١٠ . دراسات تشريحية خاصة
Special anatomical Studies

يتناول الجزء التالى عـرضاً لبعض الطرق المتبعة فى دراسات معيـنة تختص بموضوعات محددة مثل :

أولاً : تفكيك نسيج الخشب Maceration of wood

تفكيك الأنسجـة طريقة كيميائية لفصـل الوحدات التى تتكون منها الأنسـجة النباتية ، وذلك بإذابة المادة الـلاحمة بين الخلايا ، والهدف مـن تفكيك أى نسيج هـو تكوين صورة دقيقة ثلاثية الأبعاد لطرز الخلايا المكونة للنسيج . ويتم ذلك بالطريقة التالية :

(١) تقطع العينة الخشـبية باستعمال شفرة حادة إلى أجزاء صغيرة علـى هيئة شظايا لا يزيد حجمها عن تلك المستخدمة فى تنظيف الأسنان Toothpick .

(٢) توضع شـظايا الخشـب فى وعاء زجاجى لـه غطاء زجاجـى به محلول إميـج لتفـكيك الأنسجة Emig's macerating fluid ويتركب من :

١٠ جم	ثلاثى أكسيد الكروميوم	Chromium trioxide (CrO_3)
٩٠ مل	ماء مقطر	Distilled water
١٠ مل	حامض نيتريك	Nitric acid (HNO_3)

(٣) يوضع الوعاء المحتوى على العـينة والمحلول داخل فرن درجة حرارته ٥٠° م حتى تأخذ العينة شكلاً مفككاً Fuzzy ويتطلب ذلك نحو ساعتين .

(٤) يسـكب الحامض بعيداً عـن العينة وتغسل الألياف جيداً بماء الصنبـور ، ثم تخلط العينة بكمية من الماء ويغـلق الوعاء بإحكام ، يرج الوعاء جيداً لفصـل الخلايا عن بعضها ، إذا لم تنفصل الخلايا بسهولة يخلط مع العينة كريات من الزجاج للمساعدة على تفكيك الخلايا .

(٥) تغسل الألياف بعناية عدة مرات لفترة نحو ٢٤ ساعة بماء الصنبور ، مع الإحتراس من فقد الخلايا الصغيرة بعد تفكيكها . قد يعرض البعض المحلول لعملية الطرد المركزى حتى يسهل الحفاظ على الخلايا المفككة .

الصبغ Staining

(١) تدرج بالمحلول من الماء حتى يصل إلى كحول إيثايل ٥٠ ٪ خلال عملية Dehydration لفترة ٥ دقائق بكل تركيز .

(٢) تجهز صبغة سفرانين كما يلى :

سفرانين ١ جم
كحول إيثايل ٩٥ ٪ ١٠٠ مل

تخفف عند الاستعمال بماء مقطر بنسبة ١ : ١ .

(٣) تترك العينة فى صبغة السفرانين لمدة ساعة .

(٤) تشطف العينة سريعاً فى كحول إيثايل ٧٠ ٪ .

(٥) تمرر العينة فى كحول إيثايل ١٠٠ ٪ (مطلق) لمدة دقيقة ، مرتين .

(٦) تمرر العينة فى كحول مطلق + زيلول (بنسبة ١ : ١) لمدة ٢ دقيقة .

(٧) تمرر العينة فى زيلول نقى I لمدة ٥ دقائق .

(٨) تمرر العينة فى زيلول نقى II لمدة ٥ دقائق .

(٩) توضع نقطة من كندا بلسم على شريحة - تؤخذ حزمة صغيرة من الألياف بواسطة الملقط وتوضع فوق الكندا بلسم مع توزيعها حتى لا تبدو تحت المجهر متزاحمة ، تغطى بغطاء شريحة برفق ، وتجفف الشريحة .

ثانياً : دهك الأنسجة (طريقة الأسيتوكارمين) Smearing

تدهك الأنسجة فى حالة استعمال الأسيتوكارمين فى الصبغ وهى طريقة شائعة الاستعمال ، ويتبع فى صبغ الأنسجة عدة صبغات ولكن أكثرها شيوعاً هى طريقة

obeikandl.com

الأسيتوكارمين وهى طريقة سريعة ؛ إذ يتم فيها القتل والتثبيت وصبغ الأنسجة المعاملة دفعة واحدة . وتستعمل التحضيرات الحديثة لعد الكروموسومات وارتباط بعضها ببعض ودراسة تركيبها التفصيلى ، ويمكن تحويل الشرائح من الحالة المؤقتة إلى المستديمة لإمكان الرجوع إليها وقت الحاجة .

تحضير الصبغة

كارمين	١ جم
حامض خليك ٤٥ ٪	١٠٠ مل
خلات الحديد (محلول مائى مشبع)	٢ نقطة

يذاب الكارمين فى حامض الخليك المغلى على حمام مائى ثم يبرد المحلول ويروق . يضاف محلول خلات الحديد ويترك حوالى ١٢ ساعة ثم يرشح ويحفظ الناتج فى ثلاجة ، تحفظ كمية صغيرة فى زجاجة بقطارة فى المعمل للاستعمال اليومى . بعض المشتغلين يستغنون عن إضافة خلات الحديد بالتفاعل الذى يحدث بين إبرة التشريح وحامض الخليك الموجود فى الصبغة ، ولكن ذلك يحتاج إلى مران لضبط العملية لأن زيادة الحديد يعيق تمييز الكروموسومات بوضوح وقد يعطى رواسب سوداء على شكل حبيبات لذا يفضل إضافة خلات الحديد . وفى هذه الحالة تستعمل إبرة مطلاة بالنيكل أو الكروم أو إبرة زجاجية ذات سن مدبب مناسب رفيع .

وتجرى عملية الدهك إما فى المتك أو فى قمم الجذور . وفى حالة المتك تدهك المتك الغضة فى نقطة أو اثنتين من الصبغة ، وتدهك المتك الصغيرة كلها أما الكبيرة فتجزأ إلى قطع تدهك كل منها منفردة . تزال بعد ذلك الجدر والأنسجة غير المرغوبة ، وتجرى هذه العملية تحت البينوكلر ، عند ذلك يمكن تغطية النسيج المتبقى على الشريحة بغطاء الشريحة ويضغط عليه أو ينقر عليه برفق وذلك للحصول على طبقة رقيقة ، تمرر الشريحة بسرعة عدة مرات على لهب كحولى ويحترس من الغليان . يزال الزائد من الصبغة إن وجد ثم تغلق حافة القطاع بشمع البارافين أو شمع البارافين بالمستكة بنسبة ١ : ١ ، تختبر الشريحة بالمجهر ثم تحفظ الشرائح مفردة فى ثلاجة فيتحسن اللون بعد عدة أيام ويصل إلى كثافته القصوى ثم يأخذ فى التدهور تدريجياً بعد ذلك . ليس من الميسور الحصول على المتك

اللازمة فى أى وقت لذا يجب جمعها أثناء الموسم وقتلها فى محلول قتل مناسب ، ثم تحفظ فى ثلاجة على درجة الصفر لعدة أشهر تبعاً لحالة كل نبات . البعض يفضل نقل المتك إلى كحول ٧٠ ٪ بعد يوم أو يومين من القتل حتى يمكن حفظها لمدة طويلة فى الثلاجة .

في حالة قمم الجذور يجب التركيز على الطور الاستوائى ، وتستجيب بعض قمم الجذور لهذه العملية رغم كبرها وبذلك يمكن تحضير شرائح جيدة كما فى حالة البصل مثلاً بينما يقاوم البعض الآخر عملية الدهك رغم صغره كما فى الحندقوق . تقتل القمم النامية للجذور فى محلول قتل مناسب ويحسن أخذ الجزء المرستيمى مع جزء من منطقة الاستطالة، وعند الدهك يفصل الجزء المرستيمى لإجراء العملية فقط . تترك النماذج فى محلول القتل لمدة يوم على الأقل ثم تنقل من عملية القتل إلى الدهك مباشرة أو إلى كحول ٧٠ ٪ إن تطلب الأمر الحفظ لمدة طويلة . بعد إجراء الدهك واستبعاد الأنسجة غير المرغوب فيها والتغطية بالغطاء تسخن على لهب ضعيف ويضغط على الغطاء حتى يتم إنفصال الخلايا عن بعضها البعض وتصبح مسطحة تماماً . تميل أحياناً الكروموسومات إلى التجمع نتيجة عملية دهك قمم الجذور ، ويتنافى هذا مع الغرض من العملية ، ولكن يمكن التغلب على هذه الظاهرة بغمس القمم النامية للجذور فى محلول مائى مشبع من Baradichlorobenzene لمدة ١-٤ ساعات ثم تقتل فى أى من محاليل القتل . ولقد وُجد أن محلول ١ - ٣ ٪ من كحول الميثايل يؤدى إلى نفس الغرض بدلاً من باراداى كلوروبنزين ويعطى مجموعات من الكروموسومات متباعدة نوعاً ، كما يمكن تسهيل تفكك الخلايا عن بعضها البعض بتحليل الصفيحة الوسطى تحليلاً مائياً باستعمال ٥ - ١٠ ٪ من حامض الأيدروكلوريك (يخفف الحامض إما بالماء أو فى ٧٠ ٪ كحول) . بعد المعاملة بالحامض ٥-٣٠ دقيقة تعاد الجذور إلى المثبت ويغير مرة على الأقل (اقترح البعض استعمال الإنزيمات لإجراء هذه العملية) .

يمكن تحويل الشرائح المؤقتة فى عملية الدهك إلى مستديمة وذلك بتجفيفها من الماء ثم التحميل فى كندا بلسم أو أحد البيئات الأخرى . ويمكن استعمال طريقة سيرس Sers لسهولتها **وتتلخص فى الآتى :**

اغمس الشريحة مقلوبة وأسند أحد طرفيها إلى قضيب زجاجى فى طبق بترى ، يحتوى على حامض خليك وكحول بنسبة ٥٠ ٪ لكل منهما ، وبذلك ينفصل غطاء الشريحة من تلقاء نفسه . أمرر الشريحة والغطاء فى المحاليل الآتية مع تركها ٢-٥ دقائق فى كل منها :

(١) كحول إيثايل + كحول ثلاثى البيوتايل .T.B.A بنسبة ١ : ١ .

(٢) .T.B.A نقى ، ثلاث تغييرات متتالية .

(٣) توضع الشريحة بحيث تكون الأنسجة لأعلى على ورقة الترشيح ، ثم توضع نقطة من البلسم بحيث يميل إلى السيولة أو أى بيئة تحميل أخرى على الأنسجة ، ثم أنزل الغطاء بعناية مع وضع ثقل مناسب عليه .

ثالثاً: الدراسة التشريحية للعقدة وعنق الورقة بواسطة القطاعات اليدوية

Free hand method for petiolar and nodal study

عند الرغبة فى عمل دراسة تشريحية مقارنة لمنطقة العقدة وقاعدة عنق الورقة ، ينصح بإتباع الطريقة التالية للحصول على قطاعات يدوية :

(١) تتطلب العينات المجففة المعاملة بالغليان حتى يتم تطريتها Hydrate ، أما العينات المحفوظة فى محاليل فليست فى حاجة لهذه الخطوة .

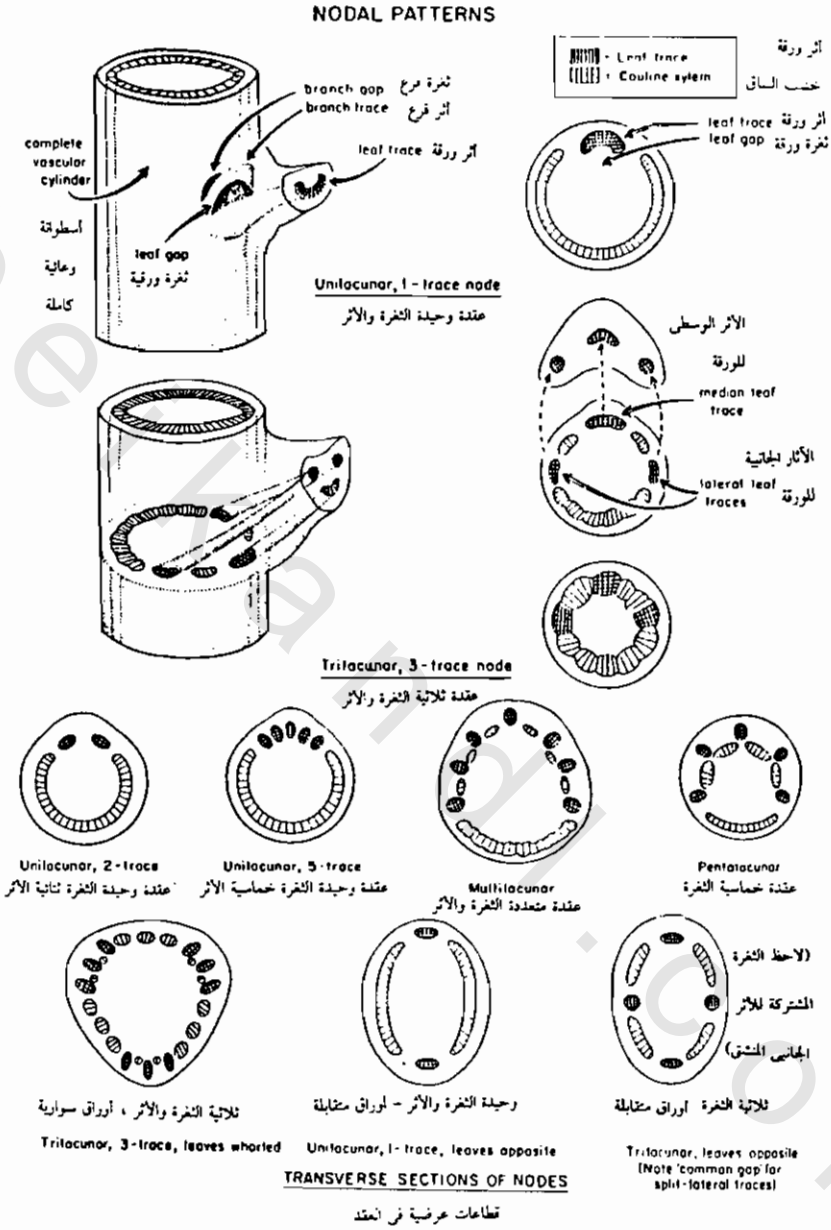
(٢) يجرى عمل قطاعات يدوية للمنطقة المطلوب فحصها باستعمال شفرة حادة ، مع الاستعانة بنخاع البيلسان أو جذر الجزر .

