القسم الأول

تجارب على أجنة الضفادع
(البرمائيات)

Expriments on Frog Embryos (Amphibia)

obeikandl.com

obeikandl.com

العملي الثاني

حث إنتاج البيض ونمو الأجنة في الضفدعة[٢]
Induced Ovulation and Development of Frog Embrys

الهدف

يهدف هذا الدرس إلى تعلم طريقة حث إنتاج بويضات وأجنة البرمائيات وتنميتها تجريبيا في المعمل، ويمكن إنتاج أجنة الضفادع في المعمل عن طريق تنشيط المناسل لديها بواسطة الحقن بالهرمونات التناسلية التجارية جاهزة الصنع أو يمكن استخلاصها من الغدة النخامية للضفادع.

ولنجاح مثل هذه التجارب على الضفدعة لابد أن تكون خلال موسم التزاوج أي بداية فصل الربيع (بداية شهر فبراير إلى مارس)؛ لأن الضفدعة كما هو معلوم تكون خلال هذا الموسم قد خرجت من البيات الشتوي، كما لا تكون في موسم الصيف؛ لأنها تكون قد انتهت فترة التكاثر.

المواد والأدوات المستخدمة

١- عدد من الضفادع البالغة ذكورا وإناثا (٤ ذكور و٤ إناث).

٢- هرمونات تناسلية لتنشيط المناسل الهرمون المحفز لنمو الحويصلات (FSH Follicle stimulating hormone) وهرمون الجسم الأصفر(التبويض) أو الهرمون المشيمي التناسلي أو البشري (Luteinizing hormone LH. or Human chorionic gonadotrophin hCG).[٢]

---

(٢) الحميدي وآخرون ١٤١٨هـ.

obeikandl.com

٣- ثلاثة أحواض للضفادع على الأقل قطر كل منها ٣٠ سم وبعمق ١٢ سم وذات أغطية.

٤- أحواض وأطباق صغيرة لتربية الأجنة واليرقات مزودة بالهواء.

٥- ماء بركة (من أحواض التربية للضفادع) أو يمكن تحضير البيئة المناسبة للتنمية كما هو موضح في التجربة.

ملاحظة للتفريق بين الذكر والأنثى في الضفادع

تتميز ذكور الضفادع عن الإناث بتضخم الإصبع الأول لكل من الطرفين الأماميين للذكور خلال فصل التزاوج وإصدارها للأصوات بشكل أقوى لجذب الإناث. كما أن في الأنثى يكون السطح البطني للرأس لونه أبيض أو رمادي أما في الذكر فيكون لونه أسود وذلك لوجود كيس الصوت تحت الجلد الذي يغطي الفك السفلي وهذا الكيس له فتحتان في الفم، ويدخل فيه الهواء فيمتلئ حينئذ يشبه البالونه. بالإضافة للصوت النقيق الذي يصدره الذكر لجذب الإناث إليه.

أولاً: حث إنتاج البيض في الضفدعة من جنس رانا RAna بواسطة الهرمونات التناسلية جاهزة الصنع أو التجارية[٣]

يمكن الحصول على البيض بكميات كبيرة في موسم التزاوج (الربيع)، وذلك عن طريق حقن الحيوانات البالغة بكميات صغيرة ١٠٠ وحدة من الهرمون المحفز لنمو الحويصلات بالمبيض (FSH) ثم بعد يومين أو أكثر(٤٨-٦٠ ساعة) تحقن بنفس الطريقة بهرمون التبويض المشيمي التناسلي أو البشري (hCG or LH).

خطوات العمل

١- استخرج الضفادع من أماكن تربيتها واحفظها في وعاء زجاجي مستدير قطره ٣٠ سم، ثم ضع فيه الماء حتي منتصفه تماما، ولمنع هروب الحيوانات من الحوض، يوضع لوح زجاجي مثقب ثقيل أو شبك من السلك مع ثقل لتغطية الوعاء.

---

(٣) الحميدي وآخرون ١٤١٨هـ.

٢- يجب وضع الوعاء في مكان مناسب ومطابق للمكان الذي وجدت فيه، كما يجب أن تكون درجة الحرارة مناسبة (٢٠-٢٥م°).

٣- بعد اختيار زوجين من الضفادع الذكور والإناث كبيرة الحجم نوعا ما ضعهما مباشرة في الوعاء الزجاجي وامنع عنهما الغذاء لمدة ٢٤ ساعة قبل عملية الحقن.

إذا تطلب الدرس العملي أكثر من زوج للحقن من أجل الحصول على كمية وافرة من البيض، فيمكن على أقل تقدير حقن ثلاثة أو أربعة أزواج.

٤- بعد انتهاء مدة المنع عن الغذاء (التجويع) وقبل عملية الحقن، يجب تغيير ماء الوعاء في الحال.

٥- للحصول على البيض، يجب حقن كل حيوان على حدة مرتين خلال ٢٤ ساعة، ففي المرة الأولى تعطى الأنثى ١٠٠ وحدة من الهرمون المنشط للمنسل(FSH) ويعطى الذكر ٥٠ وحدة من الهرمون نفسه. أما في المرة الثانية فيجب مضاعفة الجرعة بمعنى أن تعطي الأنثى ٢٠٠ وحدة والذكر ١٠٠ وحدة. هذه الكمية مناسبة للحيوانات ذات الحجم العادي، أما الحيوانات الكبيرة فتزاد الكمية بنسبة ٢٠٪ ثم إذا لم ينزل البيض بعد ٤٨ ساعة يمكن حقن الإناث فقط بهرمون السلي التناسلي بكمية ١٠٠ وحدة دولية لمرة واحدة. ويمكن توقع أن ينزل البيض بعد ٢٤ ساعة.

٦- يجب إذابة الهرمون في ماء مقطر ومعقم.كمية الماء المستخدم يجب حسابها لحقن كل حيوان على حدة ٠,٥ مل، ومزود بإبرة من الحجم ٢١ج (21G) طولها ١,٥ بوصة. ويتم حقن الهرمون في الفراغ اللمفي الظهري (Dorsal Lymphatic space) ويمكن إجراء ذلك على النحو التالي:

أ) أمسك الضفدعة باليد اليسرى بحيث يلتف الإبهام والأصابع الأربعة الأخرى حول الرجل اليسرى الخلفية وراحة اليد محيطة بجسمها، والغرض من ذلك هو إظهار الجزء العلوي من الرجل والمنطقة الجلدية الملاصقة لها التي تغطي الفراغ اللمفي الظهري (الشكل رقم ٢,١).

ب) ثبت السطح البطني للحيوان على قطعة القماش، ثم أمسك الطرف السفلي للرجل اليسرى باليد اليمنى بإحكام وثبتها جيدا باستعمال جزء من القماش نفسه.

ج) تأكد من أن راحة اليد اليسرى تغطي الجزء العلوي من جسم الحيوان ورأسه لمنعه من الهرب.

د) أدخل الإبرة تحت الجلد عند منتصف طول الفخذ مع محاولة تفادي العضلات في هذه المنطقة، ثم ادفع الإبرة إلى الأمام بلطف تحت سطح الجلد، واستمر حتى تصل إلى الفراغ اللمفي الظهري، أثناء ذلك يمكن مشاهدة تقدم الإبرة وتحديد موقع طرفها. يجب أن تخترق الإبرة الفراغ اللمفي بعمق ١سم وتكون دائما سطحية وبعيدة عن العمود الفقري، وعند الانتهاء من الحقن ضع الإصبع على مكان اختراق الإبرة ثم اسحبها ببطء شديد لمنع فقدان السوائل عند إزالتها. يظهر الحقن الجيد انتفاخا واحمرارا في منطقة المذرق بعد الجرعة الأولى وعندما يستجيب كل من الذكر والأنثى يمتطي الذكر الأنثى، ويمسك بها بطرفيه الأماميين، وبعد ساعات من الجرعة الثانية تضع الأنثى البيض في صباح اليوم التالي وفي الوقت نفسه يقذف عليه الذكر سائله المنوي.

تضع الأنثى الناضجة أكثر من ألف بيضة في المرة الأولى، إلا أن هذه الكمية تزداد إلى ٥٠٠٠ أو ٦٠٠٠ بيضة ويمكن حقن هذه الإناث مرة أخري بعد ٦ أسابيع ويستحسن تركها لمدة ثلاثة شهور قبل إنتاج البيض مرة أخرى. يجمع البيض بعد حوالي نصف ساعة من وضعه لتتم عملية الإخصاب كما يتم تغذية الأبوين. وعند جمع البيض يلاحظ أن الموضوع منه حديثا يلتصق بالزجاج، لذا فيجب نزعه بلطف بواسطة ملقط مدبب الطرفين (رقيق) وتوخي الحرص عند نقله حتى لايتلف. ويمكن إزالة البيض بواسطة ماصة لها فتحة واسعة لتلافي الضرر، ويلاحظ أن الأغشية الجيلاتينية المحيطة بالبيض شفافة بالقدر الذي يسمح من فحص البيض تحت المجهر التشريحي حيث يمكن رؤية أطوار الانقسام جيدا وذلك باستعمال إضاءة علوية تسلط عليها وخلفية سوداء (قطعة من الورق الأسود توضع على مسرح المجهر).

ويجب ملاحظة أن البيض غير المخصب والتالف ينتفخ ويصبح أبيض اللون ولذلك يجب إزالته ؛ لأن وجوده بأعداد كبيرة يفسد الماء ويدمر أحواض التربية نظرا لما ينمو عليه من كائنات دقيقة، ومما يجدر ذكره أنه يمكن حقن الهرمون في الجزء الجانبي للتجويف البطني، (الشكل رقم ٢,٢).

الشكل رقم (٢,١). صورة طريقة إمساك الضفدعة وحقنها في الفراغ اللمفي الظهري.

الشكل رقم (٢,٢). صورة توضح طريقة إمساك الضفدعة وحقنها في الجزء الجانبي للتجويف البطني.

ثانياً: تنمية أجنة البرمائيات ويرقاتها حتي عملية التحول (الشكل رقم ٢,٣)

من المعروف أن الأجنة المبكرة للبرمائيات بها كمية كبيرة من المح تمدها بالغذاء الضروري لعملية النمو والتطور. وطور أبو ذنيبة لكل من الذيليات واللاذيليات يستطيع العيش لعدة أيام بعد عملية الفقس ؛ نظرا لوجود المح مخزنا في الخلايا المحية الكبيرة الموجودة بقاع المعي المتوسط. ولكي تبقى الأجنة على قيد الحياة، خصوصا الأطوار المعدة لمواصلة النمو والتكوين، فلابد لها من توفر عدة عوامل هي: البيئة والتهوية والمكان والإضاءة والحرارة المناسبة.

أ) بيئة تنمية أجنة البرمائيات Culture Medium of Frog Embryo (٤)

تضع كل البرمائيات بيضها في الماء، وماء البركة هو الوسط المناسب المستخدم لتكاثر الضفادع، ولكن لا يمكن استعماله معمليا، وعند تحليله كيميائيا وجد أنه منخفض التوتر (Hypotonic) حتى الماء المقطر لا يمكن استخدامه بسبب ظاهرة الضغط الأسموزي غير المتوازن. أما ماء الصنبور، فإنه يحتوي على تركيز عالٍ من الكلور المسمم للأجنة، كما توجد به بعض الأيونات المعدنية، مثل الرصاص والنحاس والحديد، مما قد يؤثر على بقاء الأجنة. غير أنه عندما نرشح ماء الصنوبر بإمراره في خليط من الرمل والفحم الحجري ثم نترك الرشيح لعدة أيام مع تزويده بالنباتات المائية، فإنه في هذه الحالة يمكن استعماله لغرض التربية. ومن النباتات المستخدمة في ذلك الإيلوديا والنتيلا (Elodea and Nitella). ونظرا لأن مثل هذه النباتات تقوم بعملية التمثيل الضوئي، فإنها تساعد على زيادة كمية الأكسيجين في الماء (ويمكن بطريقة أخرى تهوية الحوض بواسطة أجهزة التهوية). وحتى تتطور الأجنة طبيعيا، فلابد من وجود عناصر الصوديوم والكالسيوم والبوتاسيوم بماء أحواض التربية.

ومن المحاليل التي تعتبر كبيئات تستخدم في التربية نذكر منها ما يأتي: (٤)

١ – محلول هولتفرتير القياسي Standard Holtfreter's solution

يعتبر هذا المحلول من أفضل الأوساط لتربية الأجنة، إذ تبلغ نسبة المحتوي الملحي فيه حوالي ٠,٣٨٥٪، وهو محلول منخفض التوتر، ولذلك لايصلح للأجنة الكبيرة ولكن متساوي التوتر منه (Isotonic) يصلح في حالة الأطوار المبكرة لأجنة اللاذيليات، ويمكن تحضير لتر واحد منه كالآتي:

---

(٤) Rugh (1962).

مكونات محلول هولتفرتير القياسي متساوي التركيز:

١- كلوريد الصوديوم ٣,٥ جم (NaCl 3.5g).

٢- كلوريد البوتاسيوم ٠,٠٥ جم (KCl 0.05g).

٣- كلوريد الكالسيوم ٠,١ جم ($CaCl_2$ 0.1g).

٤- بيكربونات الصوديوم ٠,٢ جم ($NaHCO_3$ (Burrer) 0.2g).

٥- ماء مقطر ١ لتر (Distilled water 1L).

وهناك محلول عالي التوتر (Hypertonic) من المحلول السابق، ولا يصلح في حالة الأجنة والأنسجة الجنينية، إلا أنه مناسب للأطوار الأكبر من البرمائيات، ويمكن تحضير لتر واحد منه كالتالي:

١- كلوريد الصوديوم ٦,٦٠ جم (NaCl 6.6g).

٢- كلوريد البوتاسيوم ٠,١٥ جم (KCl 0.15g).

٣- كلوريد الكالسيوم ٠,١٥ جم ($CaCl_2$ 0.15g).

٤- بيكربونات الصوديوم ٠,٣٠ جم ($NaHCO_3$ (Burrer) 0.30g).

٥- ماء مقطر ١ لتر (Distilled water 1L).

ويجب أن يكون الأس الهيدروجيني لهذه البيئة ٧,٨ (pH=7.8)، ويمكن المحافظة على الأس الهيدروجيني بإضافة كمية قليلة جدا من كربونات الصوديوم.

٢- محلول رنجر الأصلي Original Ringer's solution

ويمكن تحضير لتر واحد منه كالتالي:

١- كلوريد الصوديوم ٦,٥٠ جم (NaCl 6.50g).

٢- كلوريد البوتاسيوم ٠,١٤ جم (KCl 0.14g).

٣- كلوريد الكالسيوم ٠,١٢ جم ($CaCl_2$ 0.12g).

٤- بيكربونات الصوديوم ٠,٢٠ جم ($NaHCO_3$ (Burrer) 0.20g).

٥- فوسفات الصوديوم المائية ٠,٠١ جم (NaH_2PO_4 0.01g).

٦- سكر الجلوكوز ٢,٠٠ جم (Glucose 2.00g).

٥- ماء مقطر ١ لتر (Distilled water 1L).

obeikandl.com

ويراعى عند تحضير الوسط المستخدم لتربية الأجنة استعمال ماء مقطر في آنية زجاجية وشروط التعقيم.

تغذية اليرقات: ليس من الضروري تغذية أطوار أبو ذنيبة التي تكونت لها فتحة الفم لعدة أيام؛ لأن يرقات البرمائيات يكون لديها مخزون من المح الذي يهضم ثم يمتص مباشرة بواسطة الأنسجة الخاصة بها. والغذاء في حالة أجنة البرمائيات اللاذيلية (Anura) ليس ضروريا حتى طور الغطاء الخيشومي الكامل بالنسبة للجنس رانا (Rana). ومن المعروف أن معظم يرقات اللاذيليات تعتبر حيوانات عاشبة (Herbivorous)، الغذاء المناسب لها يتكون من أوراق نبات الخس أو السبانخ المغلية قليلا، ويجب غسل هذه النباتات جيدا بالماء، للتخلص من المواد السامة الملتصقة بها (مثل الرصاص الذي يدخل في تركيب بعض المبيدات الحشرية). كما أن غلي هذه النباتات مفضل حتى تصبح أنسجة الأوراق طرية خاصة بالنسبة للأطوار التي تكونت لها بعض الأسنان القرنية.

ولتجنب الأخطار الناتجة عن تراكم بقايا الغذاء والمواد البرازية وما بها من بكتريا، فإنه يجب تنظيف الأحواض يوميا للتخلص منها. ويمكن استخدام الغذاء النباتي هذا إلى مابعد التحول اليرقي (Metamorphosis). وفي المراحل الأخيرة من هذه العملية تتحول اليرقات المتحولة إلى متنوعة التغذية (Omnivorous)، ثم تتحول بصورة تدريجية إلى حيوانات لاحمة (Carnivorous).

وللحصول علي نتائج جيدة يوضع الغذاء مرتين في الأسبوع. كما يجب أن يكون عدد الحيوانات ١٠ لكل لتر واحد من البيئة حتى تنمو بصورة جيدة. عند نهاية التحول، تتوقف الحيوانات عن الغذاء وتصبح غير نشطة، وعندها يجب نقلها إلى ماء ضحل عمقه ٥ سم. وتتغذي صغار الضفادع علي بعض يرقات الحشرات لمدة ثلاثة شهور، بعدها تتحول تدريجيا إلى التغذي على القلب أو الكبد البقري المفروم (قطع صغيرة مكعبة ٥ ملم). وفي الأحوال العادية تصبح الحيوانات بالغة خلال مدة تتراوح بين سنة إلى ١٨ شهرا تقريبا.

ب) عامل المكان والتهوية Space and Aeration Factor (٥)

يؤدي الحيز دورا مهما في سرعة نمو الحيوانات، فكلما كان عدد اليرقات قليلا، زادت سرعة النمو. تحتاج البيضة الواحدة إلى ٢ مل من بيئة التربية في الأطباق الصغيرة،

---

(٥) Rugh (1962).

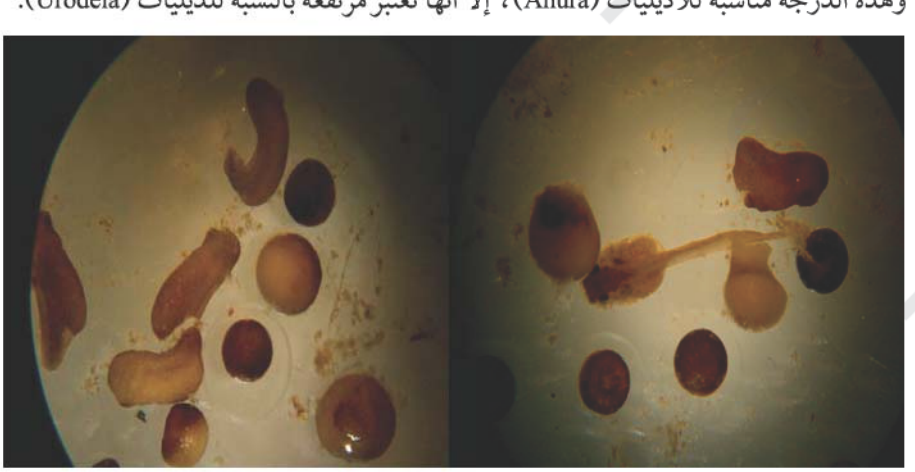
ولذلك فإن الخمس والعشرون بيضة تحتاج إلى ٥٠ مل من البيئة، عند ظهور طور أبو ذنيبة نضع في الحوض الذي أبعاده تقريبا (٦×١٢×٢٤ بوصة) والذي يحتوي على ١٠ لترات من الماء، ٢٠٠ عينة من يرقات أبو ذنيبة. ويكون ارتفاع الماء فيه ١ بوصة ويجب إضافة الماء كل أسبوع إلى الحوض لتعويض الفاقد منه نتيجة للتبخر. وليس من الضروري عمل تهوية صناعية (Artificial aeration) ولكن من الأفضل وضع بعض النباتات المائية مثل الإيلوديا والنتيلا (Elodea,Nitella) لكي تمد الوسط بكمية مناسبة من الأكسيجين، إذ إن يرقات اللاذيليات تحتاج إلى كميات كبيرة منه.(٥،٣)

ج) الإضاءة Light

الضوء ليس ضروريا للتطور الطبيعي للبرمائيات. ولكن عندما تعتمد اليرقات في غذائها على الطحالب المائية التي تمدها في الوقت نفسه بالأكسجين، فلابد من وجود ضوء طبيعي لنمو النباتات وللحصول على الكمية المناسبة من الأكسيجين، ويعتبر ضوء الشمس المباشر ليس مستحبا نظرا لشدة حرارته.

د) الحرارة Temperature

تبلغ درجة الحرارة القصوى ليرقات البرمائيات حوالي ٤٠ °م، بينما تتراوح درجة الحرارة المثلى مابين ١٢– ٢٥ °م. بعض المعامل تحتفظ بالحيوانات عند حرارة ٢٣ – ٢٥ °م، وهذه الدرجة مناسبة للاذيليات (Anura)، إلا أنها تعتبر مرتفعة بالنسبة للذيليات (Urodela).



الشكل رقم (٢,٣). مجموعة من أجنة الضفدعة في أطوار مختلفة من النمو.

obeikandl.com

تقرير العملي الثاني: حث إنتاج البيض ونموالأجنة في الضفدعة

الاسم : ..... الرقم : .....

١- ما اسم الهرمونات المستخدمة في التجربة؟

.....

٢- ما تركيز الهرمون المحقون في كل مرة وكم مرة تم حقن الضفدعة؟

.....

٣- كم عدد الحيوانات التي حقنت ؟ ذكور : ..... إناث : .....

٤- متى بدأت عملية خروج البويضات من الإناث (من ساعة الحقن)؟

.....

٥- هل كان هناك تزاوج بين الذكور والإناث؟ ..... نعم ..... لا

٦- كم يقدر عدد البيض الناتج؟..... بيضة /هل هو محاط بالأغشية؟.....

٧- هل تكونت أجنة في التجربة ؟إذا كانت الإجابة بنعم/ أو لا انتقل إلى السؤال رقم ٨ :

.....

أ) إلى أي عمر أو مرحلة وصلت الأجنة في التجربة؟

.....

ب) ما عدد الأجنة النامية ؟.....

٨- إذا لم تتكون أجنة أو لم تنمو، اذكر الأسباب التي أدت إلى عدم تكونها ؟

.....

.....

اذكر أنواع البيئات التي استخدمت في تنمية الأجنة أو تربية الأطوار اليرقية.

.....

.....

ما الشروط الواجب مراعاتها عند تغذية اليرقات:

.....

تقطع ورقة التقرير وتسلم للمعيد في نهاية وقت العملي.

obeikandl.com

obeikandl.com

العملي الثالث

تنشيط التبويض في الضفدعة بمستخلص الغدة النخامية (٦)

Superovulation of Frog via Pituitary Gland Extract

الهدف

إن التعبير Induced spawning يعني حث عملية التبويض بالطرق التجريبية وتحت الظروف المخبرية وذلك في غير موسم التزاوج ونظرا لأن في التجربة السابقة تم استخدام الهرمونات التجارية والتي أحيانا قد لا تستجيب البرمائيات للحقن بالهرمونات جاهزة الصنع ؛ لأنها غالبا استخلصت من الثدييات، لذا سوف يتم في هذا العملي حقن الضفادع بهرمونات من محلول مستخلص الغدة النخامية والذي يتم تحضيره كما يلي :

مستلزمات التجربة Material

١- ذكور وإناث ضفادع من جنس Rana (١٠ ذكور، ١٠ إناث بالغة).
٢- حقن للحقن تحت الجلد سعتها ٢ سم^{3} وقياسها ١٨-ج (18G).
٣- أدوات تشريح.
٤- أطباق صغيرة وأحواض.
٥- ماء بركة وبيئات زراعية (Culture media).

