

Plant Microtechnique

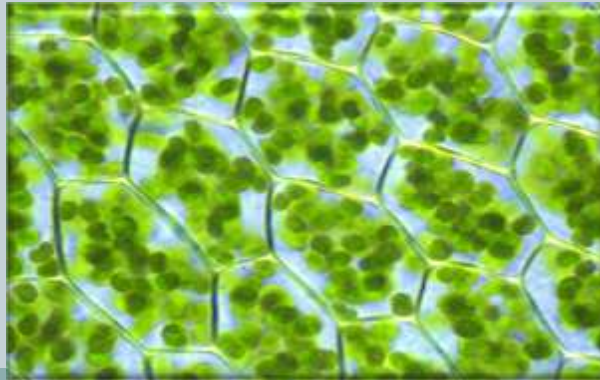
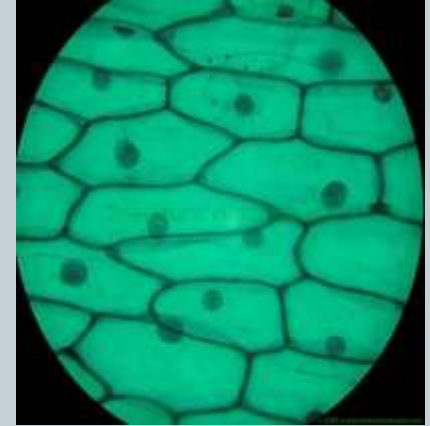
BOT 213



التحضيرات المجهرية النباتية

213 نبت

محاضره 6



Chemical Fixatives

Simple Fixatives

- ✓ Formaline
- ✓ Mercuric chloride
- ✓ Osmic acid
- ✓ Picric acid
- ✓ Acetone
- ✓ Ethyle alchohol
- ✓ Osmium tetroxide
- ✓ Osmic acid

Compound Fixatives

Microanatomical

Formal Saline
Neutral buffer Formaline
Zenker's fluid
Bouin's fluid

Cytological

Nuclear

Carnoy's Fluid

Cytoplasmic

Champy's Fluid

Histochemical

Cold acetone
Ethanol

3 - Simple fixatives:

1 - **Glacial Acetic Acid:**

Glacial Acetic acid ($\text{CH}_3 \text{COOH}$) is a simple **non-coagulant fixative**, It penetrates fast to the sample parts, when it is used as a single fixative causes swelling of the sample, therefore it always mixed with other primary fluids to form a compound fixative.

ثالثاً - المحاليل الأولية للمثبتات :

1 - حمض الخليك الثلجي **Glacial Acetic Acid** :

حمض الخليك ($\text{CH}_3 \text{COOH}$) الثلجي (المركز) من المواد الأولية **غير المخترة**،

سريع النفاذ إلى أجزاء العينة،

استعماله كمثبت منفرد يسبب انتفاخاً للعينة، دائماً يخلط مع مواد أولية أخرى لتكوين مثبت مركب.

2 - Ethyl alcohol (Ethanol):

(C₂ H₅ OH) of the initial solutions, **coagulant fixative** and moderately penetrate to sample parts. it penetrates fast to the sample parts, this type is used in many plant fixation

2 - الكحول الإيثيلي (Ethyl Alcohol (Ethanol)

الكحول الإيثيلي (C₂ H₅ OH) من المحاليل الأولية، وسرعة النفاذ إلى أجزاء العينة معتدلة، يستخدم في كثير من المثبتات النباتية.

3 – Chromic acid :

1 %Chromic acid (H_2CrO_4). rarely used alone, preferably mixed with acetic acid or Osmic acid. It penetrate the sample parts slowly and does cause sample hardness.

3-1% حمض الكروميك Chromic acid أو ثالث أكسيد الكروم : Chromium trioxide

نادراً ما يستخدم لوحده، ويفضل مزجه بحمض الخليك أو حمض الأزميك.
ينفذ إلى أجزاء العينة ببطء ولا يعمل على صلابة العينة

4 - Formaldehyde:

Formaldehyde (CH_2O) is a toxic colorless gas **non-coagulant** fixative.

Formalin:

Formalin is the trade name used for an aqueous solution of formaldehyde containing 35 -40% formaldehyde gas by weight.

الفورمالديهايد (CH_2O) هو غاز سامة عديم اللون، ويعتبر مثبت غير مخثر.
الفورمالين:

الفورمالين هو الاسم التجاري المستخدم في محلول مائي من الفورمالديهايد

5 - Picric acid :

Picric acid ($C_6H_2(NO_2)_3 OH$) simple **coagulant solution**, slow penetration through the sample parts and cause strong shrinking of the sample. So it mixed with other solution. .

5- حمض البكريك Picric Acid :

حمض البكريك ($C_6H_2(NO_2)_3 OH$) من المحاليل الأولية المخثرة للبروتين، بطئ النفاذ في العينة ويسبب تقلصاً (انكماشاً) شديداً للعينة، لذا يمزج مع مواد أولية أخرى.

6- Potassium dichromate:

Potassium dichromate ($K_2 Cr_2 O_7$) simple non-coagulant solution of protein. It makes the tissue of the sample so soft that it is difficult to cut.

6 - ثاني كرومات البوتاسيوم Potassium dichromate :

ثاني كرومات البوتاسيوم ($K_2 Cr_2 O_7$) من المحاليل الأولية غير المخثرة للبروتين، تجعل أنسجة العينة لينة لدرجة انه يصعب قطعها

7- Mercuric Chloride:

Mercuric chloride (Hg Cl_2) simple solutions coagulate the protein. it is medium penetrating to sample parts, gives rigidity to sample and does not make shrinking or distorting.

7- كلوريد الزئبقيك : Mercuric Chloride

كلوريد الزئبقيك (Hg Cl_2) من المحاليل الأولية المخثرة للبروتين، متوسطة الاختراق لأجزاء العينة ، وتعطي صلابة للعينة ولا تتقلص أو تشوه.

8 - Osmium Tetroxide:

Osmium Tetroxide (OSO_4) yellow crystals, non-coagulant and when it dissolves in water become Osmic acid, a weak simple solutions is react with, It does not cause shrinking to the sample.

8 - رابع أكسيد الأوزميوم : Osmium Tetroxide

يتكون رابع أكسيد الأوزميوم (OSO_4) من بلورات صفراء، وعند ذوبانها بالماء تكون حمض الأوزميك، وهو حمض ضعيف ومن المحاليل الأولية غير المخثرة، ولا يسبب انكماش العينة.

Notes :

- 1 - There is no **one substance** that will successfully fix all components of a cell or tissue equally.
- 2 - It is necessary to **combine fixatives** in such a way so as to minimize the shrinking or swelling action of the various ingredients and to stabilize the various cell structures.
- 3 - Any fixation schedule should be regarded as a starting point from which the best method of fixation for a specimen will be developed.

ملاحظات

:

- 1 - لا توجد مادة واحدة من شأنها أن إصلاح جميع مكونات الخلية أو الأنسجة بنجاح.
- 2 - من الضروري الجمع بين المثبتات بطريقة من هذا القبيل للحد من تقلص أو تورم عمل مختلف المكونات وتحقيق الاستقرار في هياكل الخلايا المختلفة.
- 3- يجب اعتبار أي جدول تثبيت كنقطة انطلاق يتم من خلالها تطوير أفضل طريقة للتثبيت لعينة.

Fixative Fluids

Here are some commonly known Fixatives used to kill and fix plant samples include:

1. Formalin-aceto-alcohol (FAA)
2. Navaschin's fluid
3. Bouin's fluid
4. Carnoy's Fluid
5. Zenker's Fluid
6. Zirkle's Fluid
7. Chromic-acetic mixture
8. Acetic ethanol
9. Formaldehyde
10. Flemming without acetic
11. Allen's Fluid
12. Formalin and Alcohol
13. Sanfelice's Fluid

- 1 - الفورمالين الكحولي
- 2 - محلول نفاشين
- 3 - محلول بوين
- 4 - محلول كارنوي
- 5 - محلول زنكر
- 6 - محلول زركل
- 7 - مخلوط حمض الكروميك الثلجي
- 8 - الكحول الإيثيلي الخلي (مثبت فارمر)
- 9 - الفورمالدهايد
- 10 - محلول فلمنج بدون خل
- 11 - محلول ألن
- 12 - محلول الفورمالين والكحول
- 13 - محلول سانفيليس