(٣) تستقبل القطاعات فى زجاجة ساعة بها محلول مائى مشبع من الفلورجلوسينول Phloroglucinol ، ويكفى لذلك بضعة دقائق ، حيث يستخدم هذا المحلول لإظهار الأنسجة الملجنتة خاصة فى الدراسات التشريحية المقارنة ، كما فى حالة دراسة مسار الحزم الوعائية Vascularization فى عنق الورقة وتحديد طرز العقدة بالساق .

(٤) توضع القطاعات مباشرة على شريحة ، مع إضافة حامض الأيدروكلوريك Hydrochloric acid وغطاء شريحة ، تزال الزيادة من الحامض خارج غطاء الشريحة .

(٥) تفحص الشريحة تحت المجهر ، مع الحرص التام من ملامسة الحامض للمجهر .

(٦) تظهر الأنسجة فى الحال باللون الأحمر الأرجوانى Purple-red ، يجرى عمل رسم تخطيطى Sketch يوضح طراز الجهاز الوعائى ، يحلل الحامض الأنسجة سريعاً ، وتأخذ القطاعات لوناً باهتاً (شكل ١٠-١) .



شكل (١٠-١) : أنماط العقد (رادفورد Radford وآخرون ١٩٧٤).

رابعاً: الطرق المتبعة لدراسة تشريح الورقة والزهرة

Techniques employed in the study of leaf and flower anatomy

(أ) إزالة اللون Clearing

بالإضافة إلى الطرق المعتادة للتقطيع بالميكروتوم عند دراسة تشريح الأوراق والأزهار ، قد تستعمل طريقة إزالة اللون Clearing التى تفيد كثيراً فى دراسة مسار الأوعية Vasculation ، ويمكن إجراء هذه الطريقة مع العينات الغضة أو المحفوظة أو المجففة (المعشبية) ، وتجرى هذه العملية كما يلى :

(١) تؤخذ أجزاء نباتية صغيرة وتوضع فى طبق بترى (قد يتطلب الأمر كما فى حالة الأوراق تقطيع العينة إلى أجزاء مناسبة الحجم) ، لا تحتاج العينات المجففة أو المحفوظة فى محاليل أى معاملات خاصة قبل البدء فى العمل ، ومع ذلك تغلى العينات الغضة فى كحول أو توضع فى محلول كارنوى لفترة للتخلص من الكلوروفيل قبيل عملية إزالة اللون .

(٢) تغمس العينة النباتية فى محلول ٥ ٪ أيدروكسيدصوديوم (أو أيدروكسيدبوتاسيوم) وتوضع فى فرن على درجة حرارة ٣٧° م لمدة يوم إلى عدة أيام تبعاً لطبيعة الأنسجة .

(٣) عندما تصبح العينة شفافة (أو تقريباً كذلك) تغسل بقليل من الماء .

قد تحتوى بعض العينات النباتية على أصباغ داكنة مختلفة يفضل إزالتها فى هذه المرحلة بغمسها فى محلول التبييض Stockwell's Bleach .

ويتركب هذا المحلول من :

٩٠ مل	ماء مقطر Distilled water
١ جم	بيكرومات البوتاسيوم Potassium bichromate
١٠ مل	حامض خليك ثلجى Glacial acetic acid
١ جم	حامض الكروميك Chromic acid

تترك العينة داخل هذا المحلول لفترة ساعة إلى عدة ساعات على درجة حرارة الغرفة حتى تمام زوال جميع الصبغات ، بعد ذلك يسكب محلول التبييض وتغسل العينة جيداً .

(٤) قد يرى البعض عند هذه المرحلة استعمال محلول Chloral hydrate مركز لاستكمال عملية إزالة اللون إن لم تصبح العينة شفافة تماماً ، وفى كثير من الحالات لا تكون هذه العملية ضرورية .

(٥) يبدأ بعد ذلك تجفيف العينة باستعمال كحول إيثايل ٣٠ ٪ ثم ٥٠ ٪ لمدة ٥ دقائق لكل منهما .

(٦) تجرى عملية الصبغ باستعمال السفرانين ١ ٪ فى كحول إيثايل ٥٠ ٪ ، ويكفى لذلك دقائق معدودات مع الرج برفق .

(٧) تستكمل عملية التجفيف فى كحول إيثايل ٧٠ ٪ و ٩٥ ٪ ، وهذه المحاليل قد تزيل الصبغة لذلك يراعى الحرص بعدم ترك العينات بها لفترة طويلة ، وفى نفس الوقت يراعى تمام عملية التجفيف .

(٨) تمرر العينة على كحول مطلق لعدة دقائق ، لا تحدث إزالة كبيرة للصبغة مع التركيزات العالية من الكحول .

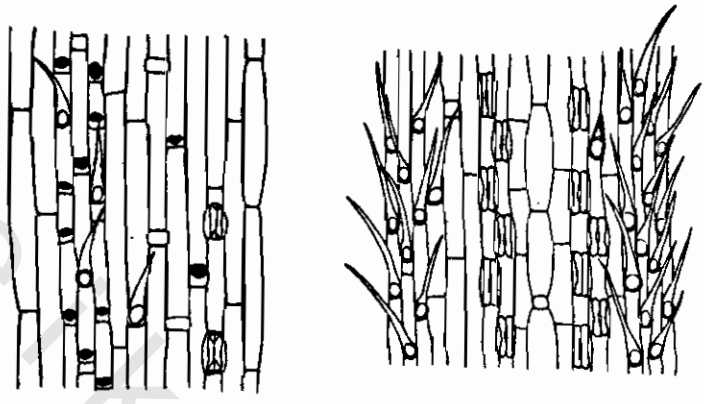
(٩) يستعمل بعد ذلك محلول من كحول مطلق وزيلول بنسبة ١ : ١ لعدة دقائق.

(١٠) يستعمل بعد ذلك زيلول نقى ، يدل تعكر الزيلول على عدم تمام التجفيف ، وفى هذه الحالة تعاد العينة إلى الكحول المطلق .

