٢ . القتل والتثبيت

Killing and Fixation

تعتبر عملية قتل وتثبيت البروتوبلازم من أهم العمليات فى هذا التكنيك . إن عملية إنهاء الحياة داخل الخلايا يجب أن تتم بأقل إخلال ممكن بالبناء الداخلى للخلايا ، وكذلك أقل تدمير لنظام الخلايا داخل النسيج. بالإضافة إلى قتل البروتوبلازم . . فإن تتابع خطوات عملية القتل يجب أن يعمل على تثبيت العينة والحفاظ على المادة النباتية متماسكة بدرجة كافية تتحمل معها التداول والعمليات المطلوب إجراؤها عليها . وتهدف هذه الخطوة إلى :

قتل الخلايا فجائيا وتثبيت محتوياتها على حالة أقرب ما تكون من الحالة الطبيعية ، ولايمكن اعتبار النسيج أصبح مقتولا ما دامت هناك خلية فيه لازالت حية .

صفات المحاليل المستخدمة فى القتل والتثبيت

(١) أن تكون سريعة الانتشار حتى تتخلل الأنسجة وتقتلها بأسرع ما يمكن .

(٢) أن تعمل على تجلط محتويات البروتوبلازم فى حالة دقيقة جداً حتى لايتأثر مظهره بقدر الإمكان .

(٣) أن تكسب البروتوبلازم صلابة مناسبة فيتحمل المعاملات المختلفة .

(٤) ألا تسبب انكماشا Shrinkage للبروتوبلازم أو تتلف معالمه .

(٥) ألا تؤثر فى قابلية الأنسجة للصبغات بل يجب أن تساعد عليها .

والواقع أن ما يفعله التثبيت هو التأثير على بعض محتويات الخلية بحيث يمكن تمييزها عن بعضها تحت المجهر ، أى إنه لو كانت العملية كاملة تمام الكمال فى حفظ محتويات الخلية على حالتها الحية ، لأصبحت فى الواقع قليلة القيمة لأنها لاتعطى فوارق يمكن تمييزها تحت المجهر بسهولة .

ليس لسائل من السوائل المستعملة كل المميزات السابق ذكرها ، لذا تحضر محاليل تثبيت Fixatives من مادتين أو أكثر تخلط معًا Fixative mixture لتعادل الواحدة تأثير

الأخرى أو تكملها فيصبح للمثبت فى مجموعه كل المميزات المطلوبة أو أغلبها على الأقل . فالكحول بمفرده قاتل ومثبت سريع الانتشار ، ولكنه يسبب انكماشًا للبروتوبلازم فيضاف إليه حامض الخليك الثلجى Glacial acetic acid ليعادل هذا التأثير ويمنع الانكماش .

يختلف الوقت اللازم لإتمام عملية التثبيت بإختلاف محلول التثبيت وطبيعته وحجم النموذج المراد تثبيته ، على أنه من الأفضل كقاعدة عامة ألا تقل مدة التثبيت عن ٤٨ ساعة إلا إذا أشير بغير ذلك . والتثبيت يسبق عادة تجهيز القطاعات أو التحضيرات المجهرية الأخرى كالسلخ مثلا ، إلا إنه فى بعض الأحوال يحضر السلخ أو القطاع من الأنسجة الغضة الحية ثم يثبت بعد ذلك قبل الشروع فى خطوات التحضير الأخرى .

محاليل القتل والتثبيت

فيما يلى عرض للخصائص المختلفة للكيماويات المستخدمة فى عملية القتل والتثبيت وأثرها على المكونات المختلفة للخلايا (ويلى Willey ١٩٧١) :

(١) كحول الإيثايل Ethanol

- يحدث تجلط فى السيتوبلازم ويجعله كالشبكة الخشنة .
- يتلف الميتوكوندريا .
- يميل لمزج وإتلاف الحبيبات الدهنية فى الخلية .
- يحدث انكماشًا للنوية .
- يجعل الكروموسومات غير محددة .
- يحدث انكماشًا واضحًا وتقلصًا كبيرًا للخلايا .
- يتوافق مع استعمال حامض البكريك وكلوريد الزئبق (السليمانى) والفورمالدهيد وحامض الخليك .
- يميل لأكسدة حامض الخليك - ويجب تجنب خلطه مع ثلاثى أكسيد الكروميوم وثانى كرومات البوتاسيوم ورباعى أكسيد الأوزميوم .

(٢) حامض البكريك Picric acid

- له خاصية الانفجار (ربما ينفجر فى الزجاجة) لذا يجب حفظه فى وسط رطب (مبلل دائمًا) .
- يحدث تجلط للسائل النووى .
- يحفظ الكروموسومات بصورة جيدة .
- يثبت السيتوبلازم بصورة متجانسة ، ويحدث انكماشًا سيئًا ، ولكنه يترك السيتوبلازم نصف سائل (لين) أى انكماش غير ضار .
- متوافق بدرجة عالية مع المثبتات الأخرى .