1- Formalin– Acetic acid–Alcohol: FAA

Formalin–acetic acid–alcohol (FAA) is a good general fixative to plant samples. Compared to other fixatives. **Sample penetration is not particularly fast**. Due to the presence of alcohols, **shrinkage may occur**. You may vary the amount of acetic from 2 to 6% to modulate shrinkage and better preserve chromatin structure. Increase concentration of acetic to induce greater tissue swelling and to counteract alcohol shrinkage. Generally, samples are killed and hardened within 12–24 h. The fixative is stable and does not induce hardening, so samples may be stored in this solution. The wooden parts of stems and roots the fixation times will be one weeks.

1 - محلول الفورمالين الكحولي - acid- Formalin-Acetic Alcohol (FAA) :

الفورمالين - حمض الخليك - الكحول (FAA)

هو مثبت عام جيد للعينات النباتية بالمقارنة مع المثبتات الأخرى. اختراقه العينة ليس سريع بشكل خاص. بسبب وجود الكحول، قد يحدث الانكماش. قد تختلف كمية الخل من 2 إلى 6٪ لتعديل الانكماش والحفاظ على بنية الكروماتين بشكل أفضل. زيادة تركيز الخل قد يؤدي إلى انتفاخ الأنسجة أكبر لمواجهة انكماش الكحول. عموماً، يتم قتل العينات وتصلب في غضون 12-24 ساعة. التثبيت مستقر ولا يحفز تصلب، لذلك قد يتم تخزين العينات في هذا المحلول. الأجزاء الخشبية من السيقان والجذور ستكون أوقات التثبيت ستكون أسابيع واحدة.

1 - محلول الفورمالين الكحولي - Formalin-Acetic acid : Alcohol (FAA)

الفورمالين - حمض الخليك - الكحول (FAA) هو مثبت عام جيد لتثبيت العينات. مقارنة مع المثبتات الأخرى. اختراقه للعينات ليس سريع بشكل خاص بسبب وجود الكحول . يستعمل هذا المثبت للعينات النباتية التي تحتوي على العناصر الخشبية كالساق والجذر والورقة وأجزاء الزهرة، ويعتبر من أفضل المحاليل المثبتة وأكثرها شيوعاً، وأنسبها لهذه الأجزاء من النبات، وتختلف مدة ترك العينات في هذا المثبت من عينة إلى أخرى، فالعينات الطرية كالورقة وأجزاء الزهرة التي لا تحتوي على كمية كبيرة من العناصر الخشبية تظل في المثبت لمدة 12 ساعة ولا تزيد عن ذلك، لأن زيادة الوقت قد تجعل العناصر الخشبية أكثر صلابة من الخلايا الأخرى المجاورة في العينة، مما يسبب ظهور بعض الصعوبات عند عملية التقطيع، كتمزق تلك الخلايا المجاورة أو انضغاطها وتشويه أشكالها. أما العينات النباتية ذات العناصر الخشبية كالسيقان والجذور الحديثة فالمدة المناسبة لبقاء العينة في المحلول حوالي 24 ساعة، أما الأجزاء الخشبية كالسيقان والجذور المسنة فإن مدة التثبيت تكون أسبوعاً.

2 - Carnoy's Fluid:

Carnoy's fixative is a chloroform-containing fixative. It penetrates tissues extremely rapidly and can fix small tissue pieces in minutes rather than the hours required for other fixatives (Chamberlain, 1932; Sass, 1958). Delicate tissues can be damaged when transferred from aqueous solutions to this fixative, due to the extreme hydrophobicity of chloroform and resultant rapid tissue dehydration. Reserve Carnoy's for more hard samples. This fixative has traditionally been used for cytological structures. Fix small tissue pieces approximately 1 h, wash several times in absolute ethanol, infiltrate, and embed immediately. (Sass, 1958; Golubovskaya, 1994).