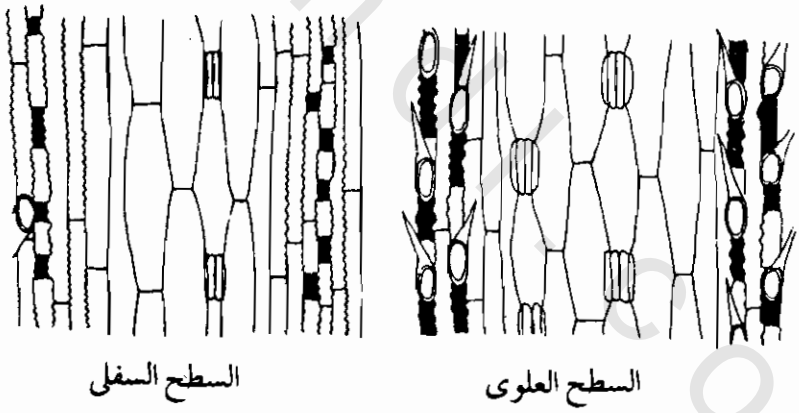
(١١) تجرى عملية التحميل فى الكندا بلسم - أحياناً يفضل الاحتفاظ بالأجزاء الزهرية فى أنبوبة لدراسة مسار الحزم الوعائية من جميع الأوجه .

(ب) سلخ البشرة Epidermal peels

يمكن عمل سلخ فى ورقة غضة أو محفوظة باستعمال شفرة حادة ، وذلك بفصل الطبقة السطحية القريبة adaxial أو البعيدة abaxial ثم تحميلها فى ماء على الشريحة وفحصها تحت المجهر ، ولما كان هذا التحضير من النوع المؤقت فمن الأفضل عمل رسم تخطيطى للبشرة باستخدام كاميرا لوسيدا Camera lucida كما فى شكل (١٠-٢) .



Vulpia alopecuros



Vulpiella tenuis

100 μm

شكل (١٠-٢) : البشرة لبعض النجيليات ، تظهر خلايا السيليكا باللون الأسود (ستاس Stace ١٩٨٤) .

خامساً: بعض الطرق المستعملة لتجهيز العينات التشريحية لأمراض النبات

(١) الفطريات البيضية Oomycetes

مثل جنس *Albugo* (شكل ١٠-٣) ، تنتخب بثرات حديثة غير متفجرة ، وتقتل وتثبت باستعمال محلول كراف Craf ويفضل الصبغ بواسطة Iron-Hemalum لإظهار نواة الفطر كما يمكن استعمال الهيماتوكسلين - سفرانين أو سفرانين - أخضر سريع .

فى حالة الجراثيم الجنسية Oospore تقتل وتثبت العينات بواسطة محلول .F.A.A ، وتتبع طرق الصبغ العامة .

تتبع الطرق السابقة الذكر أيضاً مع أمراض البياض الزغبى المسببة عن الجنس *Peronospora* والندوة المتأخرة فى الطماطم والبطاطس المسببة عن الجنس *Phytophthora* (شكل ١٠ - ٣) .

قد تتبع الطريقة التالية لصبغ القطاعات باللاكتوفينول الأخضر لإظهار الصبغات فى الأنسجة المصابة :

(١) توضع العينة فى لاكتوفينول مخفف (جزء لاكتوفينول + ٢ جزء ماء مقطر) لمدة ١٠ دقائق .

(٢) يستبدل اللاكتوفينول المخفف بمحلول لاكتوفينول أخضر قوى (١ر٠ ٪) . يترك لليوم التالى معرضاً للهواء .

(٣) تغسل العينة فى لاكتوفينول رائق لإزالة الصبغة الزائدة ، حتى يصير لون الصبغات واضحاً ومحدداً .

(٤) تحمل العينة فى لاكتوفينول ، أو صمغ اللاكتوفينول وتركيبه كالتالى:

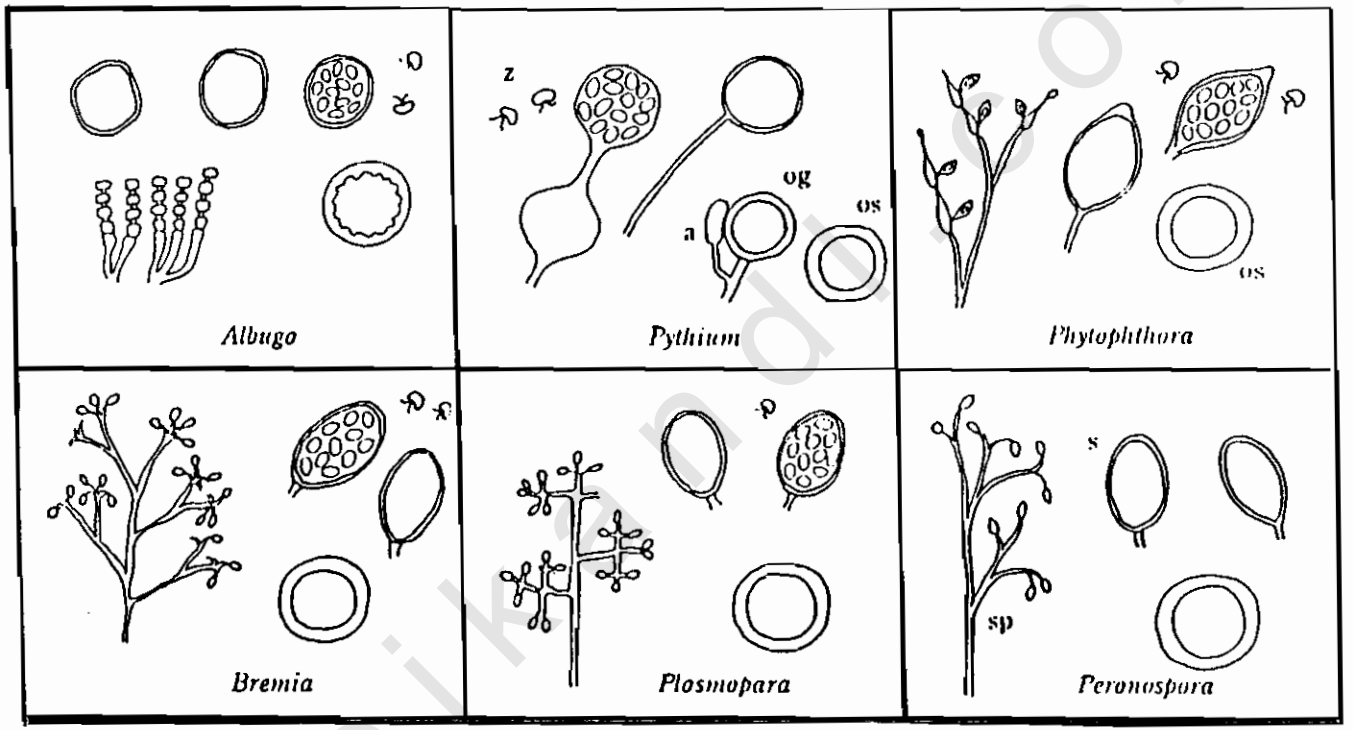
يذاب ٣٨ جم من الصمغ العربى النقى فى ٥٠ مل ماء مقطر

يضاف ٥ جم جلوكوز و ٦ جم لاكتوفينول

يرشح المحلول فى موسلين

يستعمل هذا الصمغ بارداً ويجف سريعاً .

ويقترح البعض صبغ البياض الزغبى بواسطة اللاكتوفينول - النيجروسين ؛ حيث تظهر الأنسجة المصابة بجلاء فضلاً عن أنه يظهر النوايات واضحة .



شكل (١٠-٣) : أمثلة لبعض أجناس الفطريات البيضية Oomycetes .

يضاف ١ - ٥ مل من محلول مائي للنيجروسين إلى ١٠٠ مل لاكتوفينول . يمكن استعمال غروى الجلسرين للتحميل بدلاً من اللاكتوفينول .

برشمة التحضير :

عند استعمال بيئة تحميل معرضة للجفاف مثل اللاكتوفينول أو غروى الجلسرين يلزم برشمة التحضير بوضع مادة صمغية مثل الكندا بلسم أو الأسفلتم أو غيرهما حول حافة الغطاء لمنع تبخر البيئة وجفافها وبالتالى يمكن حفظ التحضير فى حالة جيدة لفترة زمنية طويلة .

من الصعوبات التى قد تواجه برشمة التحضير تسريب المادة الصمغية أسفل الغطاء مما يؤدى إلى تلف التحضير خاصة إذا كانت البيئة سائلة مثل اللاكتوفينول أو غروى الجلسرين، وللتغلب على ذلك يراعى قبل إجراء عملية البرشمة إزالة الزائد من بيئة التحميل ووضع الشريحة فى مجفف لعدة أيام حتى يزداد سمك قوام البيئة ثم تطوق حافات الغطاء بطبقة رقيقة جداً من غروى الجلسرين الساخن بفرشة وتترك لتتماسك تماماً ثم تجرى عملية البرشمة بعد ذلك ، يعيق غروى الجلسرين نتيجة تماسكه تسرب المادة الصمغية أسفل الغطاء، وإذا فرض وتسرب شيء من الغروى فإنه يختلط باللاكتوفينول أو غروى الجلسرين اختلاطًا تاماً فلا يكون له أثر يذكر .

(أ) طريقة التطويق :

يستعمل فى ذلك الآلة الدوارة وفرشاة صغيرة ومحلول من المادة المستعملة متوسطة القوام، وتتبع الخطوات التالية :

(١) يزال الزائد من بيئة التحميل ، وينظف حول الغطاء جيداً ، تستعمل أغطية شرائح مستديرة .

(٢) تلمس حافة الغطاء فى ثلاث أو أربع نقاط متفرقة ليتماسك الغطاء ولا يتحرك أثناء التطويق .

(٣) تثبت الشريحة على المائدة الدوارة وتنظم ليكون الغطاء فى وضع متوسط مناسب فوق الدائرة التى تتمشى مع محيطه .

(٤) تغمس الفرشاة فى المحلول ، ويؤخذ بها كمية مناسبة حتى لا تسيل على الشريحة أثناء التطويق وتفسد العملية ، يرتكز باليد على اللوحة الثابتة وتدار المائدة بسرعة وأثناء

الدوران يراعى أن يلمس طرف الفرشاة حافة الغطاء من خارجه قليلاً ثم تحريكها برفق إلى الداخل حتى تغطى حافة الغطاء لمسافة ١ مم تقريباً إلى الداخل وبذلك تتكون حلقة رقيقة منتظمة حول حافة الغطاء ، تترك لتجف وتعاد الكرّة مرة أو اثنتين حتى يتم وضع كمية كافية حول الحافة ولا توضع طبقة إلا بعد تمام جفاف الطبقة السابقة لها تماماً .

ويفضل عمل الطوق من طبقتين رقيقتين أو ثلاث بدلاً من طبقة واحدة سميكة حتى لاتكون عرضة للتشقق فيجف التحضير ويتلف ، وإذا كان الغطاء مربعاً أو مستطيلاً فيمكن عمل التطويق باليد لكنه يكون غير منتظم فى سمكه وشكله .

ويمكن استعمال الخليط التالى فى برشمة الأغطية :

فازلين ٥٠ ٪ + شمع البارافين ٥٠ ٪ (درجة انصهاره ٥٨-٦٠° م) .

وتستعمل هذه الطريقة إذا كان الهدف المحافظة على التحضيرات لفترة ليست طويلة ، ويمكن زيادة الفترة بطلائها بعد ذلك بطبقة من الكندا بلسم زيادة فى الصيانة .

من مميزات هذا الخليط أنه لا يتسرب تحت الأغطية ويتماسك بسرعة عندما يبرد ولايجف للدرجة التى تعرضه للتشقق وفوق ذلك يمكن تنظيف الشرائح والأغطية بسهولة عند الاستغناء عن التحضيرات بوضعها فى ماء ساخن فينصهر الخليط ويطفو على السطح وبذلك يمكن إزالته وتنظيف الشرائح والأغطية بعد ذلك بإحدى الطرق المعروفة .

(ب) طريقة ديهل Diehl

تستعمل هذه الطريقة فى حالة التحضيرات المطلوب حفظها لسنين عديدة، وهى كالتالى:

(١) توضع نقطة من بيئة التحميل اللاكتوفينول أو غروى الجلسرين فى وسط غطاء كبير (قطره ٢٢ مم) .

(٢) توضع العينة فى البيئة وتنظم بإبرتين نظيفتين ، ثم تغطى بغطاء أصغر (قطره ١٢-١٤ مم) ، يوضع الغطاء الصغير فى موضع متوسط من الغطاء الكبير .

(٣) يزال الزائد من البيئة بورقة ترشيح ، ثم توضع كمية مناسبة من الكندا بلسم فى وسط الغطاء الصغير .

(٤) توضع الشريحة برفق على التحضير حتى تغطى الكندا بلسم العينة والغطاء الصغير وتنتشر فتملأ الجزء الخالى من الغطاء الكبير ، يستحسن أن تكون الكندا بلسم سميكة القوام نوعاً حتى لا تميل للتسرب تحت الغطاء الصغير والاختلاط بالبيئة ، تسخن الشريحة قليلاً حتى يساعد ذلك على انتشار الكندا بلسم .

(٥) تقلب الشريحة بعد ذلك ، فيكون التحضير فى وضعه النهائى ، وتوجد العينة ما بين الغطائين ، محفوظاً من الجفاف مبرشماً بطبقة الكندا بلسم التى انتشرت وملأت الفراغ حول الغطاء الصغير إلى حافة الغطاء الكبير .

رغم الاحتياطات قد تميل الكندا بلسم إلى التسرب تحت الغطاء ، يمكن تجنب ذلك بطلاء حافة الغطاء الصغير بطبقة رقيقة من غروى الجلسرين ثم إضافة الكندا بلسم بعد تماسك غروى الجلسرين .

الصبغ المستديم :

يمكن استعمال طريقة الصبغ المزدوج ، ولا تختلف خطوات الصبغ بهذه الطرق المختلفة عما هو متبع فى التكنيك النباتى العام ، كما توجد طرق خاصة لصبغ الأنسجة المصابة وإظهار الميسليوم فى أنسجة العائل مثل :

(أ) بيانيز III ب :

تحضر هذه الصبغة كما يلى :

أخضر الملاكيت	٠ر٥٠ جم
فوكسين حمضى	٠ر١٠ جم
أصفر مارشياس	٠ر٠١ جم
ماء مقطر	١٥٠ مل
كحول ٩٥ ٪	٥٠ مل

خطوات الصبغ :

(١) تغسل القطاعات بعد القتل والتثبيت فى ماء أو كحول ٥٠ ٪ .

(٢) تصبغ القطاعات فى بيانيز III ب لمدة ١٥-٤٥ دقيقة .

(٣) تغسل القطاعات فى ماء أو كحول ٥٠ ٪ ثم تدرج حتى كحول ٩٥ ٪ حامضى (كحول إيثايل ٩٥ ٪ مضافاً إليه بضع نقط من حامض الأيدروكلوريك) .

(٤) تروق القطاعات فى تربنتين فينولى (٢ جزء فينول بللورات منصهرة+ ٣ أجزاء تربنتينا).

(٥) تغسل القطاعات فى زيلول وتحمل فى الكندا بلسم .

تصبغ أنسجة العائل باللون الأخضر وميسليوم الطفيل باللون القرنفلى الغامق .

(ب) أحمر المجدالا - الأخضر الضوئى Megdala red-Light green

(١) بعد القتل والتثبيت تغسل القطاعات فى الماء .

(٢) تصبغ القطاعات فى محلول حديث من أحمر المجدالا ٢٥ر٠ ٪ فى ماء الصنبور لمدة دقيقة إلى ٢٤ ساعة ، تتوقف مدة الصبغ على قابلية ميسليوم الطفيل لتشرب الصبغة ، ويمكن تقليل المدة بزيادة قوة الصبغة .

(٣) تزال الزيادة من الصبغة بتعريض القطاعات لمدة ٥ دقائق لماء الصنبور .

(٤) تجفف القطاعات حتى الكحول المطلق لمدة ٣٠ ثانية .

(٥) تنقل القطاعات إلى الأخضر الضوئى قوة ٣ر ٪ فى زيت القرنفل وتفحص تحت المجهر للتأكد من تمام الصبغ .

(٦) توضع القطاعات فى زيت القرنفل لمدة ٥ دقائق أو أكثر لإزالة الزائد من الأخضر الضوئى تماماً .

(٧) تغمس القطاعات فى الزيلول وتحمل فى الكندا بلسم .

تأخذ أنسجة العائل اللون الأخضر وهيفات الطفيل اللون الأحمر .

جـ - مخلوط السفرانين وازرق القطن فى اللاكتوفينول الكحولى :

ويستعمل لصبغ فطريات Peronosporaceae كالبياض الزغبى فى العنب .

المحلول الأول : (اللاكتوفينول الكحولى)

فينول	١٠ جم
حامض لاكتيك مركز	١٠ مل

جلسرين	٢٠ مل
كحول ٩٥ ٪	٢٠ مل

المحلول الثانى : (مخلوط الصبغة)

أزرق القطن	٠٫٢ جم
سفرانين	٠٫١ جم
لاكتوفينول كحولى (المحلول الأول)	١٠٠ مل

قطاعات البارافين :

(١) يزال الشمع ويجرى التدرج بالقطاعات حتى كحول ٩٥ ٪ .

(٢) توضع فى اللاكتوفينول الكحولى (المحلول الأول) لمدة ١٠-١٥ دقيقة .

(٣) تصبغ فى مخلوط الصبغة (المحلول الثانى) لمدة ساعتين أو أكثر ، وتحرك الشرائح أثناء ذلك على فترات لضمان انتشار الصبغة فى الأنسجة بتساوٍ وانتظام .

(٤) توضع القطاعات فى اللاكتوفينول الكحولى (المحلول الأول) حتى يزول الزائد من الصبغة وتفحص القطاعات بالمجهر لتحديد درجة الصبغ مع مراعاة أن تكون أغمق نوعاً من الدرجة المطلوبة ، ثم تغسل فى كحول مطلق .

(٥) تصبغ القطاعات فى محلول ضعيف من السفرانين فى زيت القرنفل ٥٫٠ ٪ لمدة ٢٠-٣٠ دقيقة حتى يصبح لون أنسجة العائل أحمر غامقًا .

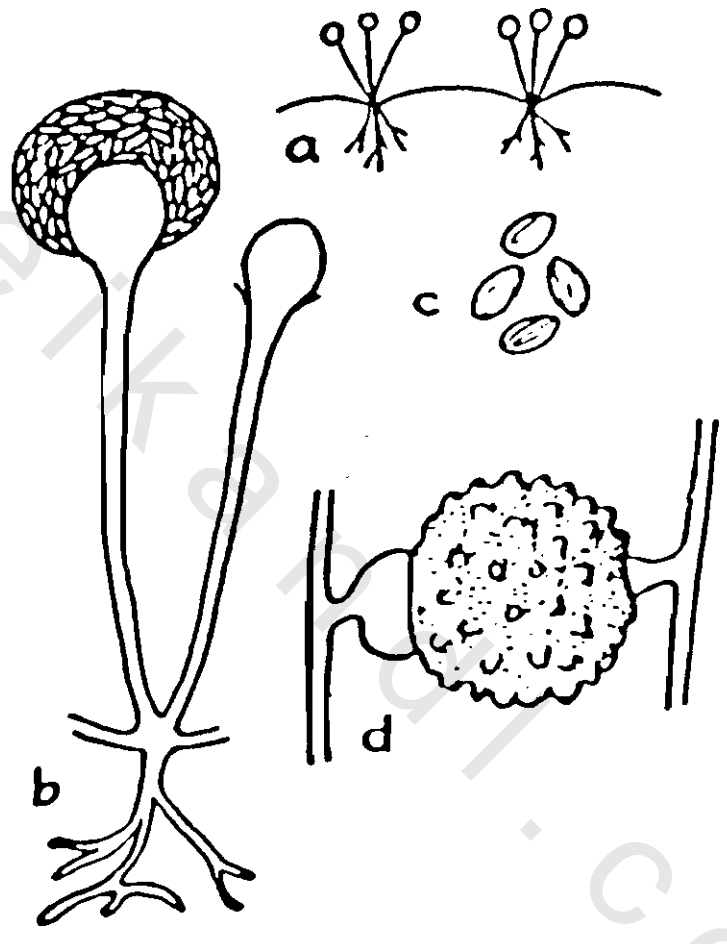
(٦) توضع بعد ذلك فى زيت القرنفل لتحدد الصبغة بالدرجة المطلوبة ، ويتم ذلك بالفحص المجهرى .

(٧) تغسل فى الزيلول وتحمل فى الكندا بلسم ، مع مراعاة تمام التخلص من زيت القرنفل . يصبغ الميسليوم باللون الأزرق وأنسجة العائل باللون الأحمر .

