

# Mikroskopické preparační techniky pro analýzu rostlinných stonků

Cílem cvičení je demonstrace rychlé a efektivní mikroskopické preparační metody, která byla vyvinuta na základě letitých zkušeností v laboratořích ve Švýcarsku (Swiss Federal Research Institute WSL, Birmensdorf). Tato metoda umožňuje připravit mikrořezy částí rostlinných těl ve vysoké kvalitě a tím nám poskytuje další možnost, jak doplnit informace o životě zkoumaných rostlin. Anatomická stavba je u všech rostlinných druhů unikátní.

## Úvod:

Kmeny – stonky dvouděložných rostlin tloustnou díky činnosti **kambia**. Kambium je druhotné dělivé pletivo a nacházející se mezi lýkem (**floém**) a dřevem (**xylém**). Buňky kambia rostou ve směru poloměru stonku. Kambium vytváří xylémové složky a floém vytváří části cévních svazků a dřeňové paprsky. Činnost kambia je ovlivňována vnějším prostředím.

**Herbochronologie** je anatomická metoda, která doplňuje informace o životě vytrvalých rostlin. V herbochronologické analýze je hlavním výstupem stanovení věku vytrvalých dvouděložných rostlin na základě počítání ročních přírůstů. Roční přírůsty – letokruhy – se objevují u rostlin, které jsou vystaveny jisté sezonalitě (střídání ročních období). Absolutní věk se zjišťuje z vytrvalé části rostlinného těla – kořenového krčku (**root collar**), kde přechází kořen ve stonek (Crivellaro & Schweingruber, 2015).

Během první části praktického cvičení si připravíme příčné mikrořezy (**cross sections**) u vybraných rozdílných rostlinných druhů (záleží na roční době a dostupnosti vhodného materiálu). Na základě příčných mikrořezů si určíme, jak byla rostlina stará a popíšeme si anatomickou stavbu mikrořezu. Doporučuji použít jako modelové druhy dvouděložných bylin jitrocel (*Plantago*), jahodník (*Fragaria*) a podběl (*Tussilago*).

Druhá část praktického cvičení bude porovnání morfologické a anatomické stavby větvičky listnatého stromu. Zjistíme, jestli počet letokruhů na mikrořezu odpovídá odhadovanému stáří části větvičky a popíšeme si anatomickou stavbu vybraného listnatého stromu.

Mikrořezy připravíme na Lab-Microtome. Následně preparáty vyčistíme chlornanem sodným (odstraníme fenoly a další nečistoty) a pak mikrořezy obarvíme barvivy AstraBlue (modrá) a Safranin (červená). Červeně se obarví buňky, které obsahují v buněčných stěnách lignin a modře se obarví buňky, které lignifikované nejsou. Díky dvojitému barvení vizuálně vyniknou dřevní části (xylem) → letokruhy – roční přírůsty.

## Upozornění:

Při přípravě mikroskopických preparátů se používají chemikálie. Přineste si prosím laboratorní plášť.

## Postup práce:

### 1. Část

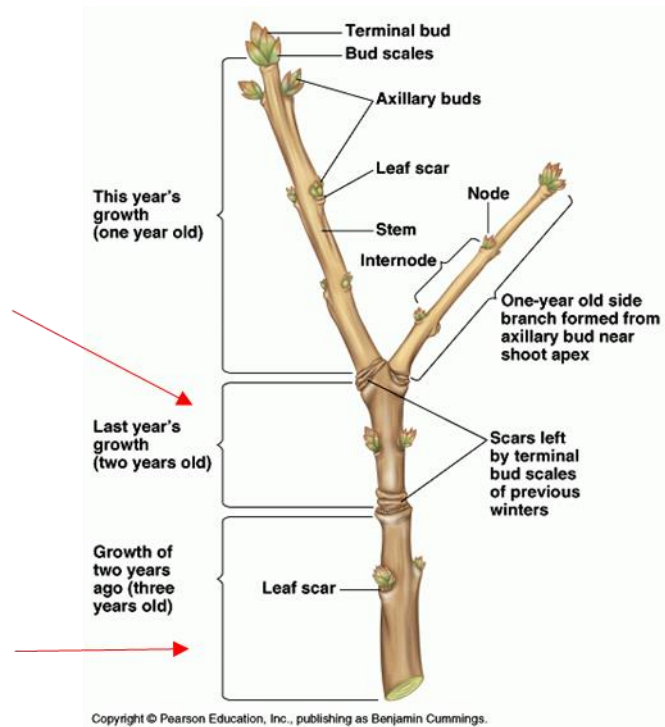
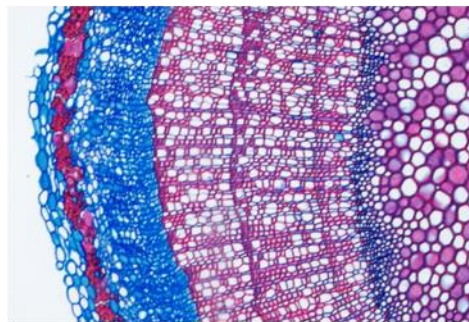
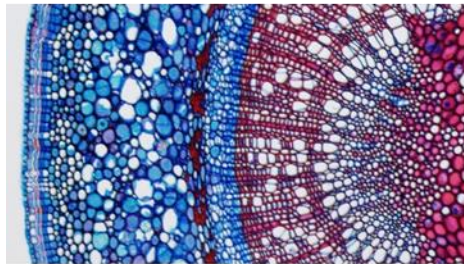
- Připravíme si příčné mikrořezy kořenových krčků vybraných druhů dvouděložných rostlin.
- Mikrořezy vybělíme pomocí chlornanu sodného (preparáty zbavíme fenolů). Na preparáty nakapeme několik kapek chlornanu a necháme působit ca 2 minuty.
- Mikrořezy důkladně opláchneme destilovanou vodou.
- Na mikrořezy nanese směs barviv (AstraBlue a Safranin – poměr 6:4). Necháme působit ca 1 minutu.
- Přebytečnou barvu postupně vypláchneme lihem (1. technický líh, 2. 96% líh, 3. absolutní líh) a tím také dehydratujeme preparát.
- Poslední krok je důