



Isfahan University

Faculty of science

Biology department

Lab: Principles of Botany



آشنایی با روش های آماده سازی نمونه های میکروسکوپی و رنگ آمیزی بافت های گیاهی

By:Farzaneh Zoei



- برای مشاهده سلول های گیاهی لازم است از بافت های آنها برش های نازکی تهیه نمود.
- با توجه به هدف مطالعه نوع برش گیری در بافت های مختلف، متفاوت است (به عنوان نمونه، در مورد اندام های استوانه ای شکل نظیر ریشه و ساقه، برش ها به صورت طولی و یا عرضی تهیه می شود).
- سپس، بهترین برش ها برای رنگ آمیزی انتخاب شده و مراحل بعدی بر روی آنها صورت می گیرد. رنگ ها کمک می کنند بافت های مختلف از هم قابل تشخیص شده تا یاخته ها و ضنائم آنها از هم متمایز گردند.
- بعد از رنگ آمیزی، برش ها برای مطالعه زیر میکروسکوپ آماده اند .



مرحله اول: برش گیری

- ساقه گیاه را در صورت نیاز بشوئید و با تیغ تیز برش های باریکی تهیه کنید.
- ضخامت برش باید به اندازه یک لایه سلول و کاملاً عمود بر محور طولی ساقه باشد.
- بدین منظور از قطعه کوچکی یونولیت استفاده نمایید. قطعه را از وسط دو نیم کرده و روی یک نیمه، شکافی به اندازه قطر نمونه ایجاد کنید.
- نمونه را در شکاف جای دهید و نیمه دوم یونولیت را بر روی نمونه قرار داده و با انگشت شست و اشاره دو نیمه یونولیت را فشار دهید تا ساقه در میان یونولیت ثابت شود.
- سپس با تیغ تیز برش های نازکی از عرض ساقه تهیه کنید. دقت کنید که برش ها عمود بر محور طولی ساقه باشد، در غیر این صورت چند لایه سلول در یک برش قرار گرفته و تصویر واضحی نخواهید داشت.
- برش ها را به ظرف شیشه ساعتی که محتوی آب مقطر است منتقل کنید.
- حداقل ۱۰ برش تهیه نمایید.



مرحله دوم: رنگ آمیزی

هدف از رنگ آمیزی :

- رنگ آمیزی بافت های گیاهی به دو منظور انجام می شود :
- ۱ - پدیدار ساختن قسمت هایی که در حالت عادی شفاف و نامرئی هستند.
 - ۲ - مشخص کردن یک جز از اجزای دیگر



انواع رنگ آمیزی :

- ۱ - رنگ آمیزی ساده: انجام رنگ آمیزی به وسیله یک رنگ
- ۲ - رنگ آمیزی مضاعف: انجام رنگ آمیزی به وسیله دو نوع رنگ

- در رنگ آمیزی ساده، هدف مطالعه وضعیت یک نوع بافت است. به همین علت از رنگی استفاده می شود که به طور اختصاصی آن بافت را رنگ می کند.
- در رنگ آمیزی مضاعف دو دسته اصلی بافت ها (بافت های چوبی و سلولزی) از هم متمایز شده که بدین منظور از دو رنگ استفاده می شود. یک رنگ سلولز و دیگری چوب، چوب پنبه و یا کوتین را رنگ می کند.

رنگ آمیزی ساده:

در این روش که به منظور مطالعه چگونگی وضع یک نوع بافت بکار می رود برش تهیه شده را پس از بیرنگ کردن با آب ژاول به مدت نیم تا یک دقیقه در محلول یک رنگ ساده می گذارند.

نوع بافت مورد نظر را با توجه به رنگی که گرفته است تشخیص می دهند. مثلاً بافت های چوبی یا چوب پنبه و کوتین با محلول رقیق بلودو متیلن به رنگ آبی در می آید و بر دیواره سلولزی سلول ها اثر ندارد و بافت های سلولزی با محلول قرمز کنگو به رنگ قرمز در می آیند.

رنگ آمیزی مضاعف یا مرکب :

در این روش ابتدا برش ها را در یک محلول رنگ کننده بافت چوبی و چوب پنبه ای مانند آبی متیل ، سبز متیل یا فوشین قرار می دهند و سپس آن ها را با یک محلول رنگ کننده بافت سلولزی مانند کارمن زاجی یا قهوه ای بیسمارک یا قرمز کنگو رنگ می کنند. رنگ آمیزی مضاعف چند نوع است.

