المواد وطرائق العمل :

أ. تحضير عينات البشرة Preparation of epidermis samples

حاولت الدراسة الحالية اتباع طريقة تحضير عينات من البشرة لدراسة نمط المعقد الثغري Stomata complex على ما جاء في (العلاق، 2006) ولكن تعذر سلخ البشرة بالشكل اللائق في اغلب الانواع لانتشار الشعيرات على سطحي البشرة وكانت هذه الشعيرات صعبة الازالة، فتعذر كذلك من دراستها بطريقة الفيلم كما جاء في (الزبيدي، 1995)، ولذا اتبعت طريقة اخرى كانت نتيجة المحاولات والتجربة الشخصية، وذلك بغلي الاوراق قليلا في الماء او نقعها في الماء المغلي ثم محاولة سلخ البشرة بوساطة ملقط رفيع النهايتين ومن ثم وضعت برفق على شريحة زجاجية Slide نظيفة ووضعت قطرة من الكليسيرين وغطيت بغطاء زجاجي Cover slide واصبحت بذلك العينة جاهزة لفحص نمط المعقد الثغري، ومع ذلك فشلت عملية السلخ في بعض الانواع ايضا.

ب. تحضير المقاطع التشريحية Preparation of anatomical sections

تم إتباع الطريقة الواردة في كل من الدراستين (Al– Musawi, 1979) و(الزبيدي، 1998) في استعمال الطريقة المعروفة (صب الشمع) فضلا عن إتباع طريقة التقطيع اليدوي Hand sectionings الواردة في (نصر الله، 2007) لدراسة المقاطع المستعرضة، وسيتم ذكر التحويرات التي تمت على الطرائق المتبعة لما كان ملائما مع طبيعة النبات، وبحسب موقعها من العمل.

اولا : طريقة صب القوالب الشمعية :

تضمنت الخطوات الآتية :

1- القتل والتثبيت Killing and fixation

قطعت الاجزاء النباتية المراد دراستها اثناء الجولات الحقلية وحفظت في قناني زجاجية Vials سعة 30 مليلتر وكان في كل قنينة 20 مليلتر من محلول FAA والمحضر انيا :

- Ethyl alchol (95%) …….. 50.0 ml
- Glacial acetic acid …… 5.0 ml
- Formaldehyde (30 – 40%) …… 10.0 ml
- Distal water …….. 35.0 ml

تركت العينات لمدة 20 – 24 ساعة في درجة حرارة الغرفة.

2- الغسل والانكاز Washing and dehydration

غسلت النماذج اكثر من مرة بكحول اثيلي تركيزه 70% لإزالة آثار المثبت ثم حفظت في كحول بالتركيز نفسه في مجمدة الثلاجة الى حين معاودة العمل بها(بعض العينات حفظت مباشرة في الكحول الاثيلي بتركيز 70% واستبدل مرة واحدة بعد 24 ساعة دون الحاجة الى محلول التثبيت وحفظت في مجمدة الثلاجة)، بعد ذلك قطعت الأجزاء النباتية بوساطة مشرط حاد إلى قطع صغيرة بطول 1.5 – 2 مليمتر وتم وضع أجزاء كل نوع في قنينة زجاجية Vial مع وضع علامة لكل قنينة لتجنب الخلط بينها، ثم مررت العينات بسلسلة تصاعدية من الكحول الاثيلي 80 ، 90 و 96% ولمدة 3 ساعات لكل تركيز ، ثم نقلت إلى كحول اثيلي مطلق Absolute alcohol لمدة 3 ساعات ايضا (احيانا تتم اطالة المدة الى 5 او6 ساعات عند ملاحظة تكسر المقاطع بعد التقطيع لضمان تصلبها).

3- الترويق والتشريب Clearing of infiltration

تم تمرير العينات بالتتابع في مزيج من الكحول الاثيلي المطلق والزايلين Xylene ولمدة ساعتين لكل من النسب الحجمية الآتية :

1- 3 كحول مطلق : 1 زايلين
2- 1 كحول مطلق : 1 زايلين
3- 1 كحول مطلق : 3 زايلين
4- زايلين نقي

بعدها سكب نصف الزايلين الذي فيه النماذج وأضيف بدلا منه كمية من شمع البرافين السائل في فرن Oven بدرجة حرارة 55 – 65°م ولمدة 48 ساعة ليتم إحلال البرافين محل الزايلين المتبخر . سكب بعدها البرافين من أوعية العينات وأضيف بدلا منه شمع سائل نقي داخل الفرن وتركت العينات في الفرن لمدة 3 – 5 أيام لإزالة آثار الزايلين وتم استبدال البرافين باخر نقي 5 – 6 مرات خلال هذه المدة، وفي المرة الأخيرة تركت في الفرن لمدة ليلة كاملة (احيانا ليلتين).