(٢) الفطريات الزيجية (اللاقحية) Zygomycetes

مثل فطريات *Rhizopus* (شكل ١٠-٤) و *Mucor* ويتم دراستها من التحميل الكامل للفطر وغالباً ما يستعمل لهذا الغرض اللاكتوفينول سواء الرائق أو الملون وذلك بقتل وترويق

obeikandi.com



(a) طبيعة النمو (b) حوامل إسبورانجية

(C) جراثيم اسبورانجية (d) جرثومة زيجية

شكل (١٠-٤) : فطر الريزوبس *Rhizopus* من الفطريات الزيجية Zygomycetes .

(جيلمان Gil man ١٩٥٧)

وصبغ الهيفات إذا كانت غير ملونة ، ويستعمل فى تلوين اللاكتوفينول الصبغات التالية :

Cotton blue (وقد تسمى Soluble blue) أو Methyl blue أو Aniline blue .

كما قد يستعمل اللاكتوفينول المضاف إليه الفوكسين الحمضى أو الأخضر الحمضى ، وذلك بإضافة ١-٥ مل من محلول مائى للصبغة لكل ١٠٠ مل من اللاكتوفينول .

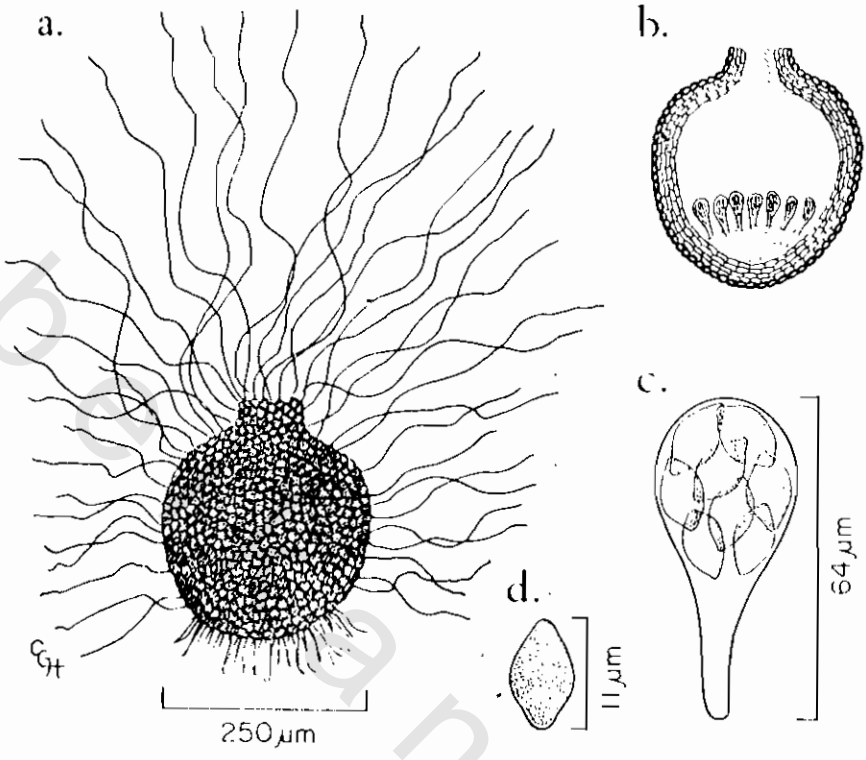
أما فى حالة الجراثيم الزيجية فيمكن حفظها بقطع الأجزاء المحتوية عليها من مزرعة الآجار وقتلها فى محلول F.A.A. وبذلك يمكن استعمالها لدراسة الطلبة محملة فى الماء أو اللاكتوفينول أو عمل شرائح مستديمة (تعمل الشرائح المستديمة بطريقة Butyl Alcohol-Resin أو بطريقة Dioxan-Balsam) .

(٣) الفطريات الاسكية (الزقية) Ascomycetes

تنمو الفطريات المسببة لأمراض العفن التابعة لهذه المجموعة مثل *Aspergil-lus* و *Penicillium* و *Chaetomium* (شكل ١٠-٥) نمواً جيداً على البيئات الصناعية وبذلك يمكن دراستها بعمل تحميل كامل فى الماء أو فى اللاكتوفينول أو فى غروى الجلسرين كما سبق الذكر مع فطر *Rhizopus* وغيره ثم تجرى برشمة للتحضيرات إذا كان مطلوباً حفظها بصورة مستديمة .

أما فى حالة أمراض البياض الدقيقى Erysiphales فيمكن دراستها بعمل كشط أو سلخ والتحميل فى اللاكتوفينول أو غروى الجلسرين ، أما فى حالة دراسة الممصات وتفرعها داخل خلايا البشرة فيمكن قتل وتثبيت الأجزاء المختارة من الأوراق فى محلول Craf وصبغها بعد ذلك بواسطة Iron Hematoxylin .

أما الأكياس الناتجة من التكاثر الجنسى فتقتل فى محلول Bouin أو Craf ثم تصبغ باستعمال Iron Hematoxylin أو بالسفرانين - أخضر سريع .



(a) منظر عام لثمرة أسكية قارورية Perithecium

(b) قطاع خلال الثمرة الأسكية القارورية ، يوضح مجموعة الأكياس الأسكية بالجزء القاعدى المنتفخ من القارورة .

(C) كيس أسكى يشتمل على جراثيم أسكية

(d) جرثومة أسكية ناضجة

شكل (١٠-٥) : فطر *Chaetomium globosum* من الفطريات الأسكية Ascomycetes .

(هانلن Hanlin ١٩٩٠)

