تقنية المجهرالإلكتروني

Electron Microscopy technique

اعداد

أ.م.د. كمال بنيامين ايشو

قسم البستنة وهندسة الحدائق

كلية الزراعة والغابات / جامعة الموصل

٢٠٢١ / ٢٠٢٢

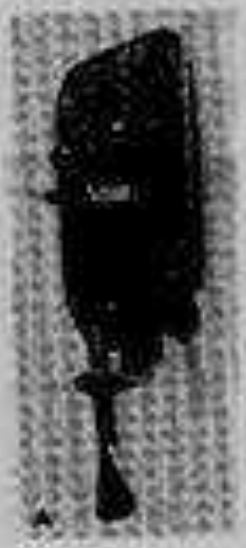
- اول من استخدم المجهر الضوئي هو العالم انتوني فان ليفنهوك

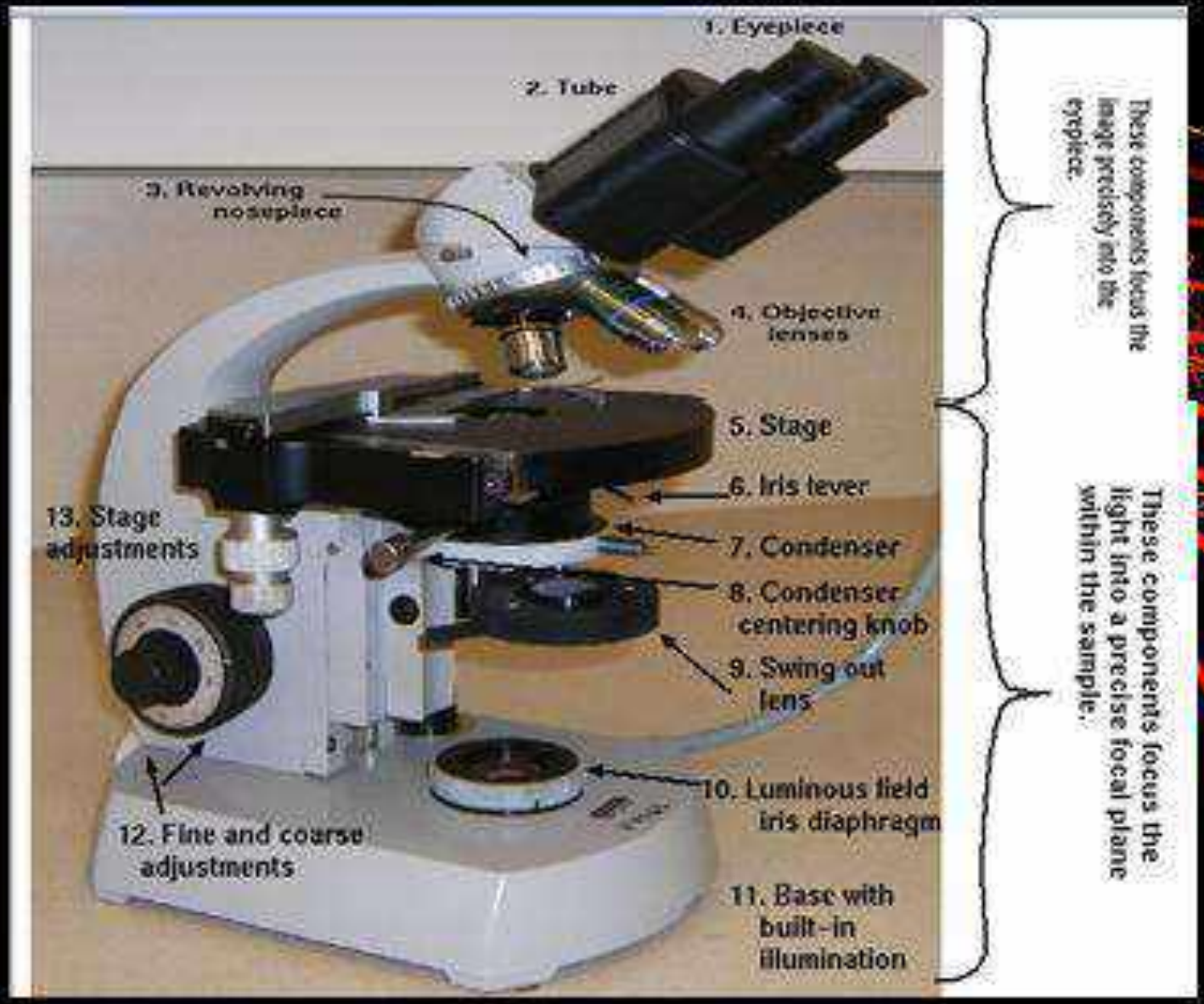
- تطورت صناعة المجهر الضوئي وتقدمت معه المعرفة في علوم منها الأنسجة والخلية والوراثة

- وصلت قوة تكبيرة الى ١٥٠٠ مرة اعتمادا على الطول الموجي للضوء

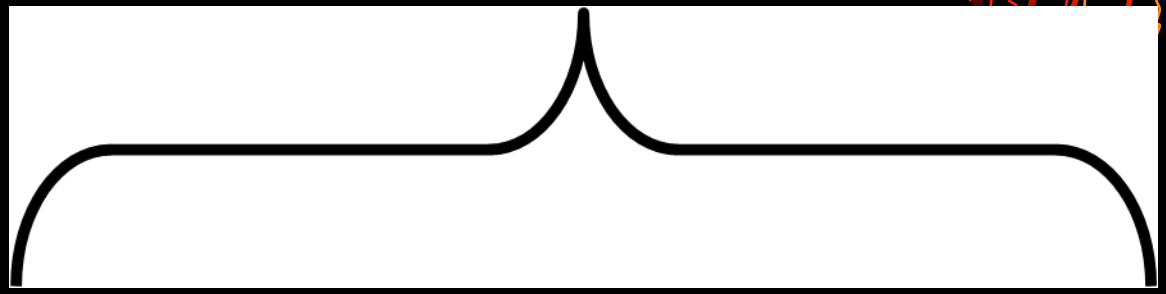
- بتطور بعض المفاهيم الفيزيائية تم صنع اول المجهر الالكتروني على يد ماكس نول و ارنست روسكا.

- بناء أول مجهر الكتروني نافذ عام ١٩٨٣م بواسطة البرت بريس و جيمس هلير




1. Eyepiece
2. Tube
3. Revolving nosepiece
4. Objective lenses
5. Stage
6. Iris lever
7. Condenser
8. Condenser centering knob
9. Swing out lens
10. Luminous field iris diaphragm
11. Base with built-in illumination
12. Fine and coarse adjustments
13. Stage adjustments
These components focus the image precisely into the eyepiece.
These components focus the light into a precise focal plane within the sample.

تصنيف المجاهر و أنواعها



L.M

ضوئية

E.M

إلكترونية

ضوئية L.M

Simple L.M

Single lenses

Compound L.M

1- Inverted L.M

2- Dark field L.M

3- Phase Contrast Microscop

4- U.V.M.

5- Immuno flourecent I.F.L.M.

6- Descetting L.M attaching

7- Camera L.M

8- Cooliscop L.M

إلكترونية E.M

1-Transmission Electron Microscopy (TEM)

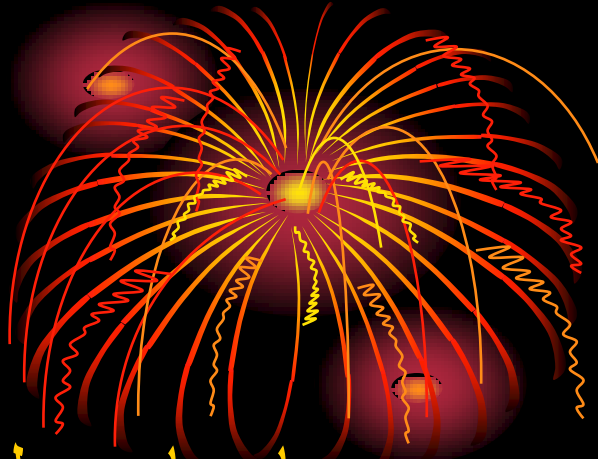
2- Scanning Elect Microseopy (SEM)

3- Enery Dispersiv X-ray Spectroscop

4- Field Emission Scanning Electron Microscopy (F E.SEM)

5- Electron Probe Micro-Analyzer. (EPMA)= (SEM&EDS)

مقارنة وتصنيف



- مما يساعد على معرفة أهمية المجهر الالكتروني عمل مقارنة بينه وبين المجهر الضوئي من الناحية الفيزيائية ومن ناحية التركيب والأجزاء المشتركة. ومقارنة أخرى للتصنيف وأنواع كل من هذه المجاهر المستخدمة
- وفيما تستخدم.

أولاً:مقارنة بين قوة التمييز والتكبير بين المجهرين

- 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 الالكتروني النفاذ وصلت في ذلك الحين إلى ٦٠٠,٠٠٠,٠٠٠ مرة
- فيمكنه أن يظهر أجساماً تصل من الصفر إلي 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
- إذن: ما هو السر في قوة التمييز أو قدرة التبيين –الإظهار- ؟
- **قوة التمييز أو قوة التبيين (Resolution power) أو (Resolving power):**
- هي أصغر مسافة بين أصغر جسمين متقاربين يمكن أن نراهما بوضوح تام مفصولين تماماً عن بعضهما من غير أي تداخل