---

(٦) Rugh (1956).

obeikandi.com

لإجراء التجربة يجب مراعاة الملاحظات التالية

١- يجب أن تكون الحيوانات المستخدمة في التجربة ناضجة جنسيا وألا يقل طول جسم الإناث عن ٧٤ ملم والذكور عن٦٥ ملم، وذلك بدءا من مقدم الخطم أو البوز إلى فتحة الشرج.

٢- يفضل أخذ الحيوانات أثناء البيات الشتوي ويجب أن تغذى جيدا قبل التجارب المعملية.(٧)

٣- يتم الحقن في الجزء الجانبي الخلفي من التجويف البطني، ويكون اتجاه الحقن إلى الخلف لتجنب إحداث الضرر بالأوردة الجلدية الكبيرة والوريد البطني الأمامي والأعضاء الداخلية، (الشكل رقم ٢,٢ في العملي السابق).

٤- وتستخدم الغدد النخامية المستخرجة حديثا لحقن كل من الذكور والإناث على حدة.

يختلف عدد الغدد النخامية الضروري لإحداث التبويض الكامل من فصل إلى آخر.

الجدول الآتي يوضح عدد الغدد النخامية اللازمة لحقن الضفادع من جنس رانا حسب شهور السنة الميلادية:

الشهور	عدد الغدد النخامية للإناث	عدد الغدد النخامية للذكور
من سبتمبر إلى يناير	٥	٤
من يناير إلى فبراير	٤	٨
مارس	٣	٥
أبريل	٢	٤

٥- يمكن حفظ إناث الضفادع التي تم الحصول عليها من البيات الشتوي معمليا في الثلاجة مع قليل من الماء عند درجة حرارة ٤ْم لعدة أسابيع بل لعدة أشهر من يناير حتى يونيو، ولكن لا يمكن حفظها في درجة حرارة المعمل لأكثر من أسبوع واحد حتى لايفسد البيض الموجود داخل المبيض. وهذا يعني عدم ترك إناث الضفادع لفترات طويلة في درجة حرارة المعمل قبل الحقن لإحداث عملية التبويض في مواسم البيات الشتوي. (لذلك فإننا نستطيع التحكم في وقت التبويض بواسطة درجات الحرارة). (٧)

(٧) Rugh(1956).

٦- إذا أردت الحصول على بيض الضفادع بعد ٢٤-٤٨ ساعة فيجب بعد حقن الإناث بمستخلص الغدد النخامية الاحتفاظ بها عند درجة حرارة ٢٥°م، أما إذا كنت لاتحتاج للبيض إلا بعد ٤-٥ أيام، فيجب الاحتفاظ بها عند درجة ١٠ مْ.

٧- درجة الحرارة المثلى لنمو بيض الضفادع من جنس Rana تتراوح ما بين ١٨-٢٥°م ويكون النمو غير الطبيعي عند درجة حرارة أقل من ١٠ مْ. كما يجب عدم نقل البيض أو الأجنة من درجة حرارة معينة إلى درجة حرارة أخرى فجأة لتجنب حدوث صدمة حرارية.

اختبار حدوث التبويض

تستطيع تقرير وجود البيض داخل كيس البيض من عدمه وذلك بالضغط على مؤخرة بطن الضفدعة أو تدليكه لاستخلاص البيض، ويكون ذلك بلطف حتى لا تلحق الضرر بالبيض وبالضفادع نفسها، وتتم هذه العملية خلال ٢٤ ساعة بعد الحقن على النحو التالي:

- أمسك أرجل الضفدعة باليد اليسرى.
- أثنى جسم الضفدعة على منطقة الحوض، وذلك بوضع راحة اليد اليمنى على ظهرها والأصابع تكون محيطة بالجسم خلف الأطراف الأمامية تماما فتتكون زاوية بين الجذع والأرجل.
- أغلق اليد اليمنى بلطف باتجاه المذرق. ويجب التخلص من كمية البيض التي تخرج أول مرة؛ لأنها تكون متلاصقة لسوائل المذرق التي قد تسبب انتفاخا في الأغشية الجيلاتينية المحيطة به، مما قد يعيق عملية الإخصاب، كما يجب أيضا تجفيف منطقة المذرق قبل عملية التدليك.
- نسبة الإخصاب تكون عالية عندما يمكث البيض داخل الأنثى لمدة ٢٤ ساعة قبل عملية التدليك، وذلك لوجود سوائل فسيولوجية تعمل على نضجه أثناء وجوده داخل كيس البيض.
- كل أنثى ناضجة من جنس رانا Rana تعطي تقريبا ٢٠٠٠ بيضة تكون كلها في الطور الاستوائي من انقسام النضج الثاني وجاهزة للإخصاب.

يجب التأكد من المحلول المستخدم في عمل معلق الحيوانات المنوية من حيث قدرته على إبقائها على قيد الحياة من عدمه.

طريقة عمل التجربة Method

استخراج الغدة النخامية من إناث وذكور الضفادع على النحو التالي، (الشكل رقم ١, ٣).

أولاً: استخراج الغدد النخامية من الإناث ومعاملتها

١- خدر الضفدعة بالكلورفورم أو بالإثير (داخل زجاجة محكمة الغلق)، ثم ثبتها في طبق التشريح بالدبابيس بحيث يكون سطحها الظهري إلى أعلى.

٢- أدخل المقص إلى زاوية التقاء الفك العلوي بالسفلي، ثم اعمل قطاعا وسطيا مستعرضا خلفيا، ثم كرر هذه العملية من الجهة الأخرى للرأس للتخلص من الفك السفلي وقاع التجويف البلعومي.

٣- اعمل قطاعا مستعرضا في المنطقة القذالية (Occipital region) للرأس موازيا للغشاءين الطبليين، ثم افصل الرأس عن بقية أجزاء الجسم.

٤- ثبت الجمجمة بحيث يكون سطحها البطني إلى أعلى، وسطحها الظهري ملامسا لطبق التشريح.

٥- اعمل قطاعا طوليا مستعرضا في منطقة العظم القذالي القاعدي Basioccipital (bone)، وذلك بإدخال أحد طرفي المقص في الثقب الكبير للجمجمة (foramen magnum).

٦- اضغط على الفك العلوي للجمجمة إلى أسفل تجاه طبق التشريح، وليكن الضغط من على جانبي القطع، حتي يظهر لك التصالب البصري، ثم انظر أسفل التصالب البصري لتجد موقع الغدة النخامية.

٧- اسحب الغدد النخامية لأربع ضفادع إناث، وضعها في ١سم^{٣} من محلول ملحي متساوي التركيز (٠,٩٪ كلوريد الصوديوم).

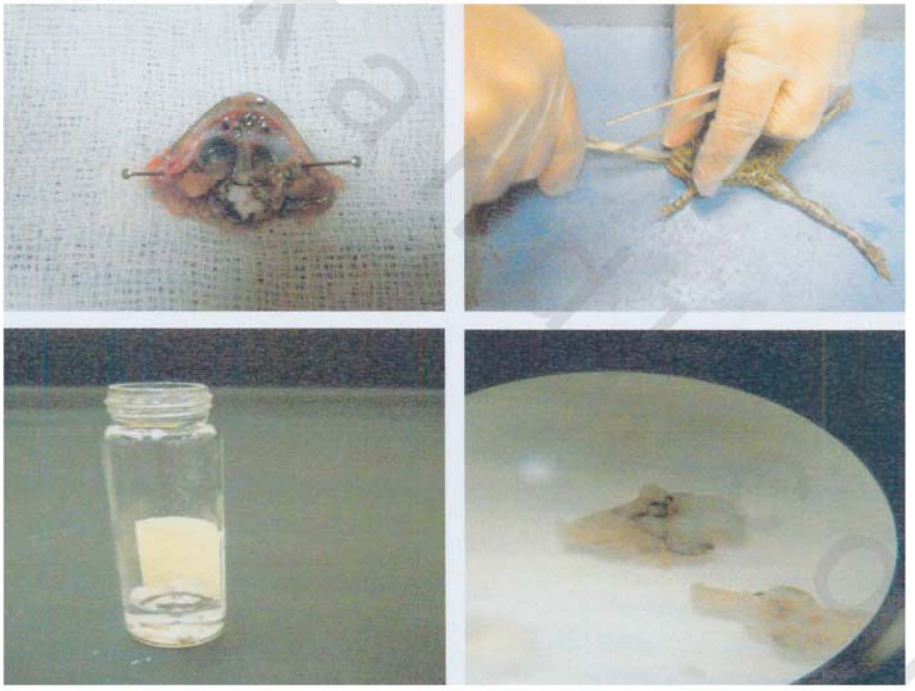
٨- اسحق الغدد النخامية الأربع التي تحصلت عليها سابقا سحقا جيدا لنشر محتوياتها في المحلول الملحي، ثم اسحب غدد الإناث مع المحلول بواسطة حقنة حجمها ٢سم^{٣}، ثم ركب عليها بعد ذلك إبرة ذات مقاس (رقم ١٨).

