجاهر الالكترونية على الضوئية في قوة الإظهار والتبيين والتمييز إضافة إلى التكبير العالي الذي يعتمد علي (R.P.) عند تمرير الشعاع الالكتروني خلال الجسم المراد فحصه (العينة) لنراها على لوحة تصوير ضوئي حساسة ومن ثم نقلها إلى أفلام أو إلى كمبيوتر متصل بالمجهر الالكتروني

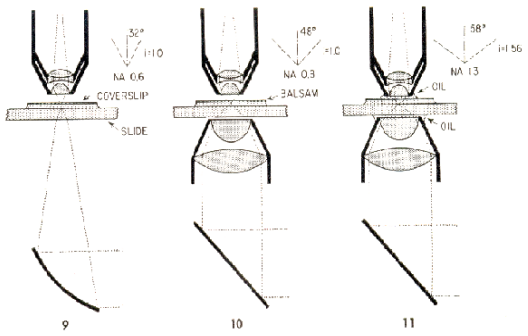
– قوة التكبير تعتمد اعتمادا كلياً على قوة التمييز و التبيين

- لذلك قوة التكبير في المجاهر الضوئية تعتمد على العدسات الشيئية(عدسات زجاجية ملموسة)
- بينما قوة التكبير في المجاهر الالكترونية تعتمد على عدسات الكترونية (غير ملموسة) غير موجودة في الواقع وإنما تحصل في مكان تصميمها عندما يمر التيار الكهربائي
- تعتمد تكوين الصورة على أنه يحدث نتيجة لإرتطام الإلكترونات بسطح العينة ومنها تشتت متفاوت للإلكترونات.

- أما في المحهر الضوئي فإن تكوين الصورة يرجع لإمتصاص الإختياري للضوء . أى أن التباين يعود إلى عدد من الفوتونات Photons المختلفة من حيث طولها الموجي Different wavelengths من الشعاع المكون للمنظر .



الميكروسكوب الألكترونى



الميكروسكوب الضوئى المركب

****

-يذكر الطالب أجهزة القياس والفحص للشرائح النباتية ثم يشرح إحداها بالتفصيل كالتالى:-

- يعدد الطالب أجهزة القياس والفحص للشرائح النباتية ثم يتكلم عن إحداها بالتفصيل كما يأتى:

أجهزة خاصة بالقياس Measuring accessories

تستخدم هذه الاجهزة فى معرفة الحجم المضبوط لكل object دقيق الحجم أو حجم الخلايا المختلفة فى النبات أو طول الشعرات .....ألخ وأبسط هذه الأجهزة هى:

١-القرص المقسم micrometer glass disk ٢-الشريحة الميكرومترية stage micrometer
٣-القطعة العينية الميكرومترية

١- القرص المقسم micrometer glass disk

هو قرص زجاجى قطره ١٥مم وسمكه حوالى ١مم ومطبوع عليه تقسيمات صغيرة متقاربة ومتساوية وهو

يوضع فى العدسة العينية وذلك بفك العدسة العليا (للعدسة لعينية) التى من نوع Huyghenian وذلك بعد إخراجها من قمة الأنبوبة ثم توضع مقلوبة على الحاجزالفاصل بينها وبين العدسة السفلى.

٢- الشريحة الميكرومترية stage micrometer

هى شريحة يوجد عليها تدريج طوله٢ مم مقسم إلى أقسام عديدة – طول القسم الكبير منها ١٠٠ ميكرون وطول القسم الصغير ١٠ ميكرون (μ 10) وعندما يراد قياس طول أو عرض (أبعاد) عينة ميكروسكوبية (خلية – نسيج – جراثيم – حبوب لقاح .....ألخ) يحدد بإستخدام الشريحة الميكرومترية والعدسة الشيئية الصغرى ما يساويه التدريج الصغير من قرص العينية ثم تستبعد الشريحة الميكرومترية وتستخدم تدريجات القرص المقسم فى حساب قطر أو عرض الجزء المراد تقديره.

ولتقديرما يساويه تدريج القرص المقسم يحسب كم قسم من القرص المدرج أنطبقت مع كم قسم على الشريحة الميكرومترية فمثلا لو أن خمسة أقسام من العينية أنطبقت مع عشرة أقسام من الشريحة الميكرومترية التى طول كل منها ١٠ ميكرون فيكون القسم داخل العدسة العينية ١٠×١٠/٥=٢٠μ

يكرر ذلك مع أستخدام العدسات الشيئية الأخرى لتحديد ما يساويه القسم بالعينية كالاتى:

١- القسم فى العينية بإستخدام عينية X 10 وشيئية X 10 = μ 20

٢- القسم فى العينية بإستخدام عينية X 10 وشيئية X 40 = μ 5

٣- القسم فى العينية بإستخدام عينية X 10 وشيئية X 100 = μ 2

هذا ويمكن متى قدرنا ما يساويه القسم بالقوة الصغرى أن نحسب ما يساويه القسم فى العينية بإستخدام القوة الأخرى كالأتى:

قوة التكبير× ما يساويه القسم بالعينية / قوة التكبير الجديدة

قوة التكبير = حاصل ضرب قوة تكبير الشيئية المستخدمة × قوة تكبير العينية المستخدمة

فتكون فى الأحوال السابقة هى:

- (١٠×١٠) × ٢٠ / (١٠×٤٠) = μ 5
- (١٠×١٠) × ٢٠ / (١٠×١٠٠) =μ 2

هذا وقد لا يحتاج الأمر إلى وضع disk فى العينية إذ أن بعض العينيات مقسمة داخليا (اى يوجد بها تدريج) ويوجد جاهز خاص بالقياس يسمى القطعة العينية الميكرومترية.

٣–القطعة العينية الميكرومترية

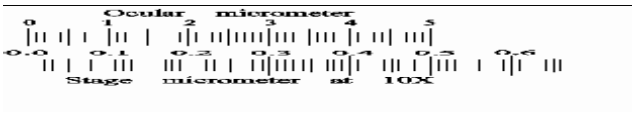
وهى عبارة عن عدستين أحداهما تنزل فى انبوبة الميكروسكوب (بدل العدسة العينية الأصلية) والثانية تعلوها وبينهما جزء متوازى مستطيلات مركب عليه جانبيا مسمار مدرج من(صفر – ١٠٠) وبالنظر خلال العينية (X10) يشاهد التقسيم الداخلى ويشاهد خط يمكن تحريكه بإستخدام المسمار المدرج وطريقة أستخدام هذا الجهاز كالأتى:

١- تحدد الشيئية المستخدمة مع العينية وتقدر قوة التكبير لهما (أى قوة التكبير النهائية) = قوة تكبير العينية × قوة تكبير الشيئية.

٢- يظبط إتجاه التدريج بالعينية مع أتجاه تدريج الشريحة الميكرومترية المدرجة (الموضوعة على مسرح الميكروسكوب) ويثبت هذا الوضع بمسمار ملحق بالقطعة العينية الميكرومترية.

٣- تعمل لفة كاملة بالمسمار المدرج مع ضبط الخط المتحرك على أول تدريج معين (وليكن ٥ مثلا) وينظر خلال العينية عما أذا كان قد تطابق مع خط من تدريج الشريحة الميكرومترية وألا أستوجب الأمر عمل لفة كاملة ثانية وهكذا حتى يحدث الأنطباق بالضبط ثم بحساب عدد اللفات الكاملة التى طابقت تدريج طوله كذا – وبهذه الطريقة يمكن حساب ما تساويه اللفة الكاملة من تدريج الشريحة الميكرومترية – وحيث أن المسمار مدرج من ١ إلى ١٠٠ فيمكن حساب مقدار الوحدة المدونة على المسمار.

٤- فالطريقة إذن تتضح أولا بإستخدام تدريج العينية الذى عرف مقدار الوحدة منه بالميكرون ثم التدريج الصحيح بإستخدام المسماريمثل ٠,١ ثم التدريج الصغير على المسمار يمثل ٠,٠١ وبذلك يظهر حجم الشيء كعدد صحيح وكسر عشرى وكسر مئوى (أى مثلا ١٠,٥٢μ) وهذا الجهاز له أهمية كبيرة فى الأبحاث النباتية.



٢٠ درجة

السؤال الرابع:-أجب عن نقطتان فقط مما يأتى:-(اختيارى)

١)لعملية تقطيع العينات بعد طمرها فى الشمع أهمية كبيرة فى الحصول على القطاعات للصبغ لذا أجب عن النقاط التالية:- أ)أذكر المواد و الأدوات المستخدمة فى عملية التقطيع.....١٠ درجات

الإجابة

ويتم تقطيع كتلة الشمع بواسطة مشرط ذو سلاح حاد ومستقيم حتى يصبح النموذج محاط بطبقة من الشمع. يتم القطع في خط مستقيم عبر كتلة الشمع، وليس عن طريق الضغط حتى لا تنكسر كتلة الشمع.

يزال الشمع الزائد من حول النموذج بواسطة المشرط حتى يصبح النموذج محاط بطبقة من الشمع سمكها لا يقل عن ٢مم أما كتلة الشمع فإنها تزيد قليلا عن ذلك لإمكان تثبيت الكتلة علي حامل كتل الشمع الخاص بالميكروتوم كما يراعي أن تكون كتلة الشمع مناسبة لحجم النموذج حتي يسهل تقطيعها بسكين الميكروتوم.