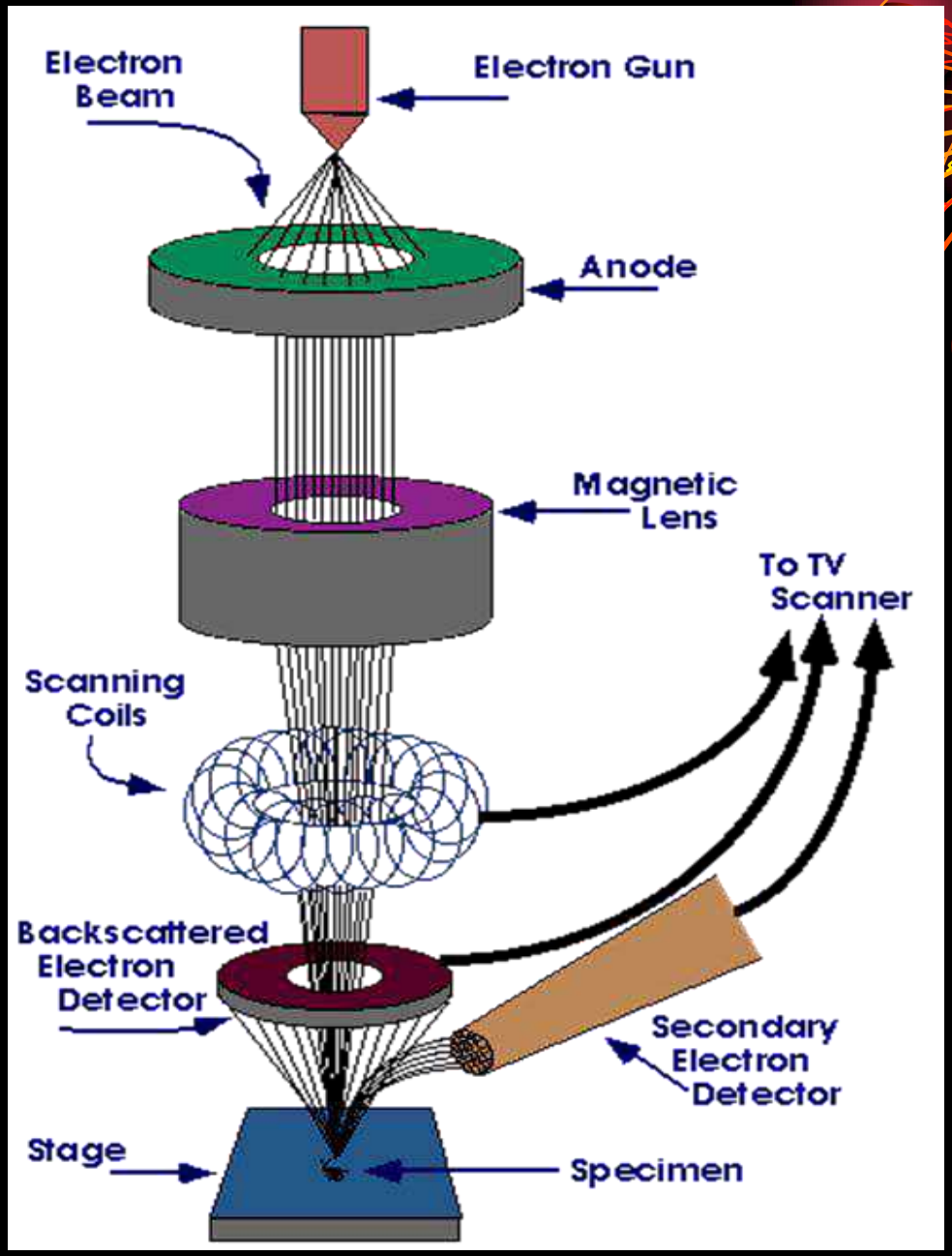
كيف حصل ذلك للمجهر الالكتروني

- لقد حقق اكتشاف المجهر الالكتروني زيادة كبيرة في قوة الوضوح حيث 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

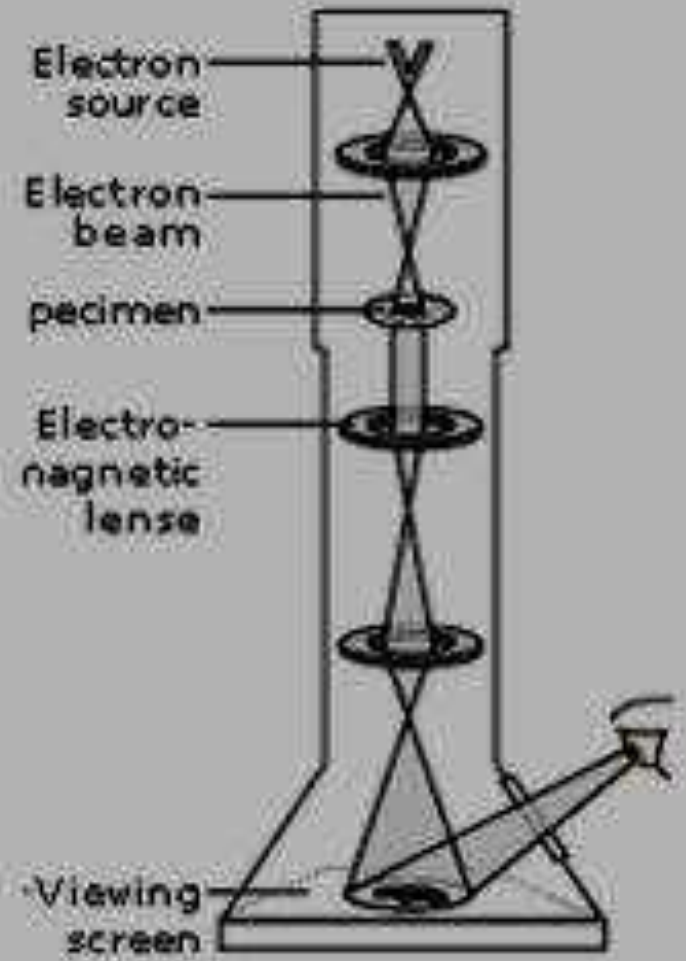
إذاً فكرة المجهر الإلكتروني

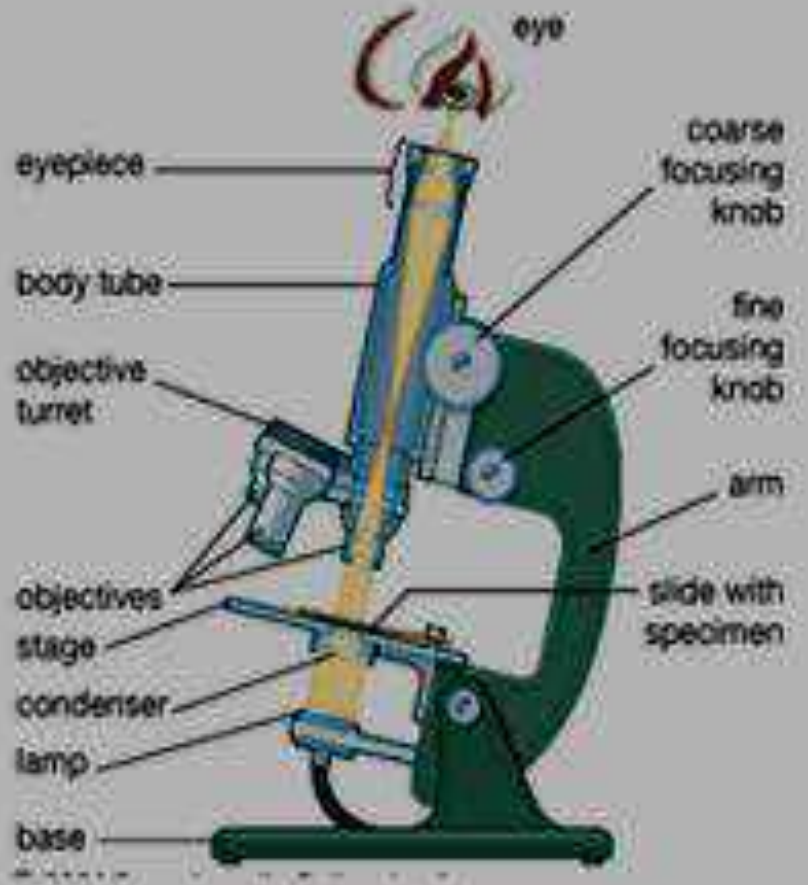
تعتمد تكوين الصورة على أنه يحدث نتيجة لإرتطام إلكترونات بسطح العينة ومنها تشتت متفاوت للإلكترونات.

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

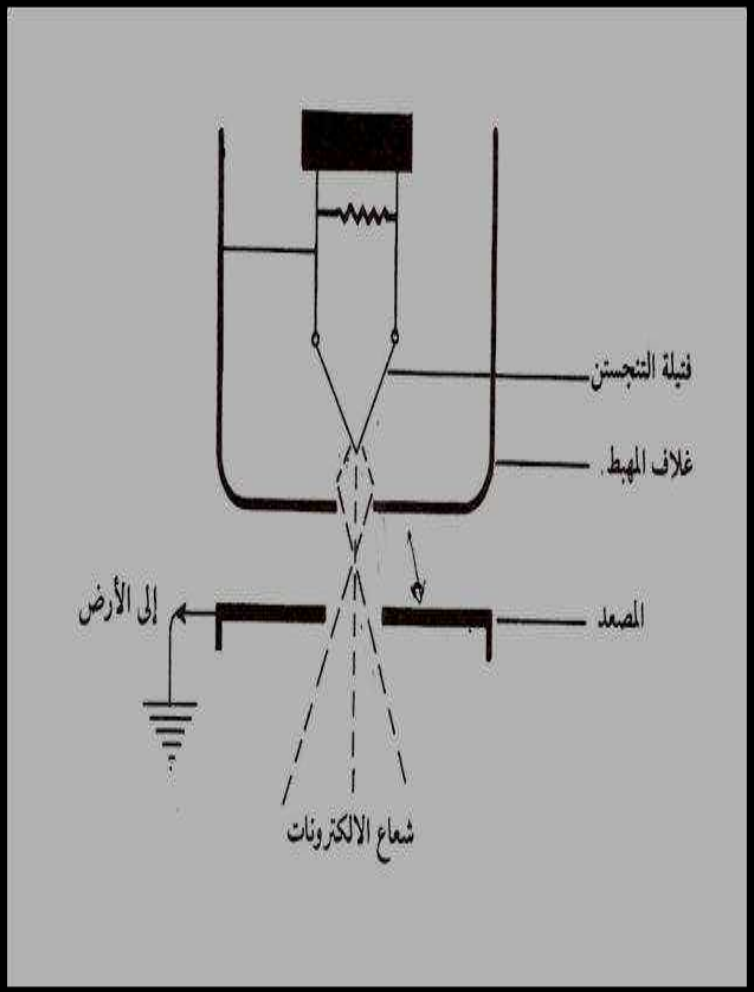

Electron Beam
Electron Gun
Anode
Magnetic Lens
To TV Scanner
Scanning Coils
Backscattered Electron Detector
Secondary Electron Detector
Stage
Specimen

مقارنة بين المجهر الضوئي و المجهر الالكتروني النافذ من ناحية التركيب





نظام الإضاءة أو مصدر الشعاع الإلكتروني المسؤول عن تكوين الصورة



- ***أولا:***

يتكون من بيت المهبط **Cathode** الذي يوجد أعلى الجهاز (العمود) ويحتوي على:-

١- مدفعه الالكترونات **Electron gun** التي تحتوي على الفتيل **Filament**

وهي المهبط **Cathode** وهو على شكل حرف **V** .

المهبط / الفتيل يصنع عادة من سلك معدني يمتاز بسهولة تحرير الالكترونات عند تسخينه

(تذكر مبدأ اللمبة عند تسخين سلكها تعطي الضوء)

وهذا خاص بمعدن التنجستن حيث يتحمل درجة حرارة

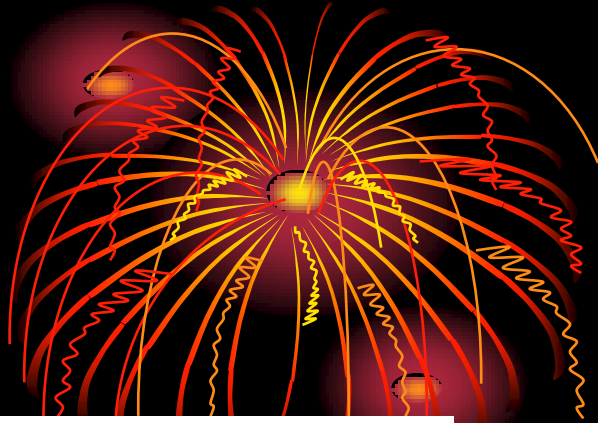
تصل إلى أكثر من (٣٠٠٠ درجة مئوية)

والذي يتحكم بدرجة الحرارة هو قوة التيار المار فيه عند الاستخدام.

فمثلاً في المجال البيولوجي مقدار الفولتية المستخدمة ما بين ٤٠ **K.V** وحتى ١٢٠٠٠ – ٤٠٠٠٠) **K.V** فولت(وهناك مجاهر حديثة يصل فيها الفولت (شدة التيار) حتى مليون فولت.

٢- المصعد(**cylinder) Anode wehneltyl** وهي قطعة معدنية مخروطية الشكل بها ثقب صغير في مركزها قطره (**١mm Dia.**)من خلال هذا الثقب يمر الشعاع الالكتروني

عند مرور تيار فرق جهد عالي في الفتيل تسخن الفتيلة المهبط فتحرر الالكترونات ذات الشحنة السالبة فتجذب نحو المصعد ذو الشحنة المضادة



ثانياً:-

Electromagnetic Alignment system

هو المجال الكهرومغناطيسي ويتكون من ملفات كهربائية عندما يمر فيها التيار يحدث فيها مجال مغناطيسي يجعل الشعاع الالكتروني يتمركز بالوسط ويمنعه من الانحراف عن مسار الوسط

نظام تكوين الصورة:-

العدسات :-

يتكون المجهر الالكتروني النفاذ من أربع عدسات إلكترونية تعمل على تكوين الصورة المكبرة

والعدسات هي:

١ – العدسة المكثفة	Objective lens (O.L.)
٢ – العدسة الشيئية	Projector lens (P.L.)
٣ – العدسة المتوسطة	Intermediate lens (I.L.)
٤ –العدسة العارضة	Condenser lens (C.L.)

تصنع كل عدسة من معدن قابل للتمغنط وتتكون من:-

١ - ملف كهربائي :

وهو عبارة عن سلك ملفوف آلاف المرات يشبه الأنبوب ويمر فيه تيار كهربائي تصل قوته إلى واحد أمبير

و المجال المغناطيسي الناتج من مرور التيار الكهربائي يركز بواسطة محفظة حديدية ناعمة تحيط بهذه اللفات

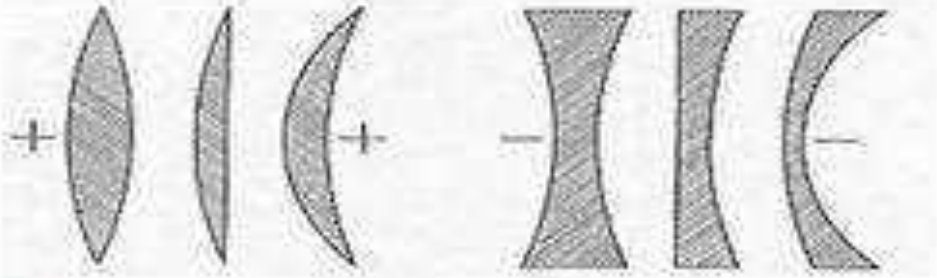
ويساعد في تركيز هذه الحزم الالكترونية قطع من الحديد تعرف ***بالقطع القطبية وهما:***

٢ - قطعتين إحداهما عليا يمكن تحريكها والسفلى مبرومة في علبة العدسة

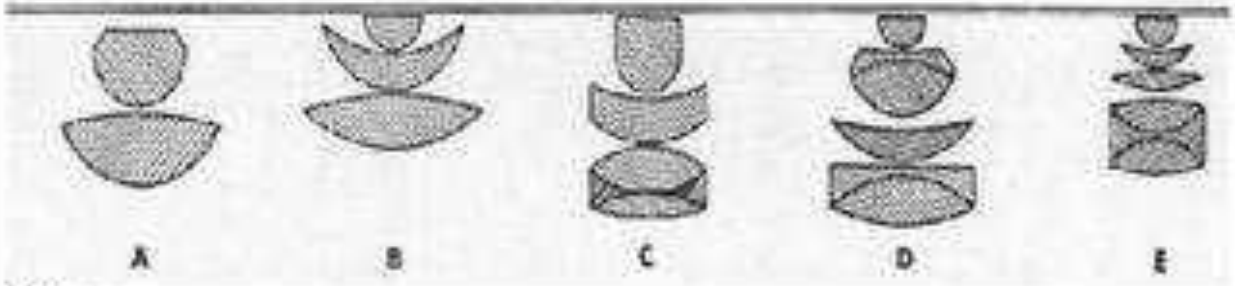
ويعتمد البعد البؤري للعدسة الالكترونية على قوة التيار الكهربائي الذي يصل لهذه القطع

ويمكن أن نغير البعد البؤري بتغيير شدة التيار وغالباً يصل البعد البؤري للعدسات الالكترونية إلى عدة ملليمترات (3-5mm)

There are six simple lenses of two types (see diagram):



Reference:



Reference:

Substage Condensers from the uncorrected (chromatic) Abbe, partially corrected (aplanatic) to the fully corrected (achromatic):

A. Oil Abbe Chromatic, N.A. 1.20 or N.A. 1.40 (Two Lenses)

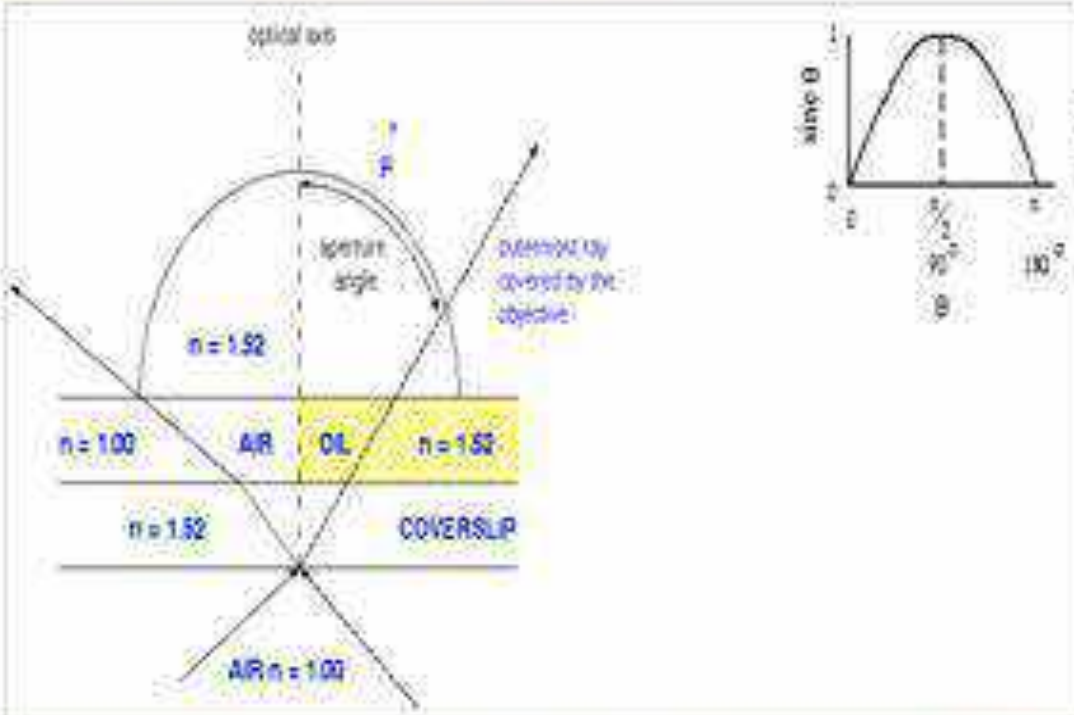
B. Oil Aplanatic, N.A. 1.40

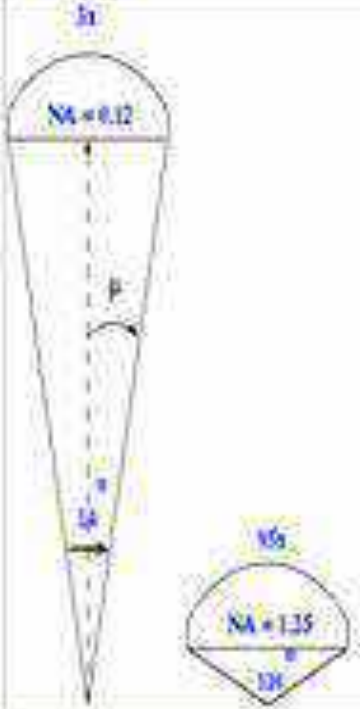
C. Dry Achromatic, N.A. 1.00.

D. Oil Achromatic, N.A. 1.40.

E. Oil Achromatic, N.A. 1.30

Thus, the numerical aperture is the sine of half the angular aperture of an objective lens.





Comparison of dry and oil immersion objectives. The values for NA range from 0.1 to 0.95 for dry objectives and up to 1.5 for oil immersion lenses. Air has a refractive index of 1. So for air, the image scatters beyond the aperture angle. Immersion oil fills the space between the cover glass and the front lens of the microscope has a refractive index of 1.5. Oil keeps the image within the aperture angle of the objective lens.

Angular Apertures of Objectives Compared. The 5x objective is at a longer focal length, taking in a larger area at a smaller angle. The 95x objective is at a shorter focal length, taking in a smaller area at a larger angle.

تحديد مواقع العدسات ووظائفها

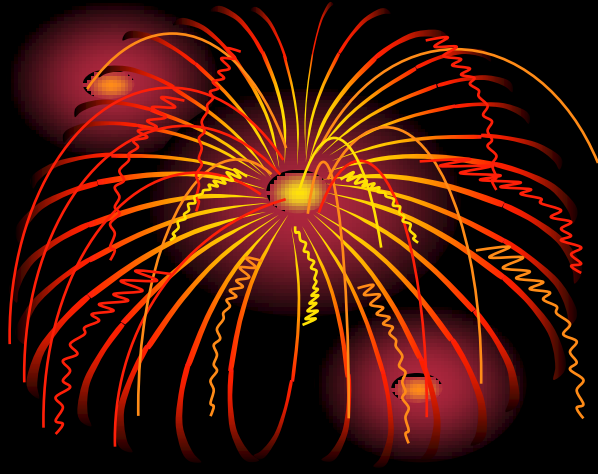
- ١- يطلق على العدسة القريبة من الشاشة الفلوروسنتية
- العدسة العارضة المجسمة **lens projector**
- وهي التي تقابل العدسة العينية في المجهر الضوئي.
- ٢- يليها العدسة المتوسطة **Intermediate lens**
- ٣- ثم العدسة الشيئية **Projector lens**
- وهي العدسة المباشرة للعينة والقريبة منها وتشابه الشيئية بالمجهر الضوئي
- ولذلك سميت بالعينية/ الشيئية
- ٤- وأخيراً العدسة المكثفة **lens Objective**
- وهي أعلى عدسة في العمود أي أقرب شيء إلى المهبط **Cathode**
- حيث تقوم هذه العدسة بجمع الحزم الالكترونية حين صدورها من الفتيل (المهبط)
- تكثف الشعاع الالكتروني في نقطة معينة ومسار معين.