٩- أمسك الضفدعة من الرجل الخلفية، ثم قم بعملية الحقن في الجزء الجانبي الخلفي من التجويف البطني(التجويف البريتوني) ويكون اتجاه الحقن إلى الخلف مع تجنب إحداث الضرر بأي من الأوعية الدموية والأعضاء الداخلية، (الشكل رقم ٣,٢).

ثانياً: استخراج الغدد النخامية للذكور ومعاملتها

١٠- أعد الخطوات السابقة لأربع ضفادع ذكور كل على حدة حتى نحصل على محلول مستخلص الغدة النخامية من الذكور تحقن الذكور، كما حقنت الإناث من قبل.

١١- ضع الضفادع المحقونة بعد ذلك في وعاء به ماء ارتفاعه ١ بوصة تقريبا، وفي درجة حرارة ٢٥°م. (لذلك فإننا نستطيع التحكم في وقت التبويض بواسطة درجات الحرارة).



الشكل رقم (٣,١). طريقة استخراج الغدة النخامية في الضفادع.

الشكل رقم (٣,٢). طريقة حقن محلول مستخلص الغدة النخامية في التجويف الجانبي للبطن لتنشيط عملية التبويض في الضفادع.

لقد تبين أن أول كمية من البيض تصل إلى كيس البيض تكون قليلة وغير قابلة للإخصاب (لايمكن إخصابها)، إلا أن نسبة الإخصاب للبيض تزداد إذا ما تجمع البيض كله داخل الرحم قبل عملية التدليك. ويجب اختبار وجود البيض داخل كيس البيض في الأنثى المحقونة خلال ٢٤ ساعة من الحقن، ويتم ذلك كما ذكر سابقا. عند خروج البيض بسهولة ويسر وبأعداد كبيرة فإنه يكون جاهزا لعملية الإخصاب(Fertilization)، ويفضل إجراء هذه الخطوة بعد تحضير معلق الحيوانات المنوية الذي يتم على النحو التالي:

١- استخرج زوجين من الخصي لاثنين من ذكور الضفادع وقطعها بواسطة مقص دقيق ونظيف في طبق بتري يحتوي على ١٠ سم^{3} من المحلول الملحي المتساوي التركيز (0.9% Nacl).

٢- اترك معلق الحيوانات المنوية من ٥-١٠ دقائق في درجة حرارة المعمل كي تنتشر وتصبح نشيطة.

خطوات الإخصاب الخارجي في الطبق في الضفادع

١- استخرج بيض الضفدعة بعملية التدليك وضعه مباشرة في طبق بتري نظيف وجاف (معقم)، وتجنب ملامسة البيض للماء في هذه الخطوة، حتي لاتنتفخ الأغشية الجيلاتينية المحيطة به وتمنع عملية الإخصاب.

٢- ضع حوالي ٢٠-٣٠ بيضة في كل طبق بتري على حده.

٣- يضاف لكل مجموعة من البيض ٠,٢ مل من معلق الحيوانات المنوية المركز الذي لابد وأن يمزج جيدا بالبيض ويترك لمدة ٥ دقائق.

٤- أضف ٥-١٠ مل من المحلول الملحي المستخدم في عمل معلق الحيوانات المنوية لكل مجموعة من البيض لكي يغطيها تماما.

٥- بعد ٢٠ دقيقة يضاف لكل طبق ٥-١٠ مل من محلول ملحي جديد حتى يغطي البيض دون أن يملئ الطبق بحيث يُترك فراغ بين الغطاء والطبق لكي يتنفس البيض جيدا أثناء وجوده داخل الطبق. كما يجب الاحتفاظ بالأطباق في مكان به رطوبة نسبية عالية حتى لا يجف.

٦- يظهر الهلال السنجابي بعد حوالي نصف ساعة من عملية الإخصاب عند درجة حرارة ٢٥°م ثم بعد ساعة واحدة وعند الدرجة نفسها يحدث دوران للبيض داخل الأغشية الجيلاتينية بحيث يصبح قطبه الحيواني إلى أعلى وقطبه الخضرى إلى أسفل. وبعد ساعتين ونصف يظهر طور الخليتين (Two-cell stage).

٧- يجب إضافة المحلول الملحي من آن لآخر إلى أطباق بتري، لكي يغطي البيض دائما وذلك لانتفاخ الأغشية الجيلاتينية المحيطة به مما قد يؤدي إلى تمدد كتلة البيض الموجودة داخله.

٨- يجب تحرير الأغشية الجيلاتينية ومحتوياتها من البيض بعد ساعة من الإخصاب لالتصاقها بقاع أطباق بتري.

٩- يسمح للأغشية الجيلاتينية بالانتفاخ والتمدد، حتى تصل إلى الحد الأقصى وحتى يمكن تجزئة البيض إلى مجاميع صغيرة، ويتم ذلك قبل الانقسام الأول وتحتاج كل بيضة إلى ٢ سم^{٣} من المحلول الملحي.

الجدول الزمني للنمو الطبيعي لبيض الضفادع[٨]

Schedule of the Normal Development of the Frog's Eggs

من المعروف أن سرعة نمو البيض والأجنة تعتمد على درجة الحرارة المستخدمة أثناء التجربة. والجدول التالي يوضح معدل النمو التقريبي عند كل من درجتي الحرارة ١٨مْ، ٢٥مْ. (انظر الشكل رقم ٣,٣).

المرحلة Stage	معدل النمو عند ١٨مْ (بالساعة)	معدل النمو عند ٢٥مْ (بالساعة)
الإخصاب (Fertilization)	٠,٠	٠,٠
الهلال السنجابي (Grey crescent)	١,٠	١,٠ -٠,٥
دوران البيض داخل الأغشية (Rotation)	١,٥	١,٠
طور الخليتين (Tow-cell Stage)	٣,٥	٢,٥
طور الخلايا الأربع (Four-cell Stage)	٤,٥	٣,٥
طور الخلايا الثماني (Eight-cell Stage)	٦,٥	٥,٥
طور المفلجة (البلاستيولا Blastula)	١٨,٠	١٢,٠
طور المبطنة (الجاسترولا Gastrula)	٣٤,٠	٢٠,٠
السدادة المحية (Yolk plug)	٤٢,٠	٣٢,٠
الصفيحة العصبية (Neural plate)	٥٠,٠	٤٠,٠
الثنيات العصبية (Neural folds)	٦٢,٠	٤٨,٠
الحركة الهدبية (Cilliary movement)	٦٧,٠	٥٢,٠
الأنبوبة العصبية (Neural tube)	٧٢,٠	٥٦,٠
برعم الذيل (Tail bud)	٨٤,٠	٦٦,٠
الحركة العضلية (Muscular movement)	٩٦,٠	٧٦,٠
ضربات القلب (Heart beat)	٥,٠ أيام	٤,٠ أيام
الدورة الدموية الخيشومية (Gill circulation)	٦,٠ أيام	٥,٠ أيام
الدورة الدموية للزعنفة الذيلية (Tail fin circulation)	٨,٠ أيام	٦,٥ يوما
الخياشيم الداخلية والغطاء الخيشومي (gills&operculum Internal)	٩,٠ أيام	٧,٥ يوما
الغطاء الخيشومي الكامل (Complete operculum)	١٢,٠ أيام	١٠,٠ أيام
التحول (Metamorphosis)	٣ شهور	٢,٥ شهراً