لاصق الجيلاتين لهوبت Haupt's gelatine

١-جيلاتين نقي	١ جم	٢-جليسرين نقي	١٥ سم
٣- ماء مقطر	١٠٠ سم ٣	٤-فينول	٢ جم

****

ب)أذكر ثلاثة من عيوب التقطيع التى قد تواجهها مع كتابة أسبابها و طرق علاجها.

الإجابة

ثلاثة من عيوب تقطيع العينات باستخدام الميكروتوم الدوار

١-التواء القطاعات وعدم التحامها معا

الاسباب

أ _ درجة انصهار الشمع غيرمتناسبة مع درجة حرارة المعمل.

ب لم يتم تسوية كتلة الشمع قبل تثبيتها علي حامل الميكروتوم.

ج السكين المستخدمة غير حادة تماما وبها تعرجات أو حفر.

كيفية التغلب على هذة المشكلة

أ أن لا يكون شمع البرافين جامد جدًا.

ب أن يكون وضع السكين علي زاوية قائمة مع حامل النموذج.

ج تقليل السمك حيث أن في كثير من الأحيان يوقف التواء القطاعات.

د أن تقوم بمسك حافة القطاع بواسطة فرشاة طرفها منبسط وثم تثني هذه الحافة إلي أسفل في اتجاه السكين ثم توضع القطاع علي شريحة زجاجية بحيث يكون جزئه الطرفي إلي أسفل ويتم التسخين بلطف فينفرد القطاع.

2-انشطار الشريط

الاسباب

أ-وجود عيب في حافة السكين.

ب -الشمع غير منصهر بشكل جيد.

ج-وجود مواد صلبة مختلطة مع الشمع(رمل.)

كيفية التغلب على هذة المشكلة

أ -يتم تغيير حافة السكين.

ب-يتم اعاد عملية الطمر.

ج-تستخدم ابرة تشريح ساخنة لابعاد الرمال الموجودة أو يعاد الطمر في شمع جديد.

٣ -عدم تكون شريط من الشمع

حيث يلاحظ ان الشمع يتفتت و لا تلتصق القطاعات و لا يتكون الشريط ولكن تكون عبارة عن مقاطع مفردة وتكون القطاعات ملتفة على هيئة اسطوانة.

الأسباب

أ-وجود آثار من مادة الترويق.

ب-الشمع المستخدم غير نقى او طرى او غير صلب بالدرجة الكافية.

ج- الشمع صلب جدا.
د-زاوية وضع السكين بالنسبة للعينة غير مناسب.
كيفية التغلب على هذة المشكلة
أ-اعادة عملية الترقيد والتخلص مناثار مادة الترويق.
ب-اختيار نوعية شمع مناسبة.
ج- تحريك السكين ببطء تجاة العينة اى تقليل السرعة.
د-ضبط زاوية وضع السكين (٤٥ درجة مئوية)

****

٢)أشرح طريقة تحضير شريحة للفحص المجهرى لدراسة أطوار الإنقسام الميتوزى فى جذور البصل؟.....١٠درجات