(٤) الفطريات البازيدية (الهراوية) Basidiomyectes

(أ) أمراض التفحم Ustilaginales

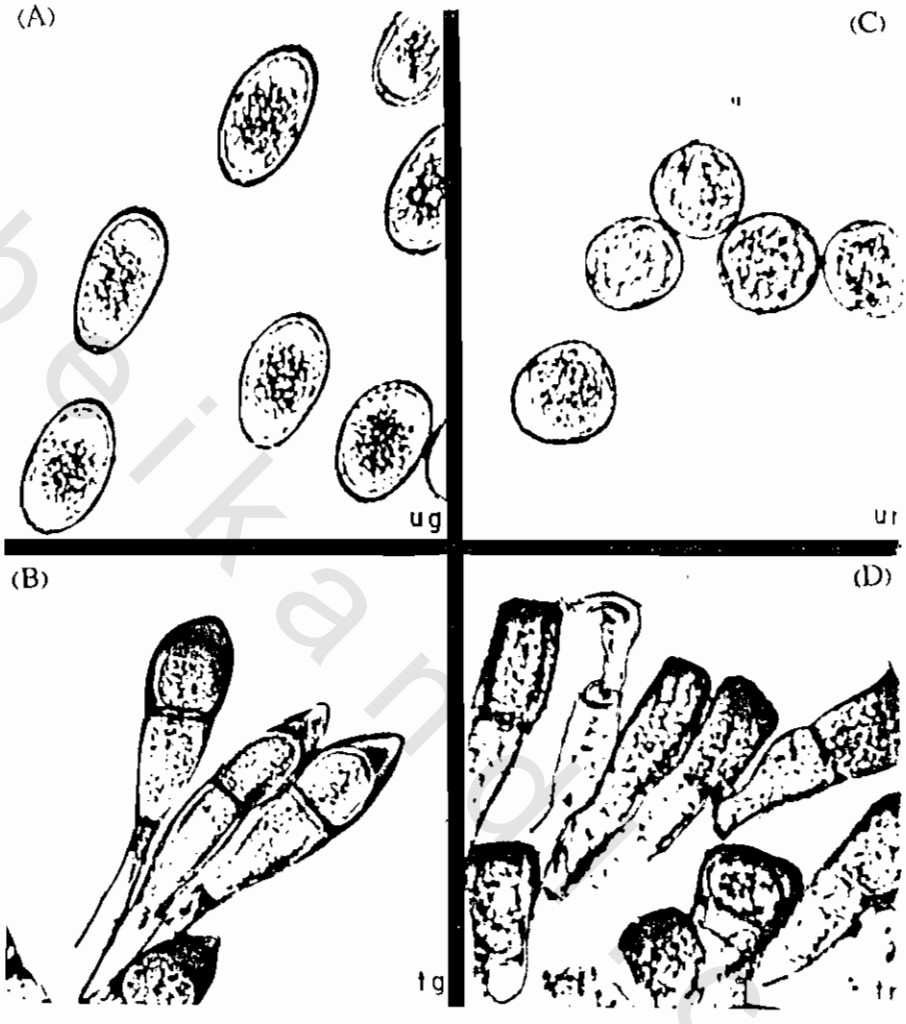
تُنتقى البثرات حديثة العمر بما حولها من أنسجة العائل وتقتل وتثبت فى محلول Craf، أما البثرات الكبيرة فيستخدم معها محلول F.A.A. .

أما الجراثيم الكلاميدية والميسليوم الأول Promycelium و Sporidia فيمكن دراستها فى تحميل سائل بعد نقلها من الحقل ويمكن تحويل الشرائح من الحالة المؤقتة إلى الحالة المستديمة بالطرق سابقة الذكر .

(ب) الأصداء Uredinales

وهى فطريات واسعة الانتشار خاصة على القمح ، تُنتقى البثرات الحديثة العمر للجراثيم اليوريدية Urediniospores والتيليتية Teliospores (شكل ١٠-٦) والأفضل أن تكون على الأوراق (وليس الساق) وتقتل فى محلول F.A.A. وتستكمل الخطوات كما سبق الذكر .

ويستعمل محلول F.A.A. أو Craf لقتل وتثبيت الطورين الأسيدى Aeciospores والبكنيدى Pycnidium ثم الصبغ باستعمال السفرانين - أخضر سريع ، والأفضل Iron Hematoxylin وتتبع نفس الطرق مع الأصداء الأخرى .



(A) جرائيم يوريدية ·

(B) جرائيم تيليتية لفطر *Puccinia graminis f. sp. tritici*

(C) جرائيم يوريدية ·

(D) جرائيم تيليتية لفطر *Puccinia Striiformis*

شكل (١٠-٦) : أمثلة لبعض أجناس الفطريات البازيدية Basidiomycetes

(ويز Wiese ١٩٧٧)

(٥) الفطريات الناقصة Deuteromycetes

وتضم مجموعة من الفطريات لم يكتشف للآن الطور الجنسى لها وهى مجموعة من الفطريات غير متجانسة يتكون فيها الميسليوم من هيفات مقسمة مثل الجنس *Sclerotium* و *Rhizoctonia* (شكل ١٠ - ٧) يستعمل لقتل وتثبيت هذه الفطريات محلول Craf وتصبغ باستعمال Iron Hematoxylin ويراعى أن تكون الصبغة كثيفة ثم تخفف بمحلول حامضى خفيف من حامض الأيدروكلوريك ، وفى حالة وجود الهيفات فى أوعية الخشب فيفضل قتلها فى محلول F.A.A. ، وتصبغ بالطريقة التالية :

أزرق القطن - سفرانين Cotton blue-Safranin

(١) تغسل القطاعات فى الماء .

(٢) تصبغ فى محلول ٠ر٥ ٪ أزرق القطن فى لاكتوفينول لمدة ٥-١٥ دقيقة مع التسخين الهين (يمكن فى حالة القطاعات الملصوقة على الشريحة وضع إناء الصبغ فى فرن الشمع) .

(٣) يزال الزائد من الصبغة بواسطة لاكتوفينول رائق .

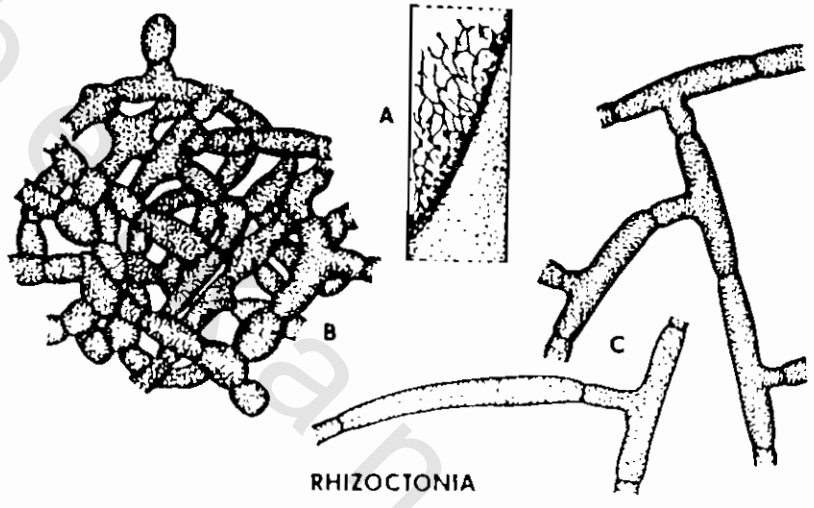
(٤) تغسل فى كحول ٧٠ ٪ لإزالة اللاكتوفينول .

(٥) تصبغ فى سفرانين لمدة ١٠ دقائق (١ ٪ فى كحول ٥٠ ٪) .

(٦) تغسل فى كحول ٧٠ ٪ لإزالة الصبغة الزائدة ثم تنقل إلى كحول ٩٥ ٪ ثم إلى كحول مطلق .

(٧) تروق فى زيلول وتحمَّل فى كندا بلسم .

تأخذ الصبغات لونًا أزرق حادًا والأنسجة الخشبية لونًا أحمر .



(A) أجسام حجرية صغيرة وميسليوم (مزرعة) .

(B) قطاع فى جسم حجرى .

(C) خلايا الميسليوم .

شكل (١٠ ٧) : فطر ريزوكتنيا *Rhizoctonia* DC.
من الفطريات الناقصة Deuteromycetes .

(بارنت وهنتر Barnett & Hunter ١٩٨٧)