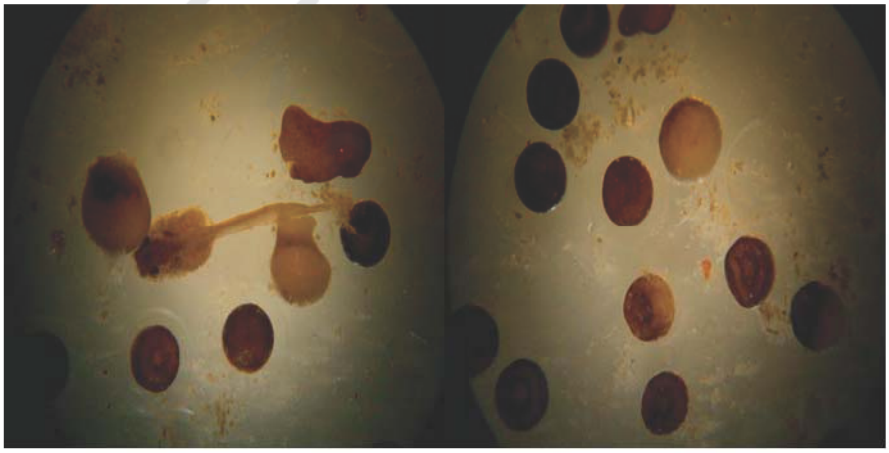
(٨) Rugh (1956).

الشروط الواجب مراعاتها في تجربة الإخصاب الخارجي

١- يجب تغذية الأطوار التي تظهر فيها الخياشيم الخارجية (External gills)، كما ذكر سابقا في الدراسة العملية الثانية بالخس أو السبانخ المغلية قليلا.

٢- يقلل عدد العينات (أطوار أبو ذنيبة) إلى ٥ يرقات بعد عشرة أيام داخل طبق التربية الذي يحتوي على ٥٠ سم^{٣} من المحلول الملحي.

٣- يجب تغيير المحلول الملحي الموجود داخل أطباق التربية من آن لآخر للتخلص من الفضلات الموجودة ولمنع النمو البكتيري.



الشكل رقم (٣,٣). صور توضح بعض مراحل النمو المختلفة لجنين الضفدعة (×١٨).

obeikandl.com

تقرير العملي الثالث: تنشيط التبويض في الضفادع
باستخدام مستخلص الغدة النخامية

الاسم : ..... الرقم : .....

١- كم عدد الضفادع التي شرحت لاستخلاص الغدة النخامية منها؟

الذكور : ..... الإناث : .....

٢- ما كمية المحلول الذي وضعت فيه الغدة النخامية؟..... مل.

٣- كم كانت كمية المحلول الذي أعطي لكل أنثى ؟..... وكم كان عدد الجرعات .....

٤- بعد كم من الوقت خرج البيض من الأنثى؟..... ساعة.

٥- هل كانت كمية البيض أكثر أو أقل من التجربة السابقة ؟.....

٦- هل تم استخراج الحيوانات المنوية من الذكور؟.....

٧- هل كانت الحيوانات المنوية تتحرك ؟.....

٨- هل تكونت أجنة من عملية الإخصاب؟.....

أ) ما المراحل التي تكونت ؟.....

ب) ما درجة حرارة الغرفة الخاصة بالتربية؟.....

ج) ما نوع البيئة المستخدمة في التربية؟.....

د) أرفق جدولا توضح فيه الساعات بالضبط والعمر الخاص بمراحل نمو الأجنة أثناء متابعتك للتجربة.

٩- إذا لم تكن هناك نتائج ، حدد الأسباب التي أدت إلى عدم الحصول على نتائج.

.....

.....

تقطع ورقة التقرير وتسلم للمعيد في نهاية وقت العملي.

obeikandl.com

obeikandl.com

العملي الرابع

تجارب على أجنة الضفادع
Experiments on Frog Embryos

الهدف

بعد أن تعلمنا في التجارب السابقة كيف يمكن الحصول على أجنة الضفادع، فإن هذا الدرس من العملي يهدف إلى التدرب على إجراء بعض التجارب على أجنة البرمائيات.

التجربة الأولى: تأثير العوامل البيئية على نمو الأجنة: التبطين إلى الخارج (Exogastrulation)

يمكن إجراء عملية التبطين إلى الخارج وهي عكس ما يحدث في الحالة الطبيعية لنمو أجنة البرمائيات، حيث تنغمد الخلايا الخارجية للمفلجة (للبلاستيولا) إلى الداخل بزحفها من خلال ثقب المفلجة إلى الداخل. ولكن في هذه التجربة لا يحدث انغماد للخلايا إلى الداخل، بل تنفصل مجموعة من الخلايا المحملة بالمح (خلايا القطب الخضري) عن خلايا القطب الحيواني، وتتجه للخارج نتيجة لتغير تركيز محلول بيئة تنمية الأجنة، لذلك يمكن إجراء التجربة بتنمية أجنة البرمائيات في طور المفلجة في محاليل عالية أو منخفضة التركيز.

المواد والأدوات المستخدمة في التجربة Materials

- أدوات تشريح دقيقة وطبق تشريح وماصات صغيرة.
- أجنة في طور المفلجة عدد ١٠٠- ٢٠٠ جنين (يمكن الحصول على الأجنة في طور المفلجة من التجربة السابقة أو يمكن أن تجلب الأجنة من البيئة مباشرة.
- محلول بيئة للتنمية (محلول شتاين بيرت Steinbert's solution).

obeikandl.com

• أطباق بتري لتنمية الأجنة، مرشحات أو فلتر للتعقيم.

• حضان درجة حرارته ٢٠-٢٥°م.

طريقة إجراء التجربة Method (٩)

تحضير محاليل تنمية الأجنة

١- يحضر لتر واحد من محلول أو بيئة شتاين بيرت الموضح تركيبه في الجدول الآتي:

١- كلوريد الصوديوم ٣,٤ جم (NaCl).

٢- كلوريد البوتاسيوم ٠,٠٥ جم (KCl).

٣- كبريتات الماغنيسيوم المائية ٠,٨ جم ($Mgso_4.7H_2O$).

٤- بيكربونات الصوديوم ٠,٤ جم ($NaHCO_3$).

٥- حمض الهيدروكلوريك (١) عياري ٤مل (1N HCl).

٦- منظم تريس ٠,٥٦ جم (Tris buffer).

٧- ماء مقطر ١٠٠٠ مل (Distilled water).

يجب أن يكون الأس الهيدروجيني لهذه البيئة ٧,٤ (pH=7.4)، ثم تعقم بواسطة الفلتر.

٢- بعد تحضير المحلول يقسم إلى ١٠ أجزاء كل جزء يحتوي على ١٠٠مل لعمل عدد من التركيزات والتخفيفات المختلفة لبعض هذه الأجزاء مثل :

• أن يضاف ١٠٠ مل ماء مقطر إلى أحد الأجزاء (التخفيف للنصف).

• أو أن يضاف ٢٠٠ مل ماء مقطر إلى أحد الأجزاء (التخفيف للربع).

أو أن تضاف المواد السابقة (في الجدول) إلى كمية أقل من الماء المقطر (٨٠٠ مل مثلا) لزيادة التركيز.

٣- عند وصول الأجنة إلي مرحلة طور المفلجة المبكرة (بعد ١٢- ١٨ ساعة من الإخصاب تقريبا)، تجري عليها التجربة بوضعها في المحاليل السابقة. ولكن قبل ذلك لابد من إزالة الأغشية الجيلاتينية التي تحيط بها وذلك على النحو التالي :

---

(٩) Rugh (1962).

أ) توضع الأجنة في طبق يحتوي على البيئة التي تنمي فيها الأجنة ثم تحت المجهر التشريحي (قوة تكبيره ١٠ وبواسطة ملاقط دقيقة ويفضل أن تكون حادة)، حاول أن تزيل طبقات الأغشية الجيلاتينية الخارجية اللزجة، ولايترك إلا الغشاء الذي يحيط بها مباشرة.