يوجد حاجزان متحركان من البلاتين يقعان بين العدسة الشيئية والعدسة المتوسطة

- ويعرف الحاجز بـ (**Aperture**)
- ويوجد على هذا الحاجز ثلاث فتحات أقطارها على الترتيب:-
- **Apertune ١=٢٥um، Apertune ٢=٥٠um & Apertune ٣=١٠٠um**

يستخدم حاجز العدسة الشيئية (العلوي) لإيقاف الأشعة الالكترونية المائلة والتي تمر من
خلال العدسة الشيئية، وبذلك يمنع التباين في الصورة النهائية
لذلك يطلق عليه بعض الأحيان حاجز التباين (contrast diaphragm)

اهمية المكروسكوب



- تطور العلوم الخلوية ومعرفة التراكيب الدقيقة
- دراسة الكائنات الدقيقة
- دراسة وتحليل المركبات الكيميائية

لماذا وصف المجهر الالكتروني بأنه نافذ؟

يتم وصف المجهر الالكتروني تبعاً لتفاعل الشعاع الالكتروني مع العينة ولذلك قسم الى عدة انواع منها:

أولا: المجهر الالكتروني الماسح (SEM) يعطي صورة ثلاثية الابعاد نتيجة مسح سطح

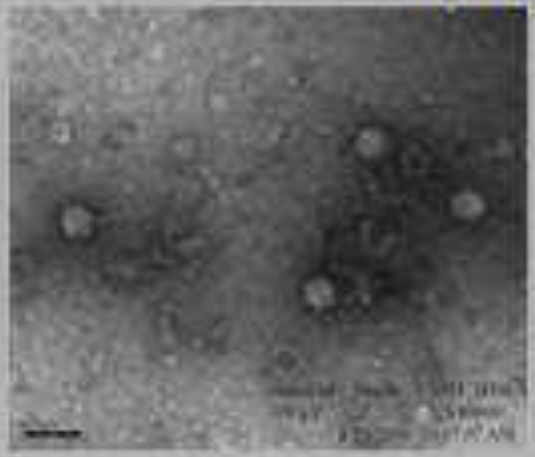
ثانياً : المجهر الالكتروني النافذ (TEM)

يتميز بإعطاء صورة من بعدين :- نتيجة لنفاذ الشعاع الالكتروني الى داخل المقاطع الرقيقة من الانسجة أو الخلايا

ثالثاً: المجهر الالكتروني الماسح النافذ (STEM)

يقدم صورة شاملة، نتيجة لقدرته على اختراق العينات الصغير وبالتالي يعطي صورة تحتوي التفاصيل الدقيقة الداخلية للعينة والخارجية ايضاً

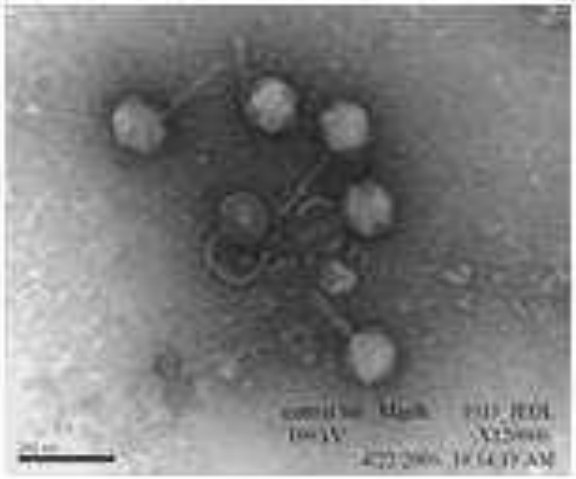
المجهر الإلكتروني النافذ

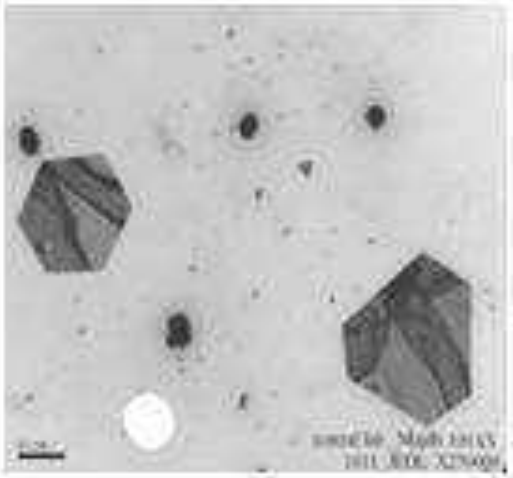


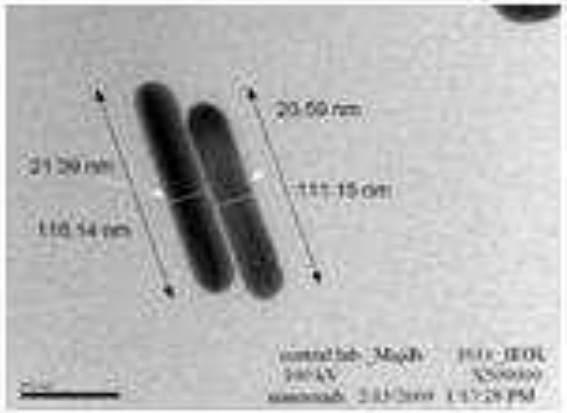
يستخدم لفحص وتصوير:

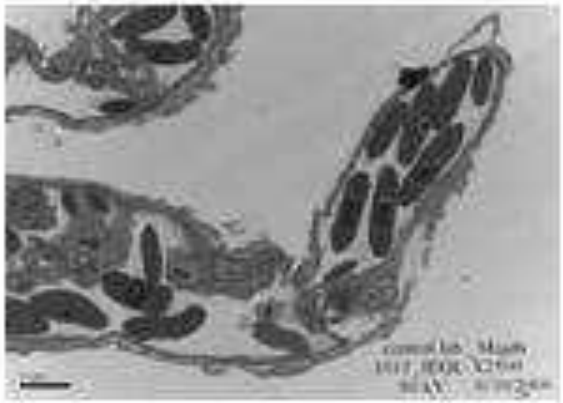
- المقاطع الرقيقة من العينات البيولوجية من
- أنسجة وخلايا نباتية أو حيوانية.
- الفيروسات والبكتريا عن طريق الصبغ السالب.
- المواد الكيميائية الصغيرة وجزيئات النانو.

المجهر الالكتروني النافذ









Tissue Processing

خطوات معاجة العينة كيميائيا لتحضيرها للفحص بواسطة المجهر الإلكتروني

التثبيت	Fixation
غسيل العينات	Washing
نزع الماء	Dehydration
التجفيف بالنقطة الحرجة	Critical Point drying
عمليات ما بعد التجفيف	Processing Specimens after drying
التحميل على الحوامل العينات	Specimen stubs

التثبيت Fixation

يكون على مرحلتين

المثبت الأول Primary Fixation

بمحلول الجلوالدهيد 2-3% Bufferd glutraaldhyd

عند درجة حرارة الغرفة لمد ٢-٣ ساعات – أو ليلة كاملة في الثلاجة

وهو مهم في تثبيت مادة glycogen & protein في النسيج والخلايا

المثبت الثانوي Secondary Fixation

باستخدام حمض الأوزميوم 1% Bufferd Osmic acid

Osmium tetroxid –OsO4

عند درجة حرارة الغرفة

وهو مهم في

١- تثبيت المادة الدهنية Lipid في النسيج والخلايا

٢- كصبغة أولية لعينات المجهر الإلكتروني وعينات الكيمياء النسيجية

٣- يزيد من عملية التوصيل الكهربائي بين العينة وشعاع الحزم الإلكترونية وذلك يؤدي إلى زيادة التباين بسبب زيادة التوصيل الكهربائي

أهمية التثبيت العامة :

الحفاظ على العينة من التفتتت والتفسخ .
الحفاظ على العينة من التحلل الذاتي بفعل الإنزيمات والبكتيريا .
إعطاء العينة شئ من الصلابة والقسوة وتويل محتوى النسيج السائل إلى صلب .
حماية النسيج من عيوب الانكماش .
يعمل كوسيط بين المثبتات والكحول .
بقاء النسيج على طبيعتة وحالتة في مصدرة .

عوامل هامة تؤثر على التثبيت

تركيز المثبت الأولي قبل أخذ العينة
حجم العينة (تكون صغيرة)
سرعة نقل العينة من مصدرها
مدة التثبيت يجب أن تتناسب مع حجم العينة
كمية التثبيت
جودة المثبت (جديد – قديم – متاكسد أم لا – بدون لون – أصفر –أسود)
نوع المحلول المنظم
درجة الحموضة
الإسموزية

غسيل العينات Washing

غسيل العينة بين المثبتات وبعدها أمر هام خاصة بعد المثبت الثاني O.A ، حيث بقاءة أو آثاره لفترة طويلة يؤثر على النسيج وكذلك قد تتفاعل مكونات المثبت مع المادة التي تليها فينتج عن هذا التفاعل تغيرات في مكونات النسيج والخلية .

لذلك نحتاج إلى الغسيل بأحد الطرق التالية:

التجفيف dehydration

عملية نزع الماء من العينة

هي عملية التخلص من جزيئات الماء H2O من النسيج والخلايا الحيوانية والنباتية وذلك بواسطة احد أنواع الكحولات فقط الميثانول والإيثانول أو بواسطة مادة الاسيتون بشرط التدرج بالتركيز من الأقل للأعلى وهذا مهم من اجل تقبل النسيج للخطوة اللاحقة للمادة ذات الكثافة العالية المتصلبة وحسب الجدول التالي كلما زاد وقت تعرض العينة لمادة نزع الماء كلما زادت الصلابة وكلما قلت مدة نزع الماء كلما زادت سلبية الانكماش

هناك بعض الاحتياطات الواجب أخذه عند تحضير العينات بالمجهر الإلكتروني

حجم العينة

أن لا تكون كبيرة

زمن أطول في التثبيت

صعوبة نزع السوائل

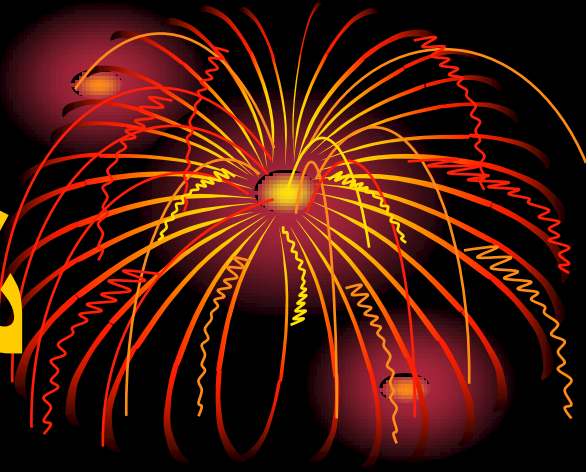
التثبيت

لابد أن تتم التثبيت مباشرة بعد تنظيفها

تنظيف العينة

وذلك بغمرها في المحاليل فسيولوجية مناسبة

شكرا جزيلا للاصغائكم



الدكتور كمال بنيامين أيشو

تقنية الدراسات السيتولوجية

أعداد

أ.م. د. كمال بنيامين أيشو

قسم البستنة / كلية الزراعة والغابات

٢٠٢١ / ٢٠٢٢

تقنية الدراسات السيتولوجية

تعد الأنسجة المرستيمية الممثلة في القمم النامية للجذور وكذلك براعم الأوراق والخلايا البوغية الأمية المذكرة Microsporocyies في نبات الذرة والشعير والحنطة وأيضا البراعم الزهرية في نباتات ذوات الفلقتين من أفضل المواد الأساسية لدراسة الانقسام الميوزي ، وتستخدم طريقة الطلاء Smearing method في تحضير الشرائح اللازمة لذلك ، وهنا نحاول إعطاء فكرة شافية بعض الشئ عن أسلوب وطريقة الطلاء والتي تعد من الطرق الشائعة في التقنية السيتولوجية والوراثي وكذلك سهولة القيام بها ومن هذه الطرق