4- الطمر والتحميل Embedding and mounting

تم صب كمية من الشمع المنصهر في قوالب ورقية استعمل ورق المجلات في صنعها، اذ تم وضع النموذج المطلوب دراسته فيها ثم صب الشمع المنصهر حتى امتلأ القالب او حتى غمرت العينة جيدا وقد تم العمل بالقرب من مصدر حراري لضمان عدم تصلب الشمع المنصهر في اثناء الصب وتعديل وضع العينة فيه ويراعى تسخين ابرة معدنية جيدا وادخالها في القالب قبل تصلبه لازالة الفقاعات ان وجدت فيه، ثم تركت القوالب لتتصلب.

شذبت القوالب بمشرط حاد بعد رفع القالب الورقي منها ولصق القالب الشمعي الحاوي على العينة بالبرافين السائل على قطعة خشب صنعت خصيصا لتلائم جهاز المشراح الدوار Rotary microtome للتقطيع.

قطعت النماذج بسمك 10 مايكرومتر اذ تكونت أشرطة Ribbons من المقاطع، وضعت بعدها هذه الأشرطة فوق الشرائح الزجاجية الموضوعة على الصفيحة المعدنية الساخنة Hot plate بدرجة 30 مئوية والمغطاة مسبقا بقطرات من لاصق كلسيرين – البومين Glycerin – albumin الذي تم تحضيره باذابة 5 قطرات منه في 75 مللتر ماء مقطر، وبذلك نشرت الشرائط على الشرائح الزجاجية مباشرة وتم فك التجعدات ان وجدت وتركت الشرائح على اللوح الساخن الى حين تبخر محلول اللاصق والتصاق شرائط البرافين على الشرائح الزجاجية.

5- إزالة الشمع والتصبيغ Wax removing and staining

لازالة الشمع مررت الشرائح الزجاجية الحاوية على المقاطع خلال المحاليل الآتية:

1. زايلين لمدة 2 – 4 ساعة وبدرجة ْ50م، (ساعتان كانت كافية).
2. زايلين إلى كحول مطلق بنسبة 1 : 1 ولمدة 5 دقائق .
3. سلسلة من الكحول الاثيلي 30% ثم 50% ثم 70% ثم 80% ثم 96% واخيرا 100% ولمدة 5 دقائق لكل تركيز .
4. صبغة السفرانين بتركيز 0.5% والمذابة في كحول اثيلي بتركيز 50% لمدة ساعتين.
5. سلسلة من الكحول الاثيلي 30% ثم 50% ثم 70% ثم 80% ثم 96% واخيرا 100% ولمدة 5 دقائق لكل تركيز .
6. صبغة الأخضر السريع Fast green بتركيز 0.5% والمذابة في كحول اثيلي 50% ولمدة 3 – 5 ثوان او بالاحرى ثلاث تغميسات Rinse or dipping سريعة، (تم استعمال صبغة الاخضر البراق Light green في بعض العينات وبتركيز الاخضر السريع نفسه).
7. كحول اثيلي مطلق لمدة 5 دقائق .
8. استبدلت خطوة الزيت والزايلين المطلق بترك العينات بمحلول مكون من حجوم متساوية من كل من الزايلين وكندا بلسم لمدة 5 دقائق واحيانا اكثر لتنظيف وترويق العينات.

9. وضعت بضع قطرات من مادة كندا بلسم Canada balsam لعمل تحميل دائمي Permanent mounting للعينات ثم وضع غطاء الشريحة ونقلت الشرائح إلى صفيحة معدنية ساخنة بدرجة حرارة 30 مئوية ليتم جفافها فتصبح جاهزة للفحص.

ثانيا : طريقة التقطيع اليدوي :

اما طريقة التقطيع اليدوي Hand sectioning فقد استعملت شفرة حادة اذ مسكت الأجزاء النباتية التي كانت بطول 3 – 4 سنتيمتر بين الإبهام والسبابة بوضع عمودي ، وتم تقطيعها إلى شرائح رقيقة جدا ثم وضعت المقاطع على شريحة زجاجية وحملت بكندا بلسم ووضع غطاء الشريحة وفرشت على لوحة تحت أشعة الشمس ولمدة 3 ساعات (لإزالة الفقاعات) وبعد جفافها درست المقاطع. ولابد من الاشارة هنا الى ان قسم من العينات المدروسة بهذه الطريقة كانت محفوظة مسبقا بكحول اثيلي تركيزه 70% والبعض الاخر كان مجففا فتم نقعه بمحلول هيدروكسيد الصويوم بتركيز 0.2% او هيدروكسيد البوتاسيوم بتركيز 2% لمدة يومين او ثلاث ثم نقلت الى كحول اثيلي تركيزه 70% وتركت ليومين او ثلاث قبل البدأ بالتقطيع.