ب) انقل الأجنة بواسطة أنبوبة ماصة إلي محلول بيئي تركيزه مضاعف وحاول أن تمسك الجنين بأحد الملاقط، وبالملقط الآخر أوخز الغشاء الداخلي المحيط بالجنين، ثم اسحبه من حوله، ثم انقل الأجنة إلى محلول آخر متعادل التركيز.

٤- قسم الأجنة إلى مجموعات (لتكن عشرة أجنة) في كل طبق، ثم رقمها وضع في كل طبق تركيزا مختلفا من المحلول، ثم اترك الأجنة لكي تنمو في هذه التركيزات المختلفة داخل الحضان. تابع عملية التبطين إلى الخارج بعد ١٢ ساعة تقريبا من إجراء التجربة، ثم سجل ملاحظاتك عن الأجنة في الأطباق المختلفة التركيزات في نهاية التجربة (الشكل رقم ٤,١) يمكن تثبيت الأجنة في مثبت بوان، ثم الكحول ٧٠٪ وطمرها بالشمع وعمل القطاعات المختلفة لمزيد من الدراسة ورؤية أوضح للأجنة غير السوية أو الطبيعية.

التجربة الثانية : أهمية المنظمات الجنينية ونقل الشفة الظهرية لثقب المفلجة (البلاستيولا) وزراعتها[١٠]

Embryonic Organizers Importance and Dorsal lip Culture and Transfer

مقدمة

تعتبر عملية نقل الشفة الظهرية لثقب المفلجة (البلاستيولا) وزراعتها من التجارب الأولية التي أجراها العالم شبيمان (Spemann) في مطلع العقد الثالث من هذا القرن والتي من خلالها أمكن معرفة أهمية المنظمات الجنينية (Embryonic organizers) في عملية التمايز الجنيني المبكر وتكوين الأنبوبة العصبية.

الأدوات والمواد المستخدمة Materials

١- أجنة ضفادع في طور المبطنة (الجاسترولة) المبكرة أو المفلجة المتأخرة Early gastrula or late blastula وأجنة في طور المفلجة المبكرة.

(١٠) Rugh (1962).

٢- أدوات تشريح (ملاقط ومقصات دقيقة صغيرة حادة ومعقمة).

٣- طبق تشريح صغير بقاعه شمع برافين يحتوي على حفرة صغيرة بحجم الجاسترولا بدون أغشية.

٤- بيئة لزراعة الأجنة (محلول هولتفريتر Holtfreter's solution)، (انظر الدرس العملي الثاني).(أو نصف تركيز محلول شتاين بيرت Steinbert's solution) السابق.

٥- إبرة تنجستن.

٦- ماصات بأحجام صغيرة.

٧- أصباغ حيوية (عند الحاجة مثل الأزرق المثلين أو الأحمر المتعادل).

٨- مجهر تشريحي (قوة تكبيره ×١٠).

طريقة إجراء التجربة Methods

١- توضع الأجنة وهي في طور المبطنة (الجاسترولة) في محلول البيئة في أطباق التشريح.

٢- يتم التخلص من الأغشية الجيلاتينية المحيطة بالأجنة (كما في التجربة السابقة).

٣- يوضع الجنين المراد نقل الشفة الظهرية منه (الواهب) في إحدى حفر طبق التشريح بحيث يكون ثقب البلاستيولا متجها لأعلى (يتم التخلص من الغشاء المحي إذا لم تستطع الحفاظ علي وضع الجنين) ويوضع الجنين المراد نقل القطعة إليه (المستقبل) في وضع جانبي قريبا من الجنين الواهب.

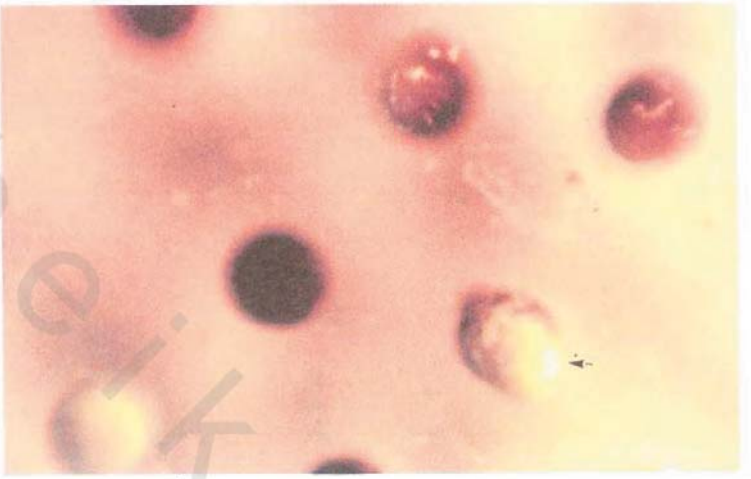
٤- بواسطة إبرة التنجستن يتم قطع جزء الشفة الظهرية للجنين الواهب (تحت المجهر)، ثم بواسطة الماصة الدقيقة يتم نقل هذا الجزء المقطوع (الشفة الظهرية) وإدخاله إلي تجويف المعي الأولي في حالة البطينة (الجاسترولا) أو في تجويف المفلجة للجنين المستقبل كما في الشكل رقم (٤,٢).

٥- انقل الأجنة بعد ساعة تقريبا من إجراء التجربة إلي البيئة لتنميتها.

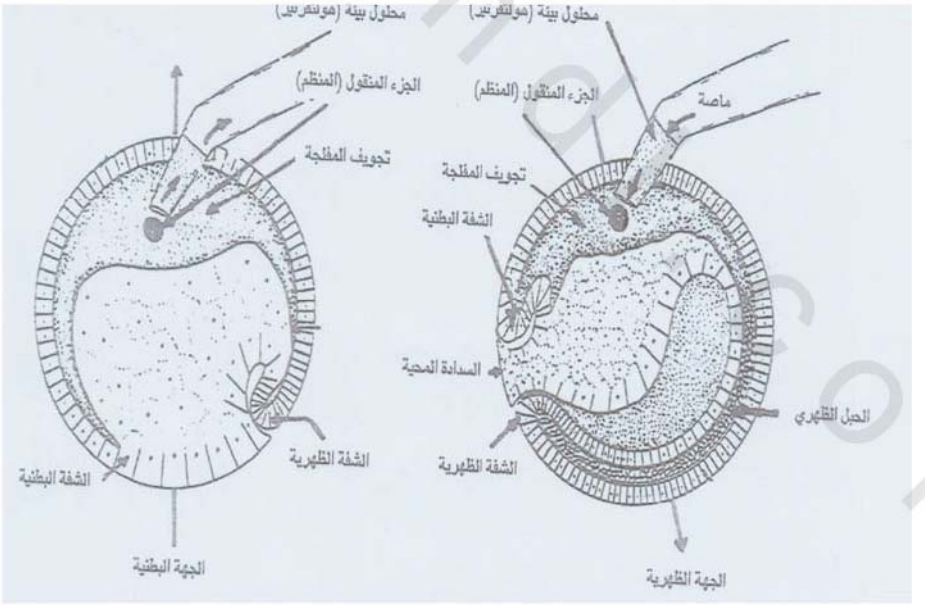
٦- تابع مراحل النمو على فترات وسجل ملاحظاتك عن نمو الأجنة.

٧- يمكن بعد ٢٤ ساعة من إجراء التجربة عمل بعض القطاعات لبعض الأجنة التي أجريت عليها التجربة، وذلك بوضعها في مثبت بوان، ثم طمرها في الشمع وتقطيعها وتحميلها على الشرائح الزجاجية، ثم صبغها بالهيماتوكسلين والإيوسين.

obeikandl.com



الشكل رقم (٤,١). صورة توضح عملية التبطين الخارجي (Exogastrulation) لأجنة الضفدعة نتيجة لوضعها في محلول قليل التركيز (مشار إليه بالسهم التكبير ×15) (عن الحميدي وآخرون ١٤١٨هـ).



الشكل رقم (٤,٢). رسم توضيحي لطريقة نقل أجزاء من جنين ضفدعة الشفة الظهرية إلى آخر في طور المفلجة (البلاستيولا المتأخرة وزراعتها [عن : Rugh,1964].

obeikandl.com

تقرير العملي الرابع : تجارب على أجنة الضفادع

الاسم : ..... الرقم : .....

أولا : تأثير البيئة على نمو الأجنة (التبطين للخارج).

١- ما تركيز المحلول الذي تم تنمية الأجنة فيه؟.....

٢- كم عدد الأجنة التي نمت نموا سليما ؟.....

٣- كم عدد الأجنة التي نمت نموا غير سليم ؟.....

٤- ما ملاحظاتك الوصفية على النمو غير السليم للأجنة ؟

.....

.....

٥- ما أهمية هذه التجربة من حيث علاقتها بالبيئة ونمو الأجنة ؟(اكتب بشكل مختصر)

.....

.....

.....

ثانيا: أهمية المنظمات الجنينية (نقل الشفة الظهرية لثقب المفلجة وزراعتها)

١- كم عدد الأجنة التي تم إجراء التجربة عليها ؟.....

٢- إلى أي عمر وصل نمو الأجنة المستقبلة؟.....

٣- ما أهمية المنظمات الجنينية من خلال التجربة التي قمت بإجرائها ؟

.....

.....

تقطع ورقة التقرير وتسلم للمعيد في نهاية وقت العملي.

obeikandl.com

obeikandl.com

العملي الخامس

تجدد الزعنفة الذيلية لطور أبي ذنيبة (البرمائيات)
Regenration of Tadpole Tail Fin (Amphibian)

الهدف

في هذا الدرس العملي سوف نتابع عملية التجدد (Regeneration) التي تحدث في بعض الكائنات الحية وخاصة البرمائيات والزواحف، حيث يحصل إزالة أو فقد للتمايز الخلوي في منطقة البتر، ثم تكون بلاستيما التجدد، ثم إعادة التمايز. حيث سنقوم بقطع جزء من الزعنفة الذيلية لطور أبي ذنيبة للضفدعة ثم نتابع عملية نموه.

تجدد الزعنفة الذيلية في الطور اليرقي لأبي ذنيبة

المواد والأدوات المستخدمة Materials

- أدوات تشريح (ملاقط، ومقصات).
- أحواض صغيرة لتربية يرقات أبي ذنيبة.
- عدد عشر يرقات من طور أبي ذنيبة.
- أطباق بتري.
- مادة الكلوريتون المخدرة (Chloretone) أو (Tricaine methane sulfonate).

طريقة عمل التجربة Method :

١- حضر كمية من المادة المخدرة (ليرقات أبي ذنيبة) وذلك بإذابة كمية من المادة المخدرة (Tricaine methane sulfonate). في محلول بيئة ١٠٪ هولتفريتر (Holtfreter's) بحيث يصبح التركيز ١ : ١٢,٠٠٠ أو إذابة مادة الكلوروتون (Chloretone) بنسبة ١ : ٣٠٠٠ ماء.

٢- ضع يرقات أبي ذنيبة في طبق بتري يحتوي على كمية من محلول المادة المخدرة حتى تتوقف اليرقات عن الحركة (لمدة ٥- ١٠ دقائق).

٣- أخرج اليرقات مباشرة من محلول المادة المخدرة وضعها في محلول بيئة ١٠٪ هو لتفريتر وسجل أطوال الذيل فيها قبل القطع.

٤- اقطع بواسطة المقص أجزاء معينة من ذيل يرقة أبو ذنيبة. (وليكن طول ومستوى القطع يختلف من يرقة لأخرى). كأن يكون أحدهما موازيا لمحور الذيل والثاني عرضيا عليه والثالث قريبا من طرف الذيل والرابع أبعد (الشكل رقم ٥,١).

٥- ضع اليرقات في ماء بركة لتنميتها ومتابعتها فيما بعد.

٦- سجل ملاحظاتك عن تكوُّن بلاستيما التجدد والتئام مكان القطع وطول الذيل.

ويمكن تتبع عملية النمو ومراحل التجدد بعد عملية البتر (Amputation) بعمل قطاعات نسيجية طولية مصبوغة لمنطقة البتر من الذيل في مراحل مختلفة من عملية التجدد للزعنفة الذيلة (Regenerating tail fin) ومتابعة مراحل التجدد التالية :

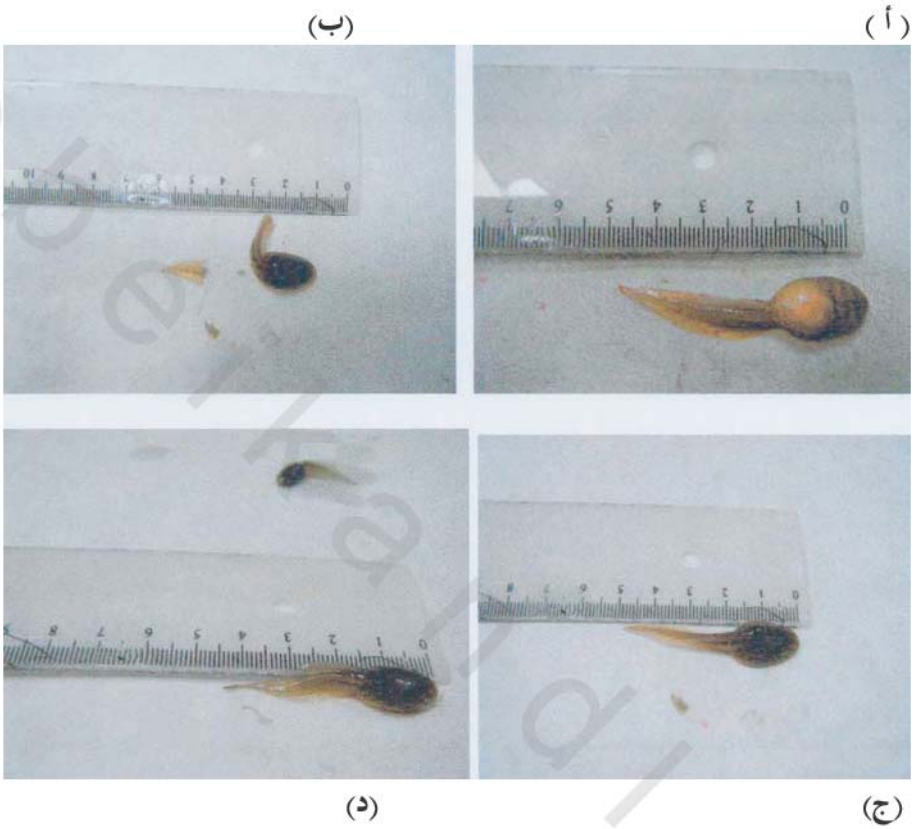
١- مرحلة البتر (Amputation stage).

٢- مرحلة االلتئام الجرح (Wound healing stage).

٣- مرحلة فقد التميز الخلوي (Dedifferentiation stage).

٤- مرحلة تكوين البلاستيما (Blastema formation stage).

٥- مرحلة إعادة التميز (Redifferentiation stage).



الشكل رقم (٥,١). صورة لطور أبي ذينيبة قبل القطع (أ) وبعد القطع (ب) ثم بعد التجدد (ج،د).

obeikandl.com

تقرير العملي الخامس: تجدد الزعنفة الذيلية لطور أبي ذنيبة

الاسم : ..... الرقم : .....

١- ما تركيز المادة المخدرة التي استعملتها ؟

.....

٢- كم عدد اليرقات التي تم إجراء التجربة عليها ؟

.....

٣- كم طول الزعنفة الذيلية قبل القطع لليرقات ؟

.....

٤- متى تم ملاحظة عملية التئام مكان القطع؟

.....

.....

.....

٥- هل طول التجدد الذي حصل يساوي الطول الأصلي للذيل المقطوع ؟

.....

.....

٦- ما المدة التي تمت فيها عملية التجدد ؟

.....

٧- ماذا تعلمت من هذه التجربة ؟

.....

.....

تقطع ورقة التقرير وتسلم للمعيد في نهاية وقت العملي.

obeikandi.com