أولا: القتل والتثبيت Killing and fixation

تعد عمليتي القتل والتثبيت للعينات والتي تستعمل في تهيئة وتحضير مؤقتة او دائمية عمليتين مهمتين وكل منها تختلف عن الأخرى لكنهما يجريان بواسطة محلول واحد يتكون من خليط من محاليل كيميائية ذات التاثيرات المختلف يقصد بعملية القتل Killing الإنهاء المفاجئ والدائم للحياة وهذا المصطلح يشمل الكائن الحي بأكمله وأيضا الخلايا الفردية التي يتكون منها الكائن الحي او النسيج Tissue ويعقب عملية القتل عملية التثبيت Fixation ، لان الدلائل المسببة للقتل تتحلل انسجة الكائن أسرع من دلائل التثبيت

أما عملية التثبيت Fixation يقصد بها الحالة التي تحفظ فيها الأنسجة بعد عملية القتل ، وذلك قدر الإمكان لجميع محتويات الخلايا وتركيبها كما كانت عليه قبل القتل ، وهذه العملية لازمة بغية توضيح التراكيب المختلفة للخلية والتي قد يصعب مشاهدتها أو التي لا تظهر على الإطلاق في حالة الحية للخلية أدناه المحاليل المستخدمة لذلك

١- محلول فارمر Farmer's fluid

يتكون من ٢ جزء من كحول الاثيلي مطلق أو ٩٥%
١ جزء من حامض ألخليك الثلجي أو حامض البوبيونيك Propionic acid

ويفضل عدم الخلط بين الكحول وحامض ألخليك الثلجي إلا قبل القتل والتثبيت مباشرة وذلك للحصول على احسن النتائج وغالبا ما يطلق على هذا المحلول (٣:١)

٢- محلول كارنوى Carnoy's fluids

يتكون هذا المحلول من

أ	ب
٦ أجزاء من كحول الاثيلي المطلق أو ٩٥%	٦ أجزاء من كحول الاثيلي المطلق أو ٩٥%
٣ أجزاء من كلوروفورم	١ أجزاء من كلوروفورم
١ جزء من حامض خليك الثلجي أو حامض البروبيونيك	
٢ جزء من حامض خليك الثلجي أو حامض البروبيونيك	

ثانيا : الصبغات Stains

- تستخدم الصبغات التالية بعد الخطوة السابقة

صبغة الكارمن Cochineal

عبارة عن صبغة لونها احمر فاتح يتم الحصول عليها من الجسم الجاف لأنثى الحشرة القشرية كوشنيل واستخلاص المادة الملونة منها وهي عبارة عن إضافة مادة الشب إلى مادة الكوشينيل

تحضر هذه بالخطوات التالية

إذابة واحد غرام من مسحوق الكارمن في حوالي ٢٠٠ مل لـ ٤٥% من حامض الخليك الثلجي المغلي

الاستمرار في الغلي لمدة ١-٢ دقيقة أو إلى أن يتحول لون المحلول فجأة إلى اللون الداكن

يجب استبعاد اللهب قبل إضافة مسحوق الكارمن إلى الحامض وإلا انسكب المحلول من شدة الغليان

بعدها تبرد الصبغة وترشح وتوضع في زجاجات بنية اللون وتعرف هذه الصبغة المذابة في حامض الخليك باسم اسيتو كارمن Aceto-carmine أما المذابة في البروبيونيك تسمى بروبيونوكارمن Propiono-carmine

صبغة الاورسين Orcein dye

يفضل الكثير من العاملين في مجال السايتولوجي استخدام هذه الصبغة بدلا من الكارمن وذلك في دراسة كروموسومات الغدد اللعابية لذبابة الدروسوفلا أو الحشرات ذات الجناحين وفي الكروموسومات الصغيرة

تحضير الصبغة

يذاب ٢,٢ غرام من مسحوق الاورسين في ١٠٠ مل من حامض الخليك الثلجي أو بروبيونيك يغلي ببطء

يبرد ويحفظ في زجاجة بنية اللون

عند الاستعمال يخفف المحلول إلى التركيز ٤٥% ثم يرشح بعد التجفيف

ثالثا: تحضير الانقسام الميتوزي في القمم النامية للجذور

تجرى دراسة الانقسام الميتوزي على كروموسومات البصل *Allium cepa* حيث أن n=7 ، وكذلك لوصوح كروموسومات الباقلاء *Vicia faba* n=7 ففي حالة البصل عندما يكون طول الجذر ١,٥ سم ، أما في الباقلاء فان الجذور تكون عرضية ويصل طولها إلى ١,٥ سم ولا تستخدم الجذور الأولية لقلة الانقسامات الميتوزية بها وهناك طريقتان لذلك

أ)- الطريقة الأولى

١- تقطع الجذور بواسطة ملقط وتوضع في أنبوبة تحتوي علي محلول القتل والتثبيت (فارمن) تترك الجذور فيه لمدة من ٦-١٢ ساعة (قد يكون الوقت اللازم للقتل والتثبيت لبعض المواد قل من ذلك بكثير)

٢- تغسل الجذور المثبتة في كحول اثيلي ٧٠% مستخدما تغيير مرتين ثم تحفظ الجذور في الثلاجة في هذا التركيز من المحلول لحين الاستخدام

٣- عند الاستعمال تؤخذ العينة من الثلاجة وتترك في أنبوبتها حتى يأخذ الكحول درجة حرارة الغرفه

٤- تنقل الجذور إلى أنبوبة تحتوي على جزء من كحول ٩٥% إلى جزء حامض كلوروديك معياري لمدة دقيقة

٥- حامض الكلوروديك يسبب رخاوة الأنسجة حيث انه يذيب الجدر الخلوية لذلك من الواجب تصليب العينة بعض الشئ ، فبذلك توضع العينة ثانية في محلول القتل والتثبيت الطازج أو محلول كارنوي (ب) لمدة خمسة دقائق

٦- تنقل العينة إلى نقطة من صبغة الكارمن على شريحة ميكروسكوبية نظيفة

٧- بواسطة موس نظيف أو مشرط يقطع الجزء المرستيمي ويكون داكن اللون ويتخلص من الجزء الباقي من الجذر

٨- يهرس الجزء المرستيمي في نقطة الصبغة بواسطة أبره أو بمقبض مشرط

٩- تغطى الشريحة بغطاء الشريحة ويجب أن رقيق

١٠- لا حظ التحضير تحت المكرسكوب مستخدما القوة الصغيرة أو العدسة القوية الجافة ، إذا لم تكن الأنسجة منفصلة عن بعضها ارفع الشريحة من تحت الميكرسكوب وبرفق اخبط على غطاء الشريحة بابرة غير مذببة أو بالسبابة

١١- تسخن الشريحة برفق على لهب كحولي ويلاحظ عدم غليان محلول الصبغة ثم بعد ذلك يضغط برفق على غطاء الشريحة تحت ورق ترشيح أو تشاف فيساعد على فرد الكروموسومات وجعل الخلايا في مستوى واحد تقريبا إذ التسخين يعمل على إزالة معظم التلوين من السايتوبلازم

١٢- إذا كانت الصبغة فاتحة نوعا ما فتترك الشريحة لمدة من الزمن قبل تغطية حواف غطاء الشريحة بشمع التحليق الذي يتكون من صهر جزاين من شمع البارافين والمستكة بالتساوي

تسمى هذه التحضيرات بالتحضيرات مؤقتة Temporary smears ن عادة لا يظهر المغزل واضحا في تحضيرات صبغة الكارمن لكنه قد يظهر بعض الشئ في العينات التي حفظت في محلول التثبيت لمدة طويلة وكذلك في الشرائح القديمة

ب) الطريقة الثاني

وجد أن صبغة الكارمن تقتل وتثبت وتصبغ بنفس الوقت فابسط طريقة تحضير هي وضع الجذور النامية في أنبوبة تحتوي على الصبغة وتغلى برفق لمدة بضع دقائق أو توضع في أنبوبة مغطاة بسدادة في فرن البارفين علي درجة حرارة ٦٠ درجة مئوية لمدة تتراوح من ١٥-٢٠ دقيقة ، بعدها توضع العينة المصبوغة على شريحة ميكروسكوبية نظيفة ويقطع الجزء المرستيمي من الجذور ويكون داكن الصبغة وتستبعد الأجزاء الأخرى الغير مرغوب بها ، وان اقتضت الحاجة تضاف نقطة صغيرة من الصبغة الطازجة

بعدها تتبع الخطوات السابقة الأنفة الذكر

رابعا: دراسة الشكل الظاهري للكروموسوم عن طريق المعاملة بالبرودة

أكتشف تأثير البرودة على الكروموسومات بواسطة Darlington و Lacour عند محاولتهما دراسة مناطق تجمع الحامض النووي Nucleic acid على الكروموسومات فوجدا أن المعاملة بدرجات الحرارة المنخفضة تمنع تكوين خيوط المغزل مما تسبب تشتت وانتشار الكروموسومات في السايتوبلازم وعدم ترتيبها في المحور الوسطي (خط الاستوائي) للخلية أثناء دور الوضع المتوسط ، وايضا تؤدي المعاملة بالبرودة على توضيح كروماتيدتي كل كروموسوم ووضوح منطقة الـ Centromere وضوحا تاما لعدم أخذها للصبغة ولدرجات الحرارة المنخفضة نفس التأثير الذي يسببه بعض المواد الكيميائية مثل الكولشيسين Colchicine و Para di chloro –bensen وتستخدم طريقة المعاملة بالبرودة في الكثير من الدراسات لعدد الكروموسومات ولبعض الأنواع صغيرة الكروموسومات ، فقد ذكر Myers و Hill (١٩٤٥) عند دراستهما لكروموسومات بعض حشائش المراعي ، أن معاملة القمم النامية للجذور بواسطة الكولشيسين والقتل والتثبيت بمحلول كارنوي لم يساعدا على معرفة الكروموسومات ولكنهما اكتشفا أن النباتات التي عرضت لدرجات الحرارة المنخفضة قبل القتل والتثبيت واصبح من السهل تحديد الكروموسومات فيها .

تحضير شرائح لقمم النامية لجذور البصل

ادناة خطوات تحضير الشرائح لدراسة الكروموسومات لجذور نبات البصل

تنمى رؤوس البصل في الماء في درجة حرارة الغرفة حتى يصل طول الجذور إلى ١,٥ سم

ينقل بعدها البصل إلى ثلاجة على درجة حرارة قد يحتوي الماء وعلى ٤درجة مئوية و محلول الكولشيسين ٠,٠٤ % ولفترة زمنية من ٢١-٣١ ساعة

بعد الفترة المقررة أو المعاملات المختلفة لتثبيت الجذور في محلول فارمن

تستخدم طريقة صبغة كارمن في تحضير الشرائح

تحضير شرائح الانقسام الميوزي

أولا : في نباتات ذوات الفلقتين

تجمع البراعم الزهرية بعد تكشفها من البراعم الخضرية ، فبذلك يجب تحديد العمر الذي يتم جمع فيه البراعم الزهرية لدراسة نوع معين ، فبذلك يجب على القائم بالعمل أو الباحث أن يمرن نفسه على اختيار الاحجام الملائمة من البراعم المراد جمعها ، إذ هناك بعض الانواع النباتية قد يكون حجم البرعم الزهري مساويا لحجم رأس الدبوس ، بغية الحصول على أو الطور الوسيط Metaphase أو الادوار التالية ، بينما في الانواع اخرى يكون هذا الحجم ملائما للأدوار المبكرة جدا ، حيث إذا لم تكن هناك خبرة سابقة فيجب على الباحث جمع براعم زهرية مختلفة الاحجام حتى يضمن الحصول على الدور المناسب ثم بعد ذلك ينتخب الحجم المناسب .

في معظم نباتات ذوات الفلقتين Dicots مثل الطماطة ، الباميا ، التفاح ، الخيار لا يحتاج الامر لعمليتي القتل والتثبيت بل توضع البراعم الزهرية مباشرة في نقطة من صبغة كارمن على الشريحة الزجاجية ،وبواسطة إبرتين تستخرج المتك من البرعم وتستبعد بقية الاجزاء ويجرى بعد ذلك عملية الطلاء Smearing، لكن في بعض الانواع الاخرى مثل القطن فانه يلزم القتل والتثبيت أولا وذلك من المفضل إجراء ذلك في محلول كارنوي لمدة تتراوح من ٢٢- ٢٦ ساعة في درجة حرارة الغرفة

تهرس المتوك في نقطة من صبغة كارمن وتلاحظ بعد ذلك تحت الميكرسكوب باستخدام القوة الضعيفة لمعرفة هل هذه المتوك تحتوي على الاطوار الانقسام المرغوبة فيها ، فاذا كان ذلك تزال بقايا المتك اما إذا لم يكن ذلك مرغوب فيه فتمسح الشريحة بقطعة من القماش النظيف ويؤخذ برعما اخر

إذا لوحظ على أن الموجود في الشريحة هو احد الأطوار الانقسام المرغوبة فبعد إزالة بقايا المتك يوضع غطاء الشريحة وتسخن الشريحة برفق فوق لهب كحولي (مصباح بنزن) مع تحنيب عليان الصبغة ثم يوضع بعد ذلك بين طبقات من ورق الترشيح او النشاف ويضغط برفق على غطاء الشريحة

ثانيا : في نباتات ذات الفلقة الواحدة

سنتكلم عن خطوات تحضير شرائح الانقسام الميوزي في نبات الذرة ونفس الخطوات تطبق على الحنطة أو نباتات نجيلية أخرى

١- تؤخذ عادة خلايا الأمية المذكرة Microsporocytes في نبات الذرة قبل ظهور قمة النورة المذكرة Tassel بمدة ٧-١٠ أيام ونفس الخطوة تطبق على الحنطة والشعير ، ويمكن تحديد السنبلة في الساق بالضغط عليه بالأصابع ، فإذا كانت المنطقة اسفنجية دلت على منطقة السنبلة ، فبذلك يعمل شق في الساق طوليا في نبات الذرة بواسطة موس بغية تعريض السنبلة وبواسطة ملقط تؤخذ بعض من افرع السنبلة وتوضع مباشرة في محلول القتل والتثبيت ، ثم يلف حول الساق في منطقة الشق شريط لاصق لمنع الساق من الانكسار أثناء النمو ، في نباتات الحنطة والشعير فان منطقة من الساق المحتوية على السنبلة فإنها تقص بمقص وتستخرج السنبلة باكملها من السلامية ثم توضع في محلول القتل والتثبيت .

يستخدم في نبات الذرة محلول فارمن بتركيز كحول ٩٥% .

أما غفي الحنطة والشعير فمن المفضل استخدام محلول كارنوي (ب)

تترك العينة في محلول القتل والتثبيت لمدة ١٢-٢٤ ساعة وفي درجة حرارة الغرفة ولا تزيد هذه المدة عن ٣٦ ساعة ، بعدها تنقل إلى محلول كحول بتركيز ٧٠% ، ثم تغسل مرتين وتحفظ في الثلاجة في تركيز هذا المحلول

في النباتات النجيلية ، ذات السنبلات الكبيرة المتقدمة في العمر والتي هي في وسط السنبلة وتتدرج السنيبلات إلى الصغر في العمر مبتدئة من هذه النقطة نحو قمة أو قاعدة السنبلة ، كما يمكن الحصول على هذه الأدوار مسلسلة ومنتظمة من السنيبلات الصغيرة إلى الكبيرة في العمر

كما من السهل في الحنطة والشعير تحديد طول السنبلة الملائمة لدراسة الانقسام الميوزي فيبلغ طولها من ١ – ١,٥ سم ، أما في نبات الذرة إذ بوجد في كل سنيبلة زهرتان كل منها تحتوي على ثلاث متوك ، احد هاتين الزهرتين اكبر في العمر من الأخرى ، فالزهرة الأكبر عمراً تسمى الزهرة الأولية Primary flower إذ يكون المتك Anther كبير .

تحضير الشريحة

توضع العينة في طبق Petri dish ثم يضاف إليها محلول القتل والتثبيت أو كحول بتركيز ٧٠% لمنع الجفاف ، يفضل وضع قطعة سوداء أسفل البتري دش لسهولة رؤية المتوك ، ثم يستخرج متك واحد من الزهرة ثم يوضع على نقطة من صبغة كارمن على الشريحة الميكروسكوبية نظيفة ، بعدها يقطع المتك عرضيا إلى نصفين بواسطة إبرتين ثم بهدوء وعناية تدفع الخلايا الموجودة في كل نصف خلال الفتحة بواسطة الضغط بإبرة على الطرف المسدود من نصف المتك ، كما يجب تجنب عملية الهرس أو الضغط الشديد بغية عدم تكسر جدر الخلايا لأنها رقيقة جدا ، كما يجب أن تكون نقطة الصبغة المضافة صغيرة بحيث يمكن وضع غطاء الشريحة عليها (حجم ٧/٨ انج) ، نجد أن المحلول يكفي تقريبا لملئ حواف غطاء الشريحة ، كما يجب تسخين تحضير الشريحة برفق فوق لهب كحولي لإزالة الصبغة من السايتوبلازم وتوضيح التباين بينه وبين الكروموسومات

شكرا لاصغائكم

الانحراف المعياري

ومربع كاي X^2

اعداد

أ.م.د كمال بنيامين ايشو

كلية الزراعة والغابات

قسم البستنة وهندسة الحدائق

جامعة الموصل

٢٠٢١ / ٢٠٢٢

يقصد به بأنه انحراف القيم العينة عن المعدل ، ويمكن حسابه من المعادلة التالية

الانحراف المعياري = ± $\frac{١}{\text{حجم العينة – ١}}$ مجموع (قيمة العينة – المعدل)٢

$$s = \pm \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum (x - \bar{x})^2}$$

حيث أن s = الانحراف المعياري N = حجم العينة ($\bar{x}$) = معدل العينة

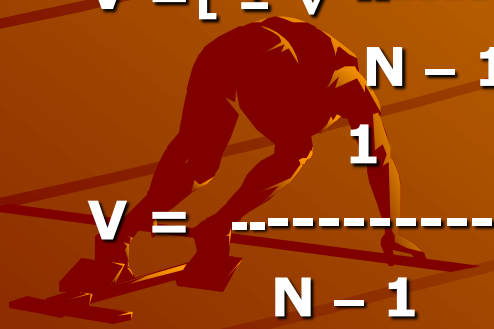
كما إن سبب تربيع الفروقات بين قيم العينة والمعدل يعود للتخلص من القيم السالبة التي تظهر عندما تكون مجموع من القيم اقل من المعدل مما يؤدي إلى حذف احدهما الآخر ،، ومما يجب ذكره إن الانحراف العينة عن المعدل (الانحراف المعياري) قد يكون موجبا أو سالبا أي أنها قد تزيد أو تقل عن المعدل وبغية حساب الانحراف المعياري يجب عمل الجدول الآتي

x	$(x - \bar{x})$	$(x - \bar{x})2$
X1	$(x1 - \bar{x}) = y1$	$(y1)^2$
X2	$(x2 - \bar{x}) = y2$	$(y2)^2$
X3	$(x3 - \bar{x}) = y3$	$(y3)^2$
X4	$(x4 - \bar{x}) = y\ 4$	$(y4)^2$
X5	$(x5 - \bar{x}) = y5$	$(y5)^2$
X6	$(x6 - \bar{x}) = y6$	$(y6)^2$
xn	$(xn - \bar{x}) = yn$	$(yn)^2$
$\sum x$	$\sum (x - \bar{x}) = zero$	
$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$		$\sum (x - \bar{x})^2$ أو $\sum (x-n)^2$

إن هذا الحد الأخير ($\Sigma (x - \bar{x})^2$ أو ($\Sigma (y \rightarrow n)^2$) في الجدول هو الذي نستخدمه لحساب الانحراف المعياري ، وان تربيع الانحراف المعياري ينتج عنه ما يسمى (الاختلاف Variance) ويرمز له بـــ V أي أن $V = S^2$

$$V = \left[\pm \sqrt{\frac{1}{N-1}} \; \Sigma (x - \bar{x})^2 \right]$$

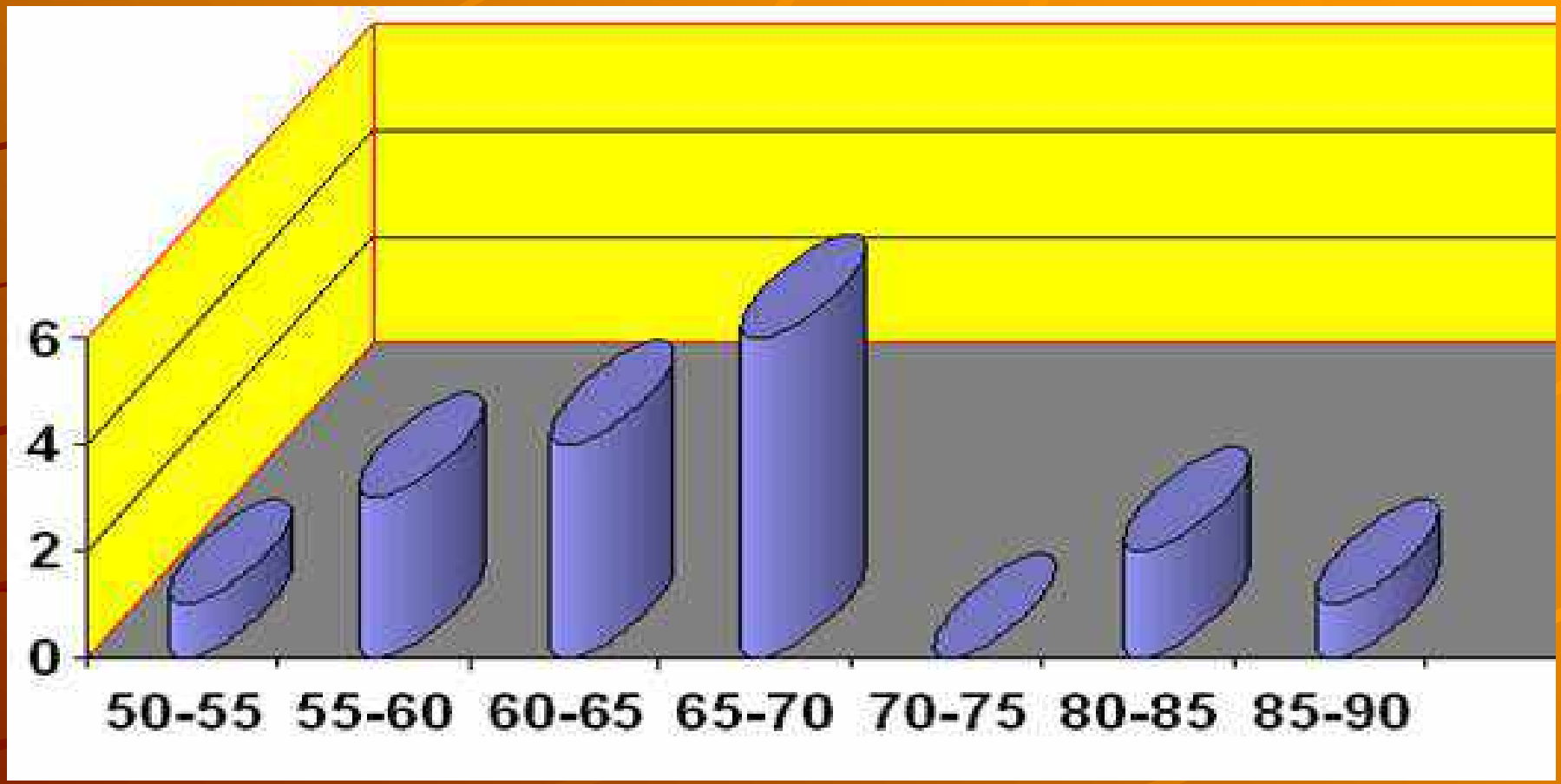
$$V = \frac{1}{N-1} \; \Sigma (x - \bar{x})^2$$