(٣) كلوريد الزئبق Mercuric chloride

- سام جدًا وقاتل سريع . عند استخدامه بكميات قليلة يسبب التهابًا حادًا للكلى (ضار حتى فى التركيزات القليلة منه) .
- يحفظ محتويات السيتوبلازم مثل الميتوكوندريا .
- يجعل النوية واضحة جدًا - ويثبت الكروموسومات بصورة ضعيفة .
- يثبت السيتوبلازم بصورة متجانسة ، ولكنه يحدث له انكماش سئ .
- يحدث تشوهات فى الخلية بدرجة أقل مما تحدثه المثبتات الأخرى .
- يحدث اسوداد للنسيج يجب إزالته بفعل اليود فى المحلول الكحولى .
- يجعل الأنسجة أكثر قابلية للصبغ عما تفعله المثبتات الأخرى .

(٤) ثلاثى أكسيد الكروميوم Chromium trioxide

- عند إذابته فى الماء يعطى حامض الكروميك .
- يجب غسل العينات بالماء الجارى للتخلص منه ؛ لأن الغسيل بالكحول يساعد أيضًا على اختزاله .
- يجب استعماله فى الظلام ، لأنه مثبت غير ثابت التركيب فى الضوء ، إذا ترك مدة طويلة فى الضوء فإنه يتحول (يختزل) إلى أكسيد الكروميك الأخضر الذى يصعب ذوبانه بدرجة عالية .

- مثبت ممتاز للكروموسومات ولايثبت الميتوكوندريا .
- مسئول عن جعل السيتوبلازم فى حالة متجلطة خشنة .
- غير متوافق مع المثبتات المختزلة مثل الفورمالدهيد وكحول الإيثايل .

(٥) الفورمالدهيد Formaldehyde

- الفورمالدهيد غاز - والفورمالين Formalin عبارة عن محلول غاز الفورمالدهيد فى الماء بنسبة ٣٧ - ٤٠ ٪ بالوزن .
- يثبت ويحفظ الميتوكوندريا بصورة جيدة ، كما يقوم أيضًا بحمايتها من فعل حامض الخليك .
- لايستخدم فى تثبيت العينات النباتية التى سيتم طمرها فى شمع البارافين (لأنه مثبت ضعيف لهذه العينات) . أما فى حالة العينات التى سيتم قطعها بالميكروتوم الثلجى أو العينات التى سيتم قطعها بالميكروتوم المنزلق فى حالة قطاعات السللويدن فيعتبر مثبتًا جيدًا لها (أى يفضل استخدامه كمثبت لهذه العينات) .
- لايوفر الحماية من الانكماش الحاد وتحطم الخلايا الناتج عن استخدام تكنيك شمع البارافين .

(٦) رباعى أكسيد الأوزميوم Osmium tetroxide

- مثبت جيد فى الحالة الغازية (عندما يكون فى شكل بخار) ، ويجب الحذر من تعرض العين والأنف والفم فى هذه الحالة .
- نفاذيته داخل الأنسجة ضعيفة ، أى يتخلل الأنسجة ببطء ، ولذلك يستخدم فقط مع الأنسجة الرقيقة أو الرهيفة .
- يختزل بسرعة فى الضوء (سهل الاختزال ضوئيا) ، ولذلك يجب أن يتم استخدامه فى تثبيت الأنسجة فى الظلام .
- لايوفر الحماية ضد انكماش وتلف الخلايا المتسبب عن استخدام تكنيك شمع البارافين .

- مثبت هام فى الفحص عند استخدام تكنيك المجهر الإلكترونى .
- غير متوافق مع الفورمالدهيد وكحول الإيثايل .

(٧) ثانى كرومات البوتاسيوم Potassium dichromate

- مثبت ضعيف بذاته ، ويسبب انكماشًا كبيرًا جدًا للأنسجة .
- بعد انقضاء المدة اللازمة للتثبيت يجب أن تجرى عملية الغسيل فى الماء الجارى ، وذلك لمنع اختزاله إلى أكسيد الكروميك غير القابل للذوبان عند استخدام الكحول .
- يجب حفظه فى درجة حموضة أعلى من ٤ ، فعند حفظه فى درجة حموضة أقل من ٤ تكون الأيونات مشابهة لحالة ثلاثى أكسيد الكروميوم .
- يجعل السيتوبلازم والسائل النووى فى حالة متجانسة .
- يحفظ الميتوكوندريا بحالة جيدة (مثبت جيد للميتوكوندريا) .
- يسبب انحلالاً جزئيًا للنوية .
- يجعل الكروموسومات صعبة الرؤية عند الفحص .
- يتوافق مع استخدام حامض البيكريك وكلوريد الزئبق ورباعى أكسيد الأوزميوم .
- يختزل بواسطة الفورمالدهيد وكحول الإيثايل إلى أكسيد الكروميك .

(٨) حامض الخليك Acetic acid

- يجب حفظه على درجة حموضة ٤ ، وعند حفظه على درجة حموضة أعلى من ٤ فإن استخدامه على هذه الدرجة يسبب تحللاً للأنسجة مع عدم تثبيتها .
- يسبب تقلصًا شديدًا للسيتوبلازم .
- يسبب انحلالاً للميتوكوندريا وجهاز جولجى .
- مثبت ضعيف للسائل النووى . ويثبت الكروموسومات بحالة جيدة .
- يتوافق مع المثبتات الأخرى ، إذا خلط مع ثانى كرومات البوتاسيوم يسبب فعل تثبيتى مثل الذى يحدثه ثلاثى أكسيد الكروميوم .

جدول (٢ - ١) : خصائص المثبتات المجلطة للخلايا Coagulant Fixatives.

المثبتات / الخصائص	كحول الإيثايل Ethanol C_2H_5OH	حامض البكريك Picric acid $C_6H_2(NO_2)_3OH$	كلوريد الزئبق Mercuric Chloride H_9Cl_2	حامض الكروميك Chromic acid CrO_3
التركيز التيامى	٩٥ - ١٠٠ ٪	محلول مائى مشبع ١,٢ ٪	محلول مائى مشبع ٦ - ٧ ٪	محلول مائى ٠,٥ ٪
خاصية الاكسدة والاختزال	مختزل	مؤكسد	مؤكسد قوى	مؤكسد قوى
التفاعل مع البروتين	مجلط قوى	مجلط	مجلط كامل القوة	مجلط كامل القوة بإضافات
التفاعل مع البروتين النووى	—	يرسب البروتين مع ترك الـ DNA فى المحلول	مجلط ضعيف	مثبت جيد ومجلط للبروتين النووى
التفاعل مع الدهون	--	--	يكشف البروتينات الدهنية ولايثبتها	مثبت جيد ومؤكسد
التفاعل مع الكربوهيدرات	--	غير مثبت يربط الجليكوجين إلى البروتين	جيد للسكريات العديدة المخاطية	مؤكسد يتغير ولكن دون تثبيت
معدل النفاذية	سريع جداً	بطئ جداً	متوسط	بطىء
إحداث الانكماش	قوى	قوى وبالأخص بعد شمع البارافين	بسيط	متوسط
إحداث التصلب	حاد	يجعل الأنسجة أكثر ليونة	متوسط	متوسط
التأثير على الصبغات	تغير بسيط	يجعل السيتوبلازم محبًا للحمضة	يجعل السيتوبلازم قابلاً للصبغات القاعدية والحامضية	يجعل السيتوبلازم محبًا للحمضة بقوة
الغسيل	بالكحول	بالماء أو بالكحول	٧٠ ٪ كحول إيثايل ويود	بالماء

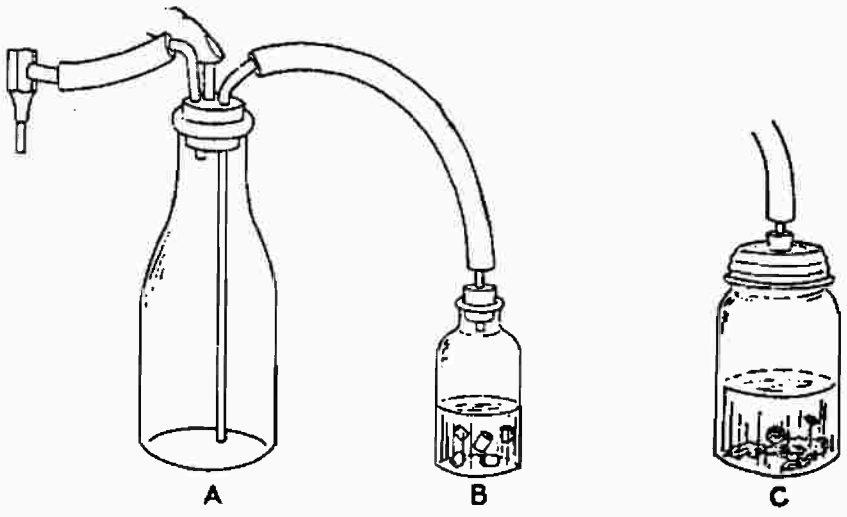
جدول (٢ - ٢): خصائص المثبتات غير المجلطة للخلايا Noncoagulant Fixatives .

المثبتات / الخصائص	الفورمالدهيد CH_2O	رباعي أوكسيد الأزميوم $O_2\ O_4$	ثاني كرومات البوتاسيوم $K_2\ Cr_2\ O7$	حامض الخليك CH_3COOH
التركيز القياسي	٤ ٪ محلول مائي (١٠ ٪ فورمالين)	١ ٪ محلول مائي	١,٥ ٪ محلول مائي	٥ ٪ محلول مائي
خاصية الاكسدة والاختزال	مختزل	مؤكسد	مؤكسد	مؤكسد
التفاعل مع البروتين	غير مجلط ، ثابت ولايذوب في الماء	غير مجلط	غير مجلط (عند pH أعلى من ٤)	يبيه البروتين (يحلل البروتين مائيا) ولايحدث تثبيتا
التفاعل مع البروتين النووي	--	--	يذيب الـ DNA	يرسب البروتين النووي
التفاعل مع الدهون	حافظ جيد	مثبت	مثبت جيد	غير مثبت ويذيب بعض الدهون
التفاعل مع الكربوهيدرات	لايحدث تثبيتا ويصبح الجليكوجين غير حر	--	--	--
معدل النفاذية	متوسط ، ذو فعل بطيء	يتخلل ببطء	سريع	سريع نسبيا
إحداث الانكماش	يحدث إنتفاخات ببطة أثناء التثبيت وانكماش بعد شمع البرافين	تغير قليل	انكماش قوي بعد شمع البرافين	إنتفاخات وانكماش قوي بعد شمع البرافين
إحداث التصلب	قوي	قوي	ضعيف جدا	ضعيف جدا ويمنع حدوث التصلب الناتج في الكحول
التأثير على الصبغات	يجعل السيتوبلازم محبا للقلوية	يجعل السيتوبلازم محبا للقلوية	متغير مع استجابة جيدة للصبغات الحامضية	السيتوبلازم محب للحموضة والكروموسومات للقلوية
الغسيل	بالماء	بالماء	بالماء	بالكحول

إجراء عملية القتل والتثبيت

تجمع العينات النباتية المطلوب عمل قطاعات مستديمة منها ، مع مراعاة الاحتياطات السابق الإشارة إليها ، وتقطع إلى أجزاء صغيرة تناسب العمليات التالية ، وتوضع فى أنابيب العينات تمهيداً لإجراء عملية القتل والتثبيت فى الحال . وقد تستخدم زجاجات العينات والتى تحتوى على كميات كبيرة نسبيا من محلول القتل ، وخاصة مع المواد الغضة ذات المحتوى المائى العالى أو كبيرة الحجم ، والتى يمكن أن تحدث تخفيفًا لتركيز المحلول . بعد إجراء الغسيل والتجفيف الجزئى يمكن نقل العينات إلى زجاجات أصغر لإجراء باقى العمليات عليها .

تكون الثغور والثنايا والتجاويف الأخرى لأعضاء النبات محتوية على فقاعات هوائية ، والتى بدورها تمنع تخلل المحلول للنسيج والتشبع به . إذا لم تنغمر الأجزاء النباتية فى المحلول مباشرة فيتم توصيل الزجاجات لمضخة تفريغ ، ويتم تفريغ الهواء من الزجاجات لمدد قصيرة وعلى مرات متتالية ؛ حتى يتم غمر أو سقوط كل الأجزاء النباتية فى المحلول ، أو على الأقل تصبح تحت سطح المحلول إن لم تسقط إلى قاع المحلول . ويتم استخدام زجاجة أمان لمنع الماء من العودة إلى زجاجات العينات . كما أن النقر بلطف على الزجاجة يساعد على إخراج فقاعات الهواء . أما العينات الطافية بطبيعتها . . فيجب أن توضع فى زجاجة طويلة ، تحتوى على محلول القتل ، على أن تظل مغمورة تحت سطح المحلول بواسطة سدادة من الشاش . هذا ويلزم وجود زجاجة ذات فوهة واسعة وغطاء حلزونى محكم ، من أجل إجراء عملية التفريغ للعينات الكبيرة (شكل ٢ - ١) . عندما تصبح كل القطع النباتية مغمورة بعد انتهاء التفريغ ، ادفع القطع الطافية بعد ذلك ، وستجد أن أغلبها ستسقط . قم بعدها بإزالة واستبعاد كل القطع التى تطفو بعد التفريغ والدفع .



شكل (٢ - ١) : إجراء التفريغ لزجاجات العينات المحتوية على محلول القتل .

A - زجاجة أمان مزودة بصمام يدوى.

B - زجاجة العينات.

C - زجاجة كبيرة للعينات الكبيرة.

العينات التى يوجد صعوبة فى تفريغها من الهواء (العينات الصلبة والشمعية والوبرية والبراعم .... إلخ) لايتم تخللها أو تشربها بالمحاليل تمامًا ، وعلى هذا يجب إعادة تفريغها قرب نهاية خطوات التجفيف ، ويعاد ثانية فى المرة الأخيرة لتغيير مذيب شمع البارافين وقبل إضافة الشمع . قم بتوصيل زجاجة أمان أخرى بين زجاجة الأمان الاعتيادية وزجاجة العينات ؛ وفائدة هذه الزجاجة الثانية هو منع دخول بخار الماء عند إيقاف مضخة التفريغ ، ويتم ذلك بوضع طبقة عميقة من كلوريد الكالسيوم ، وطبقة من القطن فى هذه الزجاجة . ويمكن استعمال جهاز تفريغ للقتل ، كما يمكن استخدامه للعمليات التالية لغمر العينات فى المحاليل .