رنگ یافت پس از رنگ آمیزی	نام و جنس بافت	زمان	نام رنگ	نوع رنگ آمیزی
صورتی	پارانشیم-کلانشیم-آبکش (سلولز) آوندهای چوبی-اسکرانشیم-چوب پنبه	۱۵-۲۰ دقیقه	کارمن زاجی	نوع ۱
سبز	پارانشیم-کلانشیم-آبکش (سلولز) آوندهای چوبی-اسکرانشیم-چوب پنبه	۱۵-۳۰ ثانیه	سبز متیل	نوع ۲
صورتی	پارانشیم-کلانشیم-آبکش (سلولز) آوندهای چوبی-اسکرانشیم-چوب پنبه	۱۵-۲۰ دقیقه	کارمن زاجی	نوع ۲
آبی	پارانشیم-کلانشیم-آبکش (سلولز) آوندهای چوبی-اسکرانشیم-چوب پنبه	۱۵-۳۰ ثانیه	آبی متیل	نوع ۲
زرد-زرد قهوه ای	پارانشیم-کلانشیم-آبکش (سلولز) آوندهای چوبی-اسکرانشیم-چوب پنبه	۳۰-۶۰ ثانیه	قهوه ای بیسمارک	نوع ۳
سبز	پارانشیم-کلانشیم-آبکش (سلولز) آوندهای چوبی-اسکرانشیم-چوب پنبه	۱۵-۳۰ ثانیه	سبز ید	نوع ۳
زرد-زرد قهوه ای	پارانشیم-کلانشیم-آبکش (سلولز) آوندهای چوبی-اسکرانشیم-چوب پنبه	۳۰-۶۰ ثانیه	قهوه ای بیسمارک	نوع ۴
قرمز گلی	پارانشیم-کلانشیم-آبکش (سلولز) آوندهای چوبی-اسکرانشیم-چوب پنبه	۱۵-۳۰ ثانیه	فوشین بازی	نوع ۴

مواد رنگی در واقع شامل ترکیباتی هستند که درون اجزای مقطع و سلول ها نفوذ می کنند و چون انواعی از آنها از لحاظ شیمیایی نیز واکنش هایی با اجزای سلول ها و مقاطع انجام می دهند ، تاثیری دائمی بر مقاطع می گذارند .

در این روش برشها را به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه در آب ژاول می گذارند تا برشها بی رنگ گردند، یعنی از رنگهای حیاتی مانند کلروفینل- کاروتن- گزانتوفیل زدوده شوند و مواد درون سلول تخلیه گردند. بعداز شستشو دادن برشها را با آب اسیددار می شویند و آنها را بسته به نوع رنگ چند ثانیه تا چند دقیقه داخل رنگ قرار داده و بعداز شستن با آب، نوع بافت مورد نظر را با توجه به رنگی که گرفته است تشخیص می دهند.

اگر دیواره سلولی از جنس چوب، چوب پنبه، یا کوتین باشد با رنگ آبی متیل به رنگ آبی، با رنگ فوشین بازی به رنگ قرمز روشن و با رنگهای سبز متیل یا سبز ید به رنگ سبز در می آید. ولی اگر دیواره سلولی از جنس سلولز باشد با رنگ قرمز کنگو به رنگ قرمز با کارمن زاجی به رنگ صورتی، با قهوه ای بیسمارک به رنگ زرد و زرد قهوه ای و با هماتوکسیلین به رنگ بنفش در می آید.

معرفهای رنگی

تعدادی معرفهای رنگی که جهت رنگ آمیزی بافتهای گوناگون گیاهی استفاده می شود و تاثیر رنگی آنها بر بافتهای مختلف گیاهی به شرح ذیل می باشد.

ردیف	نام معرف	نام بافت گیاهی	پسپس از رنگ آمیزی	فرمول شیمیائی
۱	کارمن (Carmin)	پارانشیم سلولزی	ارغوانی	محلول اسید اتانولیک
۲	متیلن آبی (Methylen Blue)	بافتهای چوبی	آبی	$C_{16}H_{18}ClN_3S.aq$
۳	سبز ید (Methyl Green)	بافتهای چوبی	سبز	$C_{27}H_{35}Cl_2N_3$ $ZnCl_4$
۴	بیسمارک (Bismark Brown)	دیواره سلولی	قهوه ای	$C_{12}H_{24}N_8$, $2HCl$
۵	فوشین بازی (Fuchsin)	همه بافتها	قرمز	ماده آلی ازت دار
۶	سافرانین (Safranin)	بافتهای چوبی	زرد	$C_{20}H_{19}ClN_4$
۷	قرمز روتنوم (Ruthenium Red)	تیغه میانی	صورتی	$C_{11}H_{24}N_{14}O_2Ru_3$
۸	هماتوکسیلین (Hematoxylin)	تیغه میانی	بنفش	-
۹	لوگل	دانه نشاسته	آبی	-



شرح آزمایش رنگ آمیزی ساده:

۱. قرار دادن مقاطع در شیشه ساعت حاوی محلول رقیق بلودومتیلن، سبزید یا فوشین آمونیاکی به مدت نیم تا یک دقیقه
۲. شست و شو مقاطع با آب

توجه :

برای رنگ آمیزی با بلودومتیلن مقاطع را به مدت نیم تا یک دقیقه در شیشه ساعتی که حاوی محلول یک در هزار بلودومتیلن است می گذاریم.