رسم المنحنى التكراري Histogram

يقصد بالمنحنى التكراري (المدرج التكراري) هو تمثيل البيانات التي تم الحصول عليها وتحويلها من أرقام إلى صورة تسهل ملاحظتها وبالتالي ملاحظة الفروقات بين أفرادها ، وبغية رسم المدرج التكراري يجب أولا: تقسيم البيانات المتوفرة إلى فئات تشمل كل منها مدى معين من الحجم ، فلو نأخذ طول الإفراد كما في الجدول التالي :

الطول(سم)	العدد (التكرار)	
55-50	1	1
60-55	111	3
65-60	1111	4
70-65	111111	6
75-70	1	1
80-75	صفر	صفر
85-80	11	2
90-85	1	1
المجموع	18	18


6
4
2
0
50-55
55-60
60-65
65-70
70-75
80-85
85-90

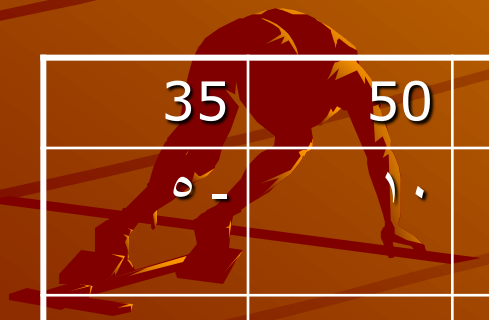
مثال :

كان عدد القرنات لهجن الفاصوليا هي كالآتي

(٣٥ ،٥٥، ٦٠، ٢٢، ١٩، ٤٤، ٥٠، ٣٥) اوجد كل من ، المتوسط العام ، والانحراف القيم عن المتوسط ، وارسم المنحني التكراري ، والانحراف المعياري

الحل :

$$\text{المتوسط العام} = \frac{(٣٥ + ٥٥ + ٦٠ + ٢٢ + ١٩ + ٤٤ + ٥٠ + ٣٥)}{٨} = \frac{٣٢٠}{٨} = ٤٠$$



	35	55	60	22	19	44	50	35
انحراف القيم عن المتوسط	- ٥	١٥	٢٠	- ١٨	- ٢١	٤	١٠	- ٥
المتوسط العام	٤٠							

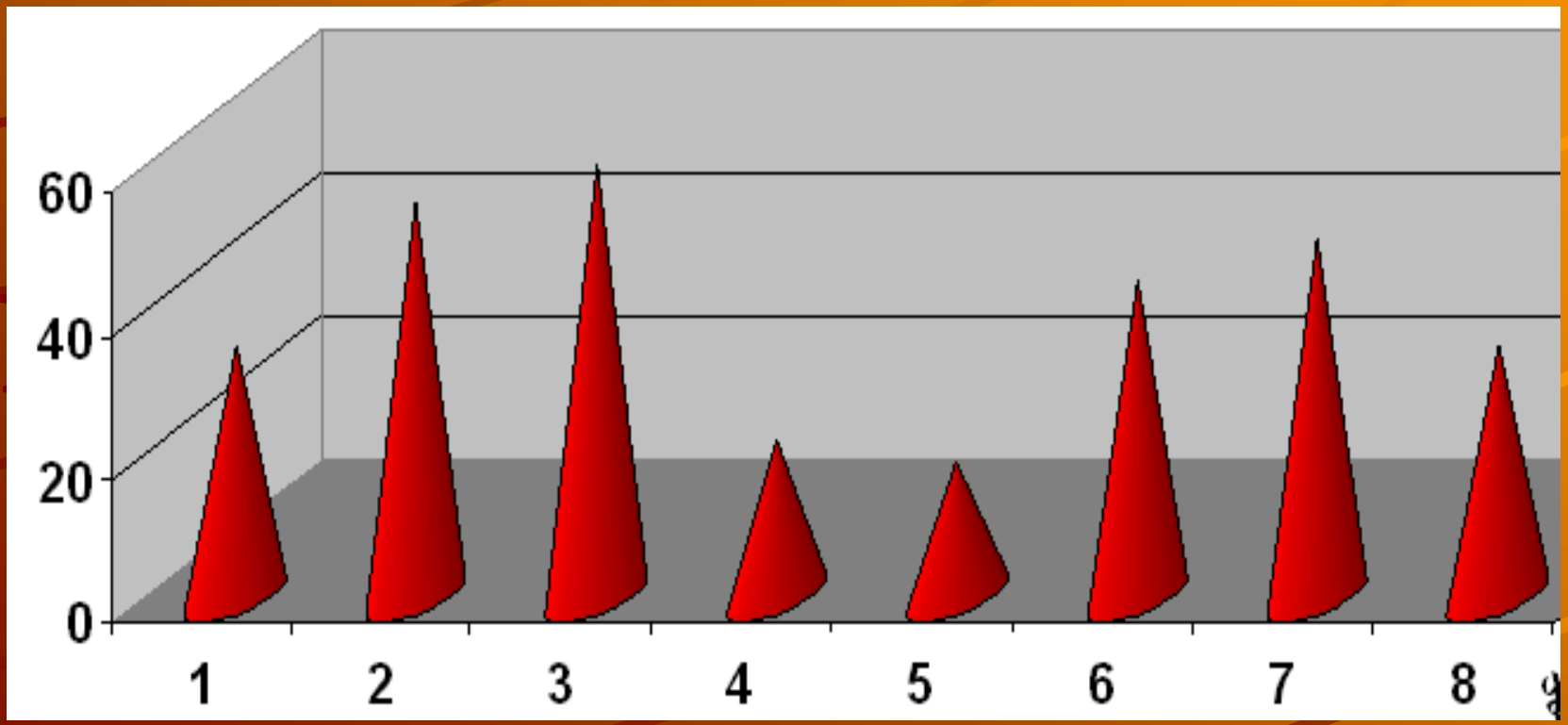
الانحراف المعياري

x	x	$(x - \bar{x})$	$(x - \bar{x})^2$	
X1	٣٥	(٣٥- ٤٠) = - ٥	(- ٥)^2 = ٢٥	
X2	٥٥	(٥٥ - ٤٠) = ١٥	(١٥)^2 = ٢٢٥	
X3	٦٠	(٦٠ - ٤٠) = ٢٠	(٢٠)^2 = ٤٠٠	
X4	٢٢	(٢٢- ٤٠) = - ١٨	(- ١٨)^2 = ٣٢٤	
X5	١٩	(١٩- ٤٠) = -٢١	(- ٢١)^2 = ٤٤١	
X6	٤٤	(٤٤ - ٤٠) = ٤	(٤)^2 = ١٦	
X7	٥٠	(٥٠ - ٤٠) = ١٠	(١٠)^2 = ١٠٠	
x8	٣٥	(٣٥ - ٤٠) = -٥	(- ٥)^2 = ٢٥	
Σx المجموع	٣٢٠			
$\bar{x}$ المتوسط	٤٠			
$\bar{x} = \frac{\Sigma x}{n}$	$\frac{٣٢٠}{٨} = ٤٠$		$\Sigma (x - \bar{x})^2 = 1556$	

$$V = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum (x - x\text{-})^2}$$

$$V = \sqrt{\frac{1}{8-1}}(1556) = \sqrt{\frac{1}{7}}(1556) =$$

المنحى التكراري



مربع ((كاي)) Chi – Sguare

يستخدم هذا الاختبار لإثبات صحة الفرضيات التي خرج منها الباحث لظاهرة معينة وتزداد دقة هذا الاختبار كلما كانت عدد الملاحظات ((المشاهدات)) كبيرة ويتم حسابه وفقا للمعادلة التالية :

$$\text{مربع كاي } (X^2) = \frac{\text{مجموع قيم (المشاهدة ــ المتوقعة)}^2}{\text{المتوقعة}}$$

وبغية توضيح طريقة مربع ((كاي)) ندرس المثال الذي هجن فيه مندل نبات طويل نقي (TT) مع نبات قصير (tt) ، فبذلك يكون أفراد الجيل الأول (F1) هو (Tt) وعند تهجين (تلقيح) أفراد الجيل الأول (F1) مع بعضها أي(ذاتي) ، فبذلك اعتمادا على قانون مندل الأول (قانون الانعزال) ، فان أفراد الجيل الثاني (F2) يتكون من نباتات طويلة (TT , Tt) ونباتات قصيرة (tt) بنسبة ٣ : ١

فقد لاحظ مندل وجود ٧٨٧ نبات طويل و ٢٧٧ نبات قصير ، فبذلك يكون مربع كاي موضحا في الجدول الأتي

العملية	نباتات طويلة	نباتات قصيرة	المجموع
المشاهدة	787	277	1064
المتوقعة	798 = 4/3 x 1064	266 = 4/1 x 1064	1064
المشاهدة ـ المتوقعة	11 ـ = 798 - 787	11 = 266 ـ 277	
$\frac{(\text{المشاهدة ـ المتوقعة})^2}{\text{المتوقعة}}$	$0.15 = \frac{(11-)^2}{798}$	$0.44 = \frac{(11)^2}{266}$	

إذن مربع كاي (x)٢ = ٠.١٥ + ٠.٤٤ = ٠.٥٩

هل تتفق هذه القيم مع الفرضية ؟ وهل يعود السبب لفرق بين القيم المشاهدة والمتوقعة للصدفة فقط ؟

للإجابة على ذلك نستعمل مفهومين هما

١- عدد درجات الحرية (the number of degree of freedom) هنا هذه تساوي = ١ ،

وذلك لان لدينا مجموعتين فقط (٢ــ ١= ١)

٢- معرفة مستوى المعنوية the level of significance

ومستوى المعنوية لمربع كاي والأكثر استخداما هو ((٠.٠٥ أو ٠.٠١ أو ٠.٠٠١) هنا نلاحظ إن قيم مربع كاي هي (عند مستوى ٠.٠٥ = ٣.٨٤ ، وعند مستوى ٠.٠١ = ٦.٦٣ ، وعند مستوى ٠.٠٠١ = ١٠.٨٣)

فبذلك على هذا الأساس فتقبل النظرية الفرضية تحت مستوى المعنوية (٠.٠٥ و ٠.٠١ ، ٠.٠٠١) وترفض نظرية البديلة ،، وذلك لان قيم المحسوبة لمربع كاي اصغر من القيمة الجدولية لها .