تركيب المحاليل المستخدمة فى القتل والتثبيت Fixative mixtures

(١) محلول الفورمالين - الخليك - الكحول

Formalin - Aceto - Alcohol (F.A.A. Solution)

يعتبر .F.A.A من أحسن المحاليل المستعملة فى القتل والتثبيت ، ويمكن ترك الأنسجة فيه مدد طويلة دون أن تتلف .

وهو من المحاليل الممتازة كثيرة الاستعمال لسرعة تخلله الأنسجة النباتية ، ويعتبر المحلول القياسى Standard fixative فى الميكروتكنيك النباتى حيث يفوق استخدامه المحاليل الأخرى - ويحضر كالتالى :

٥٠ مل كحول إيثايل ٩٥ ٪

٥ مل حامض خليك ثلجى

١٠ مل فورمالين

٣٥ مل ماء مقطر

ويمكن أن يحل حامض البروبيونيك محل حامض الخليك ، ويرمز للمحلول فى هذه الحالة بالحروف .F.P.A .

يستعمل الـ .F.A.A مع كثير من الأجزاء النباتية مثل الجذور المسنة والسوق العشبية الصلبة والأفرع الخشبية وخاصة إذا كانت الدراسة منصبة على ناحيتى الشكل والتركيب ، كما أنه يوافق الأنسجة المصابة إذا كان الميسيليوم داخلها أما إذا كان الميسيليوم سطحيًا فإنه يسبب بلزمة للهيفات الهوائية ، لهذا يستعمل المحلول المائى التالى الخالى من الكحول الذى يسبب البلزمة .

١٠ مل فورمالين + ٥ مل حامض خليك ثلجى + ٨٥ مل ماء مقطر

هناك تركيبة أخرى آخذه فى الإنتشار وهى إضافة بللورات من السليمانى إلى محلول الـ .F.A.A إلى درجة التشبعto saturation فيصبح المحلول ذا مقدرة على التخلل والتجميد الصلب Penetration and hardening كما أنه يفيد فى دراسة الأنسجة المصابة بالبكتريا ، ويجب ملاحظة عدم حفظ الأنسجة عامة فيه لمدة طويلة تزيد عن أسبوع .

طريقة الغسيل

ثبت لمدة ٤٨ ساعة على الأقل ثم انقل إلى كحول إيثايل ٥٠ ٪ أو ٧٠ ٪ وغير مرتين أو ثلاث للتخلص من حامض الخليك والفورمالين (الغسيل Washing) ثم بعد ذلك استمر فى خطوات التجفيف . أما فى حالة وجود السليمانى فانقل النماذج إلى المحلول الأساسى (الـ F.A.A. الخالى من السليمانى) وغيره ثلاث إلى أربع مرات ، وبذا يمكن الحفظ لمدد طويلة إذا أريد ذلك ، وإلا فاتبع الخطوات السابقة للتجفيف بعد إزالة السليمانى (أى النقل إلى الكحول) .

* لاتغسل العينات بالماء بعد هذا المحلول .
* مدة القتل والتثبيت :
  - الأوراق الحديثة : ١٢ ساعة
  - الأفرع الغضة : ٢٤ ساعة
  - السوق الخشبية : أسبوعين على الأقل

(٢) محاليل كروميك - خليك (Chrom - Acetic Fluids)

Chromic acid and Acetic acid Mixtures

يوضح الجدول التالى تركيب بعض هذه المحاليل :

الكيماويات / ملليلتر	محاليل (كروميك - خليك)				
	ضعيف (١)	ضعيف (٢)	متوسط (١)	متوسط (٢)	قوى
حامض كروميك ١ ٪	٣٠	٥٠	٥٠	٧٠	٩٧
حامض خليك ١ ٪	٧٠	٥٠			
حامض خليك ١٠ ٪			١٠	٢٠	
حامض خليك ثلجى					٣
ماء مقطر			٤٠	١٠	

تستعمل المحاليل الضعيفة للأنسجة الرهيفة والغضة مثل الطحالب والفطريات والحزازيات والأطوار الجاميطية للتيريديات والعلبة بالحزازيات القائمة والاجزاء المماثلة سهلة التخلل ، أما المحاليل المتوسطة فتستعمل للقمم النامية ، وتستعمل المحاليل القوية للعينات الخشبية والأوراق الصلبة .

وتتوقف المدة اللازمة للتثبيت على طبيعة النموذج ففى حالة الطحالب يكفى بضع دقائق ، أما فى حالة الأجزاء الصغيرة السن مثل الأوراق الحديثة وقمم الجذور فيكفى ١٢ - ٢٤ ساعة أما الأجزاء الكبيرة الحجم فلاتقل المدة اللازمة عن ٢٤ ساعة . وقد لوحظ أن زوال الكلوروفيل بتكسره من السطوح المقطوعة وامتداد ذلك إلى داخل النماذج مقياس طيب على سرعة التخلل وإتمام عملية التثبيت .

هذه المحاليل لاتصلح لتخزين (حفظ) النماذج لأنها تجعل الأنسجة هشة فضلاً عن أنها تعطى نتائج سيئة فى الصبغ إذا مكثت النماذج فيها مدد طويلة ، ولذا يجب إجراء عملية الغسيل والتجفيف بعد مضى المدة اللازمة لإجراء عملية التثبيت . وتغسل النماذج بعد قتلها فى هذه المحاليل بالماء جيدًا لعدة مرات ، والأفضل أن يتم ذلك بإمرار تيار من الماء الجارى . ويجب ملاحظة أن تعامل النماذج الغضة برفق لأن هذه المحاليل لاتسبب تجميد النماذج تمامًا ، رغم إنها تقتلها ، أما النماذج المتماسكة فلايخشى عليها من إمرار تيار من الماء أثناء غسلها .

(٣) محاليل الكروميك - خليك - اوزميك

Chromic, Acetic, and Osmic Acid Mixtures

غالبًا ما تستعمل المحاليل المحتوية على حامض الأوزميك فى الأغراض السيتولوجية وهى تسبب اسوداد للأنسجة ، لذا يجب أن تجرى لها عملية تبييض Bleaching قبل الصبغ ، والمحاليل المحتوية على حامض الأوزميك ضعيفة الانتشار . ولتبييض النماذج توضع فى محلول ٥ ٪ من فوق أكسيد الأيدروجين حتى يتم التبييض .

ويوضح الجدول التالى تركيب بعض هذه المحاليل :

الكيماويات / ملليلتر	محاليل (الكروميك - خليك - أوزميك)			
	Flemming			Chamberlain	Taylor
	ضعيف	متوسط	قوى		
حامض كروميك ١ ٪	٢٥	٥٠	٧٥	٩٦	
حامض كروميك ١٠ ٪					٠,٢
حامض خليك ١ ٪	١٠				
حامض خليك ١٠ ٪		١٠			٢, -
حامض خليك ثلجى			٥	٣	
حامض أوزميك ٢ ٪	١٠	١٠	٢٠	١	١,٥
ماء مقطر	٥٥	٣٠			٨,٣
مالتوز	--	--	--	--	١٥, جم

يستعمل المحلول القوى من فلمنج فى حالة الأنسجة الصلبة ، أما الضعيف فيستعمل مع الأنسجة الرهيفة . يناسب محلول شمبرلين الطحالب الغضة والفطريات الخيطية والكائنات الحية المماثلة ، ولايصلح للاستعمال مع القمم النامية للجذور أو الساق . يعتبر محلول تيلور من المحاليل المفضلة جداً لقتل عينات الدهك Smears ويحقق نتائج مرضية للغاية لحفظ التراكيب الكروموسومية ، وتؤدى إضافة المالتوز إلى الحفاظ على هيئة التوابع Satellites وعدم طمس الاختناقات بها .

تتوقف المدة اللازمة للتثبيت على طبيعة النموذج ، ففى حالة الطحالب يكفى بضع دقائق ، أما فى حالة الأجزاء الصغيرة العمر مثل الأوراق والقمم النامية فيكفى لها ١٢ ساعة ، أما الأجزاء الكبيرة العمر فيلزم لها مدة لاتقل عن ٢٤ ساعة .

لاتصلح هذه المحاليل لتخزين العينات النباتية لأنها تجعل الأنسجة هشة فضلاً عن أنها تعطى نتائج سيئة فى الصبغ إذا مكثت النماذج فيها لفترة طويلة ، ولذلك يلزم إجراء عملية التجفيف بعد انقضاء الفترة اللازمة لإجراء عملية التثبيت .

وتغسل العينات النباتية بعد قتلها فى هذه المحاليل جيداً بالماء عدة مرات ، ويفضل الماء الجارى مع العناية بمعاملة العينات الغضة برفق .

(٤) محاليل الكروميك - خليك - فورمالين

Chromic, Acetic, and Fomaldehyde Mixtures

يوضح الجدول التالى تركيب هذه المحاليل :

الكيماويات / ملليلتر	مجموعة نافاشين (كراف) Nawaschin type (Craf)						بوين Bouin	مجموعة آلين - بوين Allen - Bouin		
	نافاشين	I	II	III	IV	V		I	II	III
حامض كروميك ١ ٪	٧٥	٢٠	٢٠	٣٠	٤٠	٥٠		٥٠	٥٠	٢٥
حامض خليك ١ ٪		٧٥								
حامض خليك ١٠ ٪			١٠	٢٠	٣٠	٣٥		٢٠		٤٠
حامض خليك ثلجى	٥						٥		٥	
فورمالين	٢٠	٥	٥	١٠	١٥	١٥	٢٥	١٠	١٠	١٠
حامض بكريك (مشبع مائيا)							٧٥	٢٠	٣٥	٢٥
ماء مقطر			٦٥	٤٠	٢٠					

يضاف الفورمالين قبل الاستعمال مباشرة إلى أى تركيبة يقع عليها الاختيار من مجموعة نافاشين (كراف) . بعد مدة تبلغ عدة ساعات قليلة من إضافة الفورمالين إلى مخلوط حامض الكروميك وحامض الخليك نجد أن المحلول قد تغير ، وبعد عدة أيام يصير لون الكروميك زيتونيًا أو أخضر ، قبل الوصول إلى هذا اللون تكون عملية القتل قد تمت ، وتصبح وظيفة هذا المحلول المتغير قاصرة على تصلب الأنسجة وحفظها ، ويمكن حفظ الأنسجة فى هذه المحاليل ما يقرب من ٥ سنوات مع محافظتها على إعطاء تحضيرات هيستولوجية ممتازة . وأقل مدة للقتل فى هذه المحاليل [مجموعة نافاشين (كراف)] هى ١٢ ساعة ، ويستحسن ترك النماذج لعدة أيام لتكتسب الأنسجة صلابة Hardening ، دون خوف من أى تشويه قد يحدث للأنسجة أو اسوداد فى اللون .

يعتبر محلول بوين Bouin ممتازاً فى قتل قمم الجذور خاصة فى الطور النهائى لانقسام الخلية الذى يعرف بالطور النهائى Telophase ، كما يستعمل بنجاح فى دراسة الأكياس الجنينية Embryo sac . وهو محلول ثابت ويمكن تجهيزه بكميات مناسبة للاستعمال

بالمعمل أو الحقل . وأقل مدة للقتل فى هذا المحلول هى ١٢ ساعة للأجزاء الرهيفة ، أما الأنسجة البالغة فلا تقل المدة عن ٤٨ ساعة .

هذا المحلول لايصلح لحفظ النماذج لذا يجب عقب أن تنقضى المدة اللازمة للقتل غسل النماذج فى كحول ٢٠ أو ٥٠ ٪ أو يتم الغسيل فى الأسيتون ، ولايجب أن تتم عملية الغسيل فى الماء . وعقب الغسيل يجب الاستمرار فى عملية التجفيف .

ينتج عن إضافة حامض الكروميك (فى بعض الحالات يضاف مع حامض الكروميك يوريا) إلى محلول بوين Bouin المحلول المسمى ألين - بوين Allen - Bouin ، وهذا المحلول يستخدم فى الأبحاث السيتولوجية ، ويجب إضافة الفورمالين قبل الاستعمال مباشرة ، ويصلح هذا المحلول لحفظ النماذج إلى عدة أشهر ، ومن المحتمل أن يتم تصلب النماذج فى هذا المحلول فى مدة تقل عن أسبوع .

(٥) محلول كارنوى Carnoy's Fluid

يتركب من :

١٠ مل حامض خليك ثلجى

٦٠ مل كحول مطلق

٣٠ مل كلوروفورم

يتميز هذا المحلول بقدرته الفائقة على الانتشار حيث يتخلل الأنسجة بسرعة كبيرة ، لذا يمكن استعماله للنماذج الصلبة والشمعية والوبرية التى يصعب انتشار المحاليل الأخرى فيها ، كما يستعمل فى تثبيت الأجسام الحجرية Sclerotia عند فحص تركيبها التشريحى . يتم النقل مباشرة أو بعد ١٠ دقائق على الأكثر إلى كحول مطلق حيث تغسل فيه العينات بتغيير الكحول عدة مرات ، حتى يزول كل أثر لرائحة الكلوروفورم وحامض الخليك ، يتم الترويق فى الزيلول ثم الترقيد فى شمع البارافين .

* تجنب استعمال هذا المحلول عند إختبار الدهون لأن الكلوروفورم يذيبها .

تعطى المحاليل سابقة الذكر « تثبيت حامضى الأثر » مما يحافظ بصورة جيدة وعلى وجه الخصوص على الكروموسومات ، والنويات ، والتركيب المغزلى . بينما يتم تحلل كل من

الميتوكوندريا و البلازما النووية Nucleoplasm ويتم حفظ السيتوبلازم بشكل حبيبى . وتعتبر هذه الصورة هى المفضلة لأغلب الدراسات الخاصة بتركيب النبات .

فى بعض الدراسات السيتولوجية يكون المطلوب الحفاظ على الميتوكوندريا والبناء السيتوبلازمى المصاحب . فى مثل هذه الحالات يستخدم محلول قتل يعطى « تثبيتًا قلوى الأثر » . مثل هذه المحاليل تحفظ الميتوكوندريا والبلازما النووية وفى بعض الحالات تحفظ النويات والفجوات الخلوية بينما يتم تحلل التركيب المغزلى والكروماتين . ولإجراء دراسات دقيقة فى هذا المجال السيتولوجى فعلى الباحث أن يبتكر لنفسه تكنيكًا خاصًا مبنيًا على دراسات موسعة من المراجع . وعلى أية حال يمكن عمل شرائح تظهر فيها الميتوكوندريا بصورة مرضية لأغراض التعليم باستخدام تعديل (Zirkle's) لمحلول (Erliki's) .

Zirkles' modification of Erliki's fluid.

ويتركب من :

٤٠٠ مل	ماء مقطر
٢,٥ جم	بيكرومات البوتاسيوم
٢,٥ جم	بيكرومات الأمونيوم
٢,٠ جم	كبريتات النحاس

يتم التثبيت لمدة تتراوح بين ٢٤ - ٤٨ ساعة ، ثم الغسيل فى الماء ، ثم التجفيف والترقيد فى شمع البارافين .

تعتبر المصطلحات المستخدمة للدلالة على محاليل القتل ملائمة جدًا لإعطاء تعليمات سواء كانت شفهية أو مكتوبة ، وكذلك لتسجيل تسلسل خطوات العمل . وإطلاق اسم عالم على مجموعة من المحاليل التى ابتكرها لا يعتبر دائمًا كافيًا لتعريفها ، وذلك لأن مواصفات المركب لابد وأن تختلف باختلاف العينات ، وتعريف المركب برقم أيضًا لايعتبر وصفًا كافيًا إلا من خلال مجموعة من العلماء المرتبطين معًا . والغرض من المصطلح هنا أن يكون مشتملاً على :

(أ) نوع المركب ويشار إليه عن طريق اسمه أو اختصاره .

(ب) مواصفات المركب ، ويشار إليها بنسب مئوية .

فمثلاً مواصفات مادة صلبة مثل حامض الكروميك يشار إليها كنسبة مئوية بالوزن ، والسوائل مثل حامض الخليك الثلجي السائل فيشار إليه كنسبة مئوية بالحجم . وعلى سبيل المثال فإن أحد مسميات محلول (الكروميك - خليك) هو {C-A 0.5 - 0.5} وتعنى ٠,٥ ٪ حامض كروميك وزنًا ، و ٠,٥ ٪ حامض خليك حجمًا . أحد محاليل تركيبة Nawaschin (Craf) هو {Craf 0.2 - 1.0 - 10.0} ويعنى ذلك أن المحلول يحتوى على ٠,٢ ٪ حامض كروميك و ١ ٪ حامض خليك و ١٠ ٪ محلول فورمالدهيد تجارى . وأحد مركبات Allen - Bouin يعرف بـ {A-B 0.2 - 4.0 - 10.0 - 25.0} ، وهو يحتوى بالإضافة إلى محتويات (Craf) على محلول مائى مشبع من حامض البكريك ٢٥ ٪ حجمًا.

يعتبر النظام السابق للمصطلحات الخاصة بمحاليل القتل دقيقًا وجيد للوصف وملائمًا ، ويستخدمه المبتدئون والمتخصصون بنجاح .

محاليل حفظ النماذج النباتية

كثيرًا ما يحتاج الأمر إلى حفظ الأنسجة والنماذج المعدة للفحص إلى فترة طويلة لحين الحاجة إلى استعمالها . وأكثر محاليل الحفظ استعمالاً الكحول والفورمالين .

١ - الكحول : يستعمل عادة كحول ٧٠ ٪ ، توضع فيه النماذج بعد تثبيتها وتترك لحين الحاجة إليها ، ويستعمل كحول ٨٥ ٪ للنماذج الرهيفة اللينة ، فإن ذلك يساعد على تصلبها وجعلها أصلح للقطع .

٢ - الفورمالين : يستعمل عادة ٥ ٪ فورمالين وهو محلول جيد للحفظ ، وأصلح من الكحول عند حفظ النماذج مباشرة بعد جمعها ، دون تثبيت فإنه قاتل ومثبت لابأس به .

٣ - الفورمالين - كحول : من أجود محاليل الحفظ ويفضل كثيرًا عن استعمال أيهما منفرداً ، ويحضر بالنسب الآتية :

٢ مل فورمالين + ١٠٠ مل كحول ٧٠ ٪

أو ٥ مل فورمالين + ١٠٠ مل كحول ٥٠ ٪

٤ - الجلسرين - كحول: يستعمل لحفظ النماذج التى يخشى عليها أن تتقصف أو تتصلب عند التحضير ، ويتكون من :

٥٠ مل جلسرين + ١٠٠ مل كحول ٥٠ ٪