الإجابة

تستخدم القمم النامية لجذور نبات البصل Alium Cepa أو الفول المصري Vicia faba لدراسة الانقسام الفتيلي (الميتوزى) في الخلايا النباتية و ذلك لأن الانقسام يكون نشطاً في القمم النامية للجذور .
الاحتياجات : محلول كارنوى – صبغة الاستيو كارمن أو الاستيواورسين – حامض خليك ثلجى – بصل نابت – كحول ايثيلى – حمض الهيدروكلوريك – كلوروفورم- شفرة حلاقة صدئة – شرائح مجهرية – أغطية للشرائح – مجهر ضوئي .
طريقة تحضير شرائح مجهرية للانقسام الفتيلي (الميتوزى) :
١-يتطلب التمرين التحضير المسبق لعينات الجذور الأولية لنبات البصل و/أو نبات الفول المصري و ذلك بستنبات النبات بوضعه في الماء لمدة تتراوح بين ٣ الى ٥ أيام عند درجة حرارة الغرفة حيث تصل أطوال الجذور النامية الى ٢,٥-٥,٠ سم
تستخدم الجذور النامية الصغيرة من البصل أو الفول ولا تستخدم الجذور الأولية لقلة الانقسامات الميتوزية بها .
٢-تضاف ٠,٠٥% من مادة الكولشيسين (Cholchicine) الى التحضير و تترك لمدة ٢٠-٣٠ ساعة بغرض ايقاف عمل خيوط المغزل و تثبيت الانقسام عند الطور الاستوائي(metaphase) . لاحظ أن مادة الكولشيسين مادة مسرطنة(carcinogen) و يجب التعامل معها بحرص شديد.
٣-تعد قطع بطول حوالي ١ سم من أطراف القمم النامية للجذور إما للاستخدام الفوري أو للاستخدام في أوقات لاحقة حيث تجمع القمم النامية للجذور وتحفظ في محلول كارنوى (carnoy's) لمدة ٢٤ ساعة في درجة حرارة الغرفة ثم تنقل الجذور إلى ٧٠% كحول ايثيلي ethyl alcohol وتحفظ في ثلاجة لحين الاستعمال. يمكن حفظ هذه العينات بحالة جيدة لمدة تتراوح بين ٢-٣ سنوات.
٤-تلين الجذور النامية بتقطيعها إلى أجزاء صغيرة (٣-٤ مم) ووضعها في قليل من حمض الهايدروكلوريك HCI لمدة ٣-٥ دقائق . تنفصل الخلايا وتنبسط بفعل الحمض ويمكن اختبار طراوة الجذور بالضغط عليها بدبوس أو إبرة تشريح .
٥- توضع نقطة من صبغة الاستيوكارمين Aceto-carmein على شريحة مجهرية نظيفة وتنقل قطعة الجذر الطرية إلى الصبغة بواسطة ابرة أو ملقط .
٦-تقطع قطعة الجذر إلى قطع صغيرة بواسطة دبوس أو شفرة حلاقة صدئة إذ يتفاعل الحديد مع الصبغة ليعطى تحضيراً أفضل للخلايا .
٧-تغطى الشريحة بغطاء نظيف ثم تسخن بلطف على لهب كحولي (يحذر من الغليان) .
٨-توضع الشريحة ما بين ورقتي ترشيح أو ورق نشاف ويضغط بالإبهام خفيفاً على غطاء الشريحة لفصل الخلايا وفردها وهذا ما يعرف بالهرس squash.
٩-تفحص الشريحة تحت المجهر لمعاينة أجزاء الخلية وأطوار الانقسام . يلاحظ أن مكونات الخلايا لا تظهر جميعها في شريحة واحدة إذ أن رؤية هذه المكونات تستلزم أصباغ وطرق تحضير معينة .

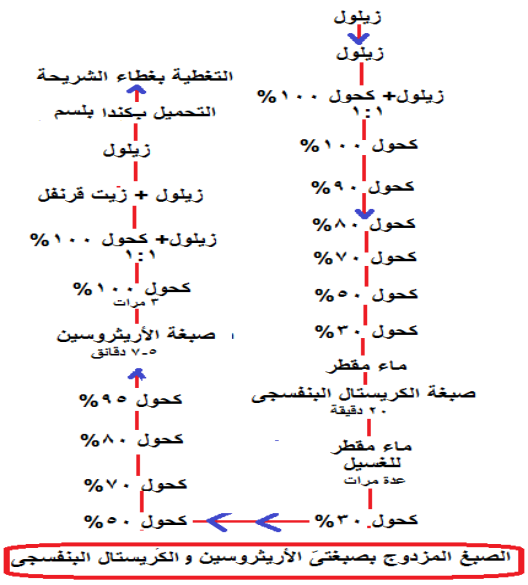
****

٣)لديك عينة نباتية تحتوى على أنواع مختلفة من الأنسجة و أردت أن أصبغها لتمييز الأنسجة المغلظة بالسليلوز عن المغلظة باللجنين و المغلظة بالسوبرين - أذكر نوع الصبغ المستخدم و تتابع أحواض الصبغ وما الألوان المتوقعة لهذه الأنسجة بعد الصبغ؟.....١٠درجات

الإجابة

طريقة الصبغ هى الصبغ المزدوج باستخدام صبغتى الصفرانين و الأخضر السريع أو صبغتى الأريثروسين و الكريستال البنفسجى

ثم يذكر الطالب تتابع الاحواض فى مرحلة الصبغ كما يلى:-



أو

الالوان المتوقعة عند استخدام صبغتى الصفرانين و الأخضر السريع /

الخلايا المغلظة بالسليلوز ـــــــــ تتلون باللون الأخضر(لون صبغة الأخضر السريع).

الخلايا المغلظة باللجنين ـــــــــ تتلون باللون الأحمر(لون صبغة الصفرانين).

الخلايا المغلظة بالسوبرين ـــــــــ تتلون باللون البنى.

الالوان المتوقعة عند استخدام صبغتى الأريثروسين و الكريستال البنفسجى /

الخلايا المغلظة بالسليلوز ـــــــ تتلون باللون الأحمر (لون صبغة الأريثروسين).

الخلايا المغلظة باللجنين ـــــ تتلون باللون البنفسجى (لون صبغة الكريستال البنفسجى).

الخلايا المغلظة بالسوبرين ـــــــــ تتلون باللون البنى.

مع أطيب التمنيات بالنجاح و التوفيق،،،،،،،،

****

****

****

****

*****

***

مع تمنياتنا لكم بالنجاح و التوفيق،،،،،،،،

أ.د/فاتن حسن محمود إسماعيل & د/محمد محمد محمود عبد العال