تثبيت كارنوي يحتوي على الكلوروفورم. يخترق الأنسجة بسرعة كبيرة ويمكن ان يثبت قطع الأنسجة الصغيرة في دقائق بدلا من الساعات اللازمة لثبات أخرى. يمكن أن تتلف الأنسجة الحساسة عند نقلها من حلول مائية إلى هذه المثبتة، نظرا لوجود الكلوروفورم المسبب لجفاف الأنسجة السريع. احتياطي كارنوي لعينات أكثر صعوبة. تم استخدام هذا المثبت تقليديا للهياكل الخلوية. تثبيت قطع الأنسجة الصغيرة حوالي 1 ساعة، تغسل العينة عدة مرات في الإيثانول المطلق، ثم التشريب، فالغمر على الفور.

2 - محلول كارنوي Carnoy's Fluid :

من المحاليل المهمة في الدراسات السيتولوجية وخاصة دراسة الكروموسومات، ولكن شدة سحبه للماء قد تسبب تشويهاً سيتوبلازمياً أو نسيجياً، ولكن نفاذيته إلى الخلايا والأنسجة لها أهمية في الدراسات التشريحية للتراكيب الناعمة أو الراتنجية أو غير المنفذة التي يجب حفظها كاملة، أن المدة اللازمة لبقاء العينة النباتية في هذا المحلول (كلقم النامية للجذور) حوالي ١٥ دقيقة، أما المتوك Anthers فتحتاج إلى ساعة واحدة، ثم بعد الانتهاء من التثبيت تغسل العينة بالكحول الإيثيلي المطلق.

3 - Farmer's Fluid:

Farmer's fluid is an anhydrous fixative solution that causes rapid dehydration and fixation. As with Carnoy's fixative, the rapid exchange of tissue water for fixative can cause extreme cellular disruption. However, this fixative is excellent for cytological investigations (Sass, 1958; Golubovskaya, 1994).

3- محلول فارمر الكحول الإيثيلي الخلي (مثبت فارمر) Farmer's Fluid

هو محلول تثبيتي لامائي يسبب الجفاف السريع والتثبيت. كما هو الحال في مثبت كارنوي، يسحب الماء من العينة بشدة وقد يتسبب في تشويهاات سيتوبلازمية أو نسيجية. ومع ذلك، فهو مثبت ممتاز للفحوصات الخلوية (ساس، 1958؛ غولوبوفسكايا، 1994).

3- Chromic-acetic mixture:

It consists of two solutions one weak used to fix algae, fungi, mosses, and the other is the average concentration solution is used to fix the roots and ovaries (Table 4), and the sample should remain in this fixative for 24 hours and then washed with running water.

8 - مخلوط حمض الكروميك الثلجي Chromic-acetic mixture :

ويتكون من محلولين أحدهما ضعيف التركيز ويستعمل لتثبيت الطحالب والفطريات والحزازيات، والآخر محلول متوسط التركيز ويستعمل لتثبيت قمم الجذور والمبايض والبويضات (جدول رقم 4)، ويجب أن تظل العينة في هذا المثبت لمدة 24 ساعة ثم تغسل بالماء الجاري.

4 - Bouin's Fluid:

Bouin's solution is a popular fixative for embryonic studies e.g. Root and shoot apex, embryo sacs. Due to its excellent preservation of nuclei and chromosomes. Bouin's is very compatible with the trichrome stain due to its mordanting effect on the tissue.

Tissues fixed in Bouin's solution should be changed to 70% ethanol after 4-48 hours of fixation (*less than 24 hours is optimal*). If the tissues are fixed longer than this they tend to become brittle and difficult to section. (*NOTE: long term storage in 70% ethanol can lead to shrinkage of the tissue*)

محلول بوين هو تثبيت شهير للدراسات الجنينية مثال الجذر والقمم النامية للجذور المجموع الخضري بالأوكياس الجنينية. حافظ للنواة والكروموسومات.. يجب تغيير الأنسجة الثابتة من محلول بوين إلى 70٪ من الإيثانول بعد 4-48 ساعة من التثبيت (أقل من 24 ساعة مثالية). إذا تم تثبيت الأنسجة لفترة أطول من هذا، فإنها يمكن أن تصبح هشة وصعبة القطع. (ملاحظة: تخزين طويل الأجل في 70٪ الإيثانول يمكن أن يؤدي إلى انكماش الأنسجة)

4 - **محلول بوين Bouin's fluid** :

يستعمل هذا المثبت للعينات النباتية والحيوانية، والعينات النباتية التي تعطي نتيجة أفضل مع استعمال هذا المثبت هي قمم الجذور الإنشائية وكذلك الأكياس الجنينية، وهذا المحلول ثابت ويمكن تحضيره وتخزينه إلى وقت الحاجة، أو اصطحابه إلى مكان العينة سواء في الحقل أو غيره. ويجب أن تظل العينة في هذا المحلول 12 ساعة في الأقل للعينات الطرية الرقيقة من قمم الجذور السميكة فيمكن أن تظل العينة في المثبت لمدة 48 ساعة، بعد ذلك تغسل العينة في 20% كحول إثيلي ومن ثم تنقل إلى مرحلة سحب الماء.

5 - Navaschin's fluid:

Navaschin's fluid is used for plant tissues, Meristems and preparation of Mitosis phases to clarify the chromosomes,

5 - محول نفاشين Navaschin's fluid :

يستعمل هذا المثبت للأنسجة النباتية وخاصة القمم النامية وتحضير أطوار الانقسام غير المباشر وتوضيح الكروموسومات.

6 - Zenker's fluid fixation:

Contributed by [Martin Fitzpatrick](#), University of Birmingham, United Kingdom

Fixation with Zenker's fluid

- Following fixation wash samples overnight in running tap water prior to processing

6. محلول زنكر Zenker's Fluid :

يمتاز هذا المحلول بسرعة نفاذ معتدلة ويستعمل للدراسات النسيجية

والمدة اللازمة لبقاء العينة النباتية في هذا المحلول حوالي 24 ساعة ثم تغسل العينة بماء الصنبور الجاري لمدة 12 ساعة، ويفضل تحضير هذا المحلول قبل الاستعمال بوقت قصير لأنه محلول غير ثابت.

7 - Zirkle 's Fluid:

This is a good routine fixative giving excellent morphological preservation, although it is not used as much as it was in the past due to the mercuric chloride content

The sample should be placed in this solution for 24 to 48 hours and then washed subsequently with water several times and then washed with water.

7 - محلول زركل :Zirkle's Fluid

وهو مثبت قاعدي جيد لفحص العينات تحت المجهر الضوئي، وهو يثبت الأجسام السبحية وما يشابهها من الناحية التركيبية والكيميائية.
ويجب أن توضع العينة في هذا المحلول لمدة 24-48 ساعة ثم تغسل بعد ذلك بالماء عدة مرات وتنقل بعدها إلى عملية سحب الماء.

8- Formaldehyde:

Trade name for this fixative is formalin, which consists of 40% aqueous solution of formaldehyde gas, it should also alleviate this solution to reach the ratio to 5% formalin, and can also be used as a preservative solution

8- الفورمالدهايد Formaldehyde :

الاسم التجاري لهذا المثبت هو الفورمالين الذي يتكون من 40% محلول مائي لغاز الفورمالدهايد، ويجب أن يخفف هذا المحلول أيضاً إلى أن تصل النسبة إلى 5% فورمالين، ويمكن أن يستعمل أيضاً كمادة حافظة.

9 – Flemming without acetic:

Flemming without **acetic** used to fix thin plant tissue. Due to the slow penetration to the sample parts.

Fixation vary depending on the duration of plant samples or cellular components are ranging between 1 - 24 hours, the sample should be washed with tap water after Fixation.

9- محلول فلمنج بدون خل Flemming without acetic :

يستخدم محلول فلمنج بدون الخل للأنسجة النباتية الرقيقة نظراً لبطء نفاذه إلى أجزاء العينة.

وتختلف مدة التثبيت حسب العينات النباتية أو المكونات الخلوية فهي تتراوح ما بين 1 - 24 ساعة، ويجب غسل العينة بعد التثبيت بماء الصنبور الجاري.

10 - Acetic alcohol fixative

Acetic alcohol (**Farmer fixative**) : It uses for cytological studies especially chromosomes, consisting of absolute alcohol and glacial acetic acid of 3: 1, respectively, for example:

75 ml of absolute Ethyl alcohol.

25 ml Glacial acetic acid.

And placed the sample for 24 hours chromosomes appears clear, but non-existent or fade cytoplasmic organelles.

10- مثبت كحول الخليك :

كحول الخليك : يستخدم للدراسات الخلوية خاصة الكروموسومات ، يتكون من الكحول المطلق وحمض الخليك الثلجي بنسبة 3: 1 على التوالي ، على سبيل المثال:
75 مل من الكحول الإيثيلي المطلق.

25 مل حمض الخليك الثلجي.

وتوضع العينة لمدة 24 ساعة تظهر الكروموسومات واضحة ، ولكن العضيات السيتوبلازميه تتلاشى .

11 - Allen Fluid's fixative:

This solution uses as a fixative to most plant tissues that do not contain a large proportion of the wooden elements, **particularly the floral buds and developing apices.**

The sample must remain in this solution between 4 to 16 hours, and then transferred to 70% ethyl alcohol, several times until the yellow color of picric acid disappeared, preferably prepared when to be use due to the speed damaged.

11 - محلول ألن Allen's Fluid :

يستعمل هذا المحلول المثبت لمعظم الأنسجة النباتية التي لا تحتوي على نسبة كبيرة من العناصر الخشبية، وخاصة البراعم الزهرية والقمم النامية.
يجب أن تظل العينة في هذا المحلول ما بين 4 - 16 ساعة، ثم تنقل إلى كحول إثيلي تركيز 70٪ ، ثم يستبدل الكحول لعدة مرات حتى يزول اللون الأصفر لحمض البكريك، ويفضل تحضيره عند الاستعمال نظراً لسرعة تلفه.

12 - Formalin and Alcohol Fluid:

This fixative is used when studying the pollen tubes in the plant material, and consists of the following simple solutions:

1 - 100 ml Formalin

2 - 900 ml of 70% Ethyl alcohol

The fixation period ranging between 3 and 6 hours. Samples can be saved in this solution for a long time, and therefore it can be considered as a preservative solution.

12- محلول الفورمالين والكحول : Alcohol and Formalin

يستعمل هذا المثبت عند دراسة أنابيب حبوب اللقاح في الأنسجة النباتية، ويتكون من المادتين التاليتين :

Formalin

100 مل فورمالين

Ethyl alcohol

900 مل كحول الإيثيلي تركيز 70%

وتتراوح مدة التثبيت ما بين 3 - 6 ساعات، كما يمكن حفظ العينات في هذا المحلول لمدة طويلة، ولذا يمكن اعتباره مادة حافظة للعينات.

13 - Sanfelice Fluid:

This fixative is used to study the chromosomes in the cell divisions. It is not stable. So it should be prepared in two groups :

Group A:

1 - 100 mL of 2% aqueous

Chromic acid

2 - 60 ml 2% Glacial acetic acid

Group (b):

1 - 100 ml Formalin

2 - 60 ml of distilled water

Then mixed equal size of the two

groups (A, B) before directly use, and leave the sample in the new solution for an hour, then the sample washed with tap water for one hour, then the sample is passed on upward concentrations of ethyl alcohol starting of 30% to 70% , and then it can be saved in the final concentration (70%) at 4 ° C.

13 - محلول سانفيليس : Sanfelice's Fluid

يستعمل هذا المثبت لدراسة الكروموسومات في الانقسامات الخلوية، وهو مثبت غير ثابت لذا يحضر في الأول على شكل مجموعتين هما :

مجموعة (أ) :

100 مل من 2% حمض كروميك مائي Chromic acid

60 مل 2% حمض الخليك الثلجي Glacial acetic acid

مجموعة (ب) :

100 مل فورمالين Formalin

60 مل ماء مقطر Water

ثم يمزج حجم متساو من المجموعتين (أ ، ب) قبل الاستعمال مباشرة، وتترك العينة في المحلول الجديد لمدة ساعة، ثم تغسل العينة بماء الصنبور الجاري لمدة ساعة، بعد ذلك تمرر العينة على تراكيز تصاعدية من الكحول الإيثيلي ابتداء من تركيز 30% إلى 70% ، وعندها يمكن حفظها في التركيز الأخير (70%) عند درجة 4 °م.