مثال :

عند تلقيح نبات البزاليا ذي البذور الخضراء مع بذور صفراء ولقد حصلنا على النتائج التالية ((٥٦ بذرة خضراء و ٤٤ بذرة صفراء))

الحل في الجدول التالي

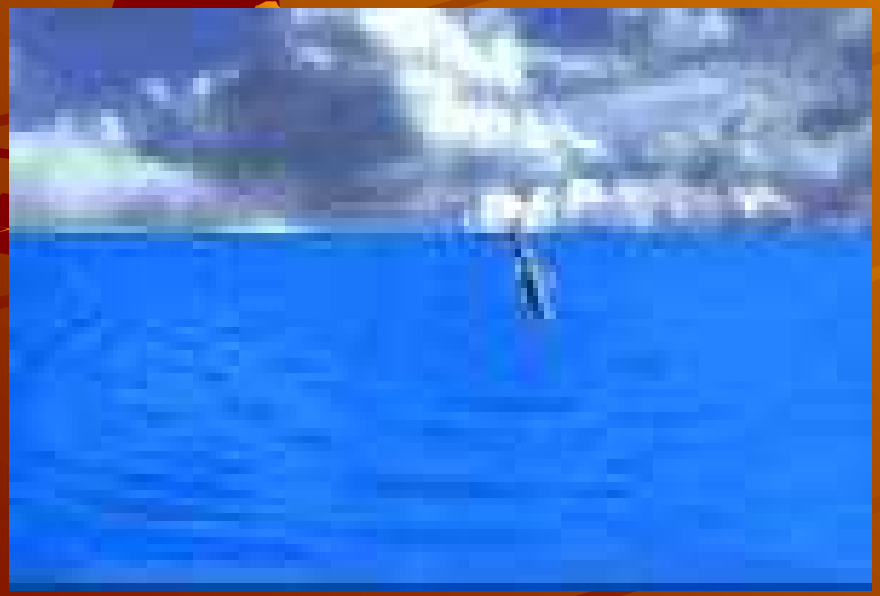
العملية	بذور خضراء	بذور صفراء	المجموع
الأعداد المشاهدة	56	44	100
النسبة المندلية	2/1	2/1	
الأعداد المتوقعة	50 = 100 x 2/1	50 = 100 x 2/1	100
المشاهدة ـ المتوقعة	6 = 50 ـ 56	6- = 50 - 44	
مربع كاي	$\frac{2\ (6)}{50} = 0.72$	$\frac{2(6-)}{50} = 0.72$	

إذن مربع كاي = ٠.٧٢ + ٠.٧٢ = ١.٤٤

إذن قيمة مربع كاي المحسوبة = ١.٤٤

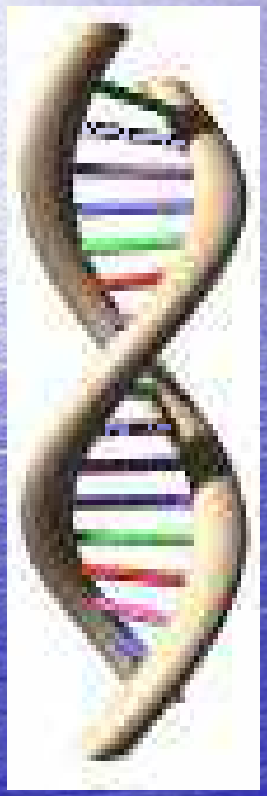
أما قيمة مربع كاي المستخرجة من الجدول الخاص به لدرجات الحرية وعند مستوى ٠.٠٥= ٣.٨٤ وعند مستوى ٠.٠١ = ٦.٦٣ ((وعند نفس درجات الحرية وهي (٢ـ ١ = ١)

فبذلك على هذا الأساس فتقبل النظرية الفرضية تحت مستوى المعنوية ٠.٠٥ و ٠.٠١ ، وترفض نظرية البديلة ،، وذلك لان قيم المحسوبة لمربع كاي اصغر من القيمة الجدولية لها .



شكرا
لاصغائكم

Chromosomes الكروموسومات



By

Ass. Prof Dr. Kamal Benyamin Esho

College of Agric. And Forestry

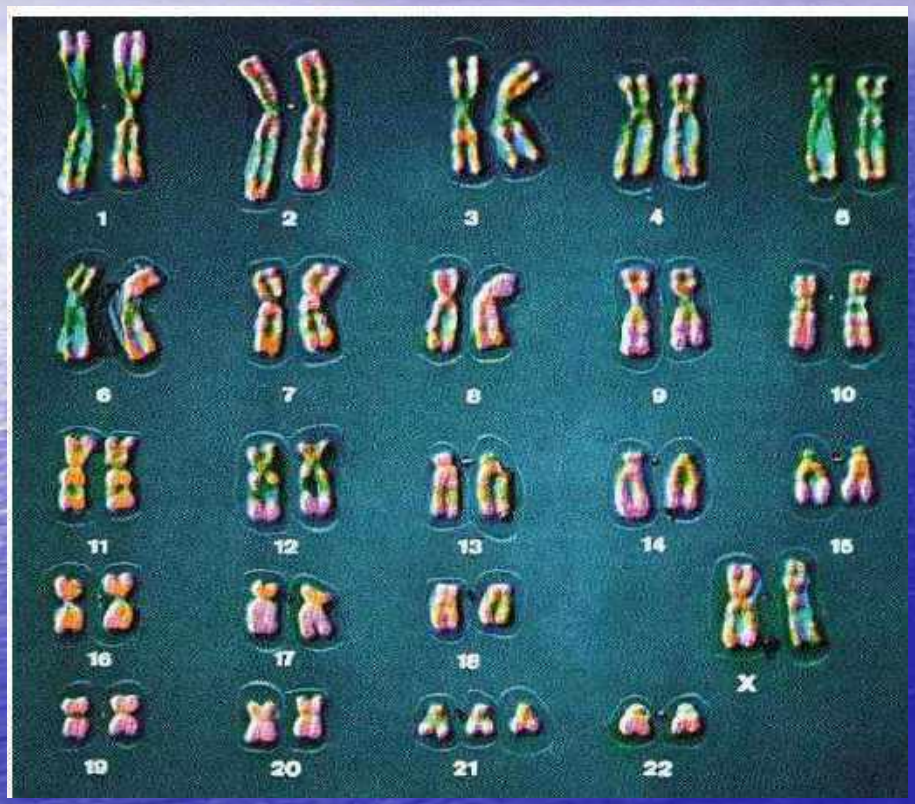
Horticulture and Landscape Design

Mosul University

٢٠٢١ / ٢٠٢٢

kamalesho@rocketmail.com

الكروموسوم



كلمة الكروموسوم مشتقة من تعبير يوناني يعني الجسم الملون وذلك لكون الكروموسومات تتلون بشكل أغمق من مكونات الخلية الأخرى عند معاملتها بصبغة كيماوية معينة ، الكروموسومات تحمل المعلومات ذات العلاقة بوظائف وتطور الخلية من خلال الجينات واليلاتها ، فان كل خلية في النبات تحمل في نواتها مجموعة محددة من الكروموسومات وان عدد الكروموسومات في الخلية الواحدة يكون ثابتا عادة لكل نوع كما في الجدول التالي الذي يعطي أمثلة للأعداد الكروموسومية لبعض النباتات البستنية .

كما هو الحال مع انقسام الخلية النباتية فان الكروموسومات تنقسم أيضا بواسطة العملية المعروفة بالانقسام الاعتيادي **Mitosis** حيث تحوي كل خلية جديدة على نفس عدد الكروموسومات في خلية الأم .

هذا ويوجد هناك انقسام أخر من انقسام الخلية يعرف بالانقسام الاختزالي **Meiosis** الذي يحدث أثناء تكوين الخلايا الجنسية وتكون نتيجة اختزال العدد الأصلي من الكروموسومات إلى النصف ، كل خلية جسمية **Somatic cell** في النبات تحتوي على مجموعة واحدة من الكروموسومات نصفها تأتي من الأم والنصف الأخر عن طريق الأب وتبقى محافظة على ذلك طيلة فترة حياة النبات .

شكل الكروموسوم
The chromosomes type

يختلف شكل الكروموسوم أثناء انقسام الخلية ويرجع شكل الكروموسوم إلى نوع Kinetochre أو الـ Centromere أثناء الطور Metaphase لا يكون الـ Centromere واضح المعالم فبذلك عندما يكون الاختناق (هذا الاختناق يستدل عليه بأنه يكون على الـ Primary constriction قد يكون هذا الاختناق في وسط الكروموسوم أو في نهايته أو قبل نهاية الكروموسوم ، هذا الاختناق له تأثير كبير على شكل الكروموسوم أثناء طور الـ Anaphase فعندما يكون الاختناق

١ - وسط الكروموسوم فيكون شكل الكروموسوم (V) أثناء Anaphase

٢ - الاختناق قبل نهاية الكروموسوم يكون شكل الكروموسوم (ل)

٣ - الاختناق في نهاية الكروموسوم يكون شكل الكروموسوم (عصوي)

حجم الكروموسوم

يختلف حجم الكروموسوم حسب الكائن الحي ، فبذلك يعتقد أن النباتات ذات الفلقة الواحدة Monocotes ذات كروموسومات أكبر حجما من النباتات ذات الفلقتين Dicotes فبذلك

١ - في الانسان حجم الكروموسوم بين ٤- ٦ ميكرون

٢ - في البصل بين ١٠ – ٢٠ ميكرون

٣ - ذبابة الدروسوفيلا حجمه هو ٣,٥ ميكرون

٤ - نبات الذرة الصفراء حجم الكروموسوم ٨-١٠ ميكرون

جدول يبين عدد الكروموسومات حسب أنواع المحاصيل البستنية

اسم المحصول	عدد الكروموسومات 2N أو 2X	اسم المحصول	عدد الكروموسومات 2N أو 2X	اسم المحصول	عدد الكروموسومات 2N أو 2X
الباقلاء	١٢	اللهانة	٢٠	الرقي	٢٢
الفاصوليا	٢٢	القرنبيط	١٨	خيار القثاء	
البزاليا	١٤	بروسل سبروات		الخيار	
اللوبياء	٢٢	الشلغم	٢٠	السبانخ	١٢، ٢٤
فاصوليا ليما	٢٢	الشوندر		الهليون	٢٠
فول الصويا	٤٠	الكلم	١٨	السلق	
الباميا	١٣٢، ٧٢	الكرفس	٢٢	التفاح	٣٤
الخس	١٨ ، ٣٦	الجزر	١٨	الزيتون	
الطماطة	١٢ ، ٢٤ ، ٤٨	البصل	١٦ ، ٣٢	الموز	
الفلفل	٢٤، ٤٨	الثوم	١٦	العنب	٣٨
البطاطا	٢٤ ، ٤٨	البقدونس		التين الهندي	٢٦
الباذنجان	٢٤ ، ٤٨	كراث		الكستناء	٣٤
المشمش		قرع الكوسة	١٤، ٤٠	النخيل	٣٦
الخوخ	١٦	قرع العسلي	٢٤ ، ٤٠	الاجاص	١٦
الحمضيات	١٨ ، ٣٦	قرع العاكي	٢٢	المانجو	٤٠
الفجل	١٨ ، ٣٦	البطيخ	٢٤ ، ٤٨	الشليك	٥٦
الطرطوفة	١٠٢	الجوافة	٢٢	الخردل الاسود	١٦
الكرز الحلو	١٦، ٣٢	الرمان	١٦	الهندباء	١٨
البطاطا الحلوة	٩٠	الاناناس	٥٠، ١٠٠	البكان	