برای رنگ آمیزی با سبزید مقاطع را به مدت یک دقیقه در شیشه ساعتی که حاوی محلول سبزید به غلظت نیم درصد است می گذاریم.

برای رنگ آمیزی با فوشین آمونیاکی مقاطع را به مدت چند ثانیه در شیشه ساعتی که حاوی فوشین آمونیاکی است می گذاریم.

نتیجه آزمایش :

۱ بلودومتیلن چوب ، چوب پنبه و کوتین را آبی رنگ و بر دیواره های سلولزی سلول ها اثری ندارد .

۲ سبزید بافت های چوب ، چوب پنبه و کوتین را به رنگ سبز متمایل به آبی در می آورد .

۳ فوشین آمونیاکی بافت های چوب ، چوب پنبه و کوتین را به رنگ قرمز در می آورد .

شرح آزمایش رنگ آمیزی مضاعف یا مرکب:

در این نوع رنگ آمیزی دو دسته اصلی بافت ها (بافت های چوبی و سلولزی) از هم متمایز می شوند که برای این کار از دو رنگ استفاده می شود که یکی سلولز و دیگری چوب ، چوب پنبه و کوتین را رنگ آمیزی می کند.

۱. قرار دادن مقاطع میکروسکوپی (برش ها) در آب ژاول به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه

۲. شستشو مقاطع با آب مقطر

۳. قرار دادن مقاطع در اسید استیک ۱٪ به مدت ۲-۱ دقیقه

۴. شستشو مقاطع با آب مقطر

۵. قرار دادن مقاطع در محلول سبزید یا آبی متیل به مدت ۲۰ ثانیه

۶. شستشو مقاطع با آب مقطر

۷. قرار دادن مقاطع در محلول کارمن زاجی به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه

۸. شستشو مقاطع با آب مقطر

نتیجه آزمایش :

- ۱ - سلول های دارای دیواره سلولزی مانند پارانشیم ، کلانشیم ، آوندهای آبکشی و فیبر سلولزی به وسیله کارمن زاجی به رنگ قرمز متمایل به نارنجی در می آیند .
- ۲- بافت های چوبی ، چوب پنبه ای و کوتینی توسط سبزید یا آبی متیل به رنگ سبز یا آبی متمایل به سبز در می آیند.

- توجه:

علت قرار دادن برش هادر آب ژاول از آن جهت است که از خاصیت رنگ بری این ماده استفاده شود تا نور بتواند از بافت های رنگی نمونه عبور کند.

تهیه مقاطع میکروسکوپی دائم:

مقاطع رنگ آمیزی شده در گلیسرین تدریجاً رنگ خود را از دست می دهند و علاوه بر آن دوام آنها بیش از یک هفته نیست. به همین علت برای تهیه مقطع دائم از صمغ مخصوصی به نام صمغ کانادا استفاده می شود. مقطعی که در صمغ کانادا قرار داده می شوند باید کاملاً عاری از آب باشند. آبگیری بوسیله الکل انجام می شود. اما مقاطع ضریفی را که در آب قرار داشته اند نباید مستقیماً در الکل ۹۶ درجه قرار داد. زیرا الکل قوی باعث تغییر شکل مقاطع می شود و آنها را برای مطالعه غیر قابل استفاده می نماید. این قبیل برش ها را به ترتیب در الکل های ۳۰ و ۴۵ و ۶۰ و ۷۵ و ۹۰ و ۹۶ و بالاخره در الکل مطلق قرار می دهند. آنگاه مقاطع را در گزیلول (زایلن) قرار داده و سپس روی لام می گذارند و یک قطره صمغ کانادا (رقیق شده) به آن می افزایند. بعد لامل را آهسته روی برش قرار می دهند صمغ کانادا تدریجاً تمام فضای بین لام و لامل را می گیرد و رفته رفته گزیلول خود را از دست داده و خشک می شود.

حال نمونه آماده مشاهده و بررسی است.

یک قطره آب مقطر بر روی لام قرار دهید، سپس چند تا از برش های تهیه شده را با قلم مو روی آن قرار داده و لامل را به طور مورب روی لام به آرامی بیاندازید تا حباب هوا بین لام و لامل تشکیل نشود. نمونه را زیر میکروسکوپ نوری مطالعه کنید.

همچنین می توانید از تصویر ایجاد شده با دوربین عکس بگیرید.

در صورت نیاز به نگهداری این نمونه به جای یک قطره آب مقطر از گلیسیرین استفاده کنید و دور آنرا با لاک ناخن جهت عدم نفوذ گرد و خاک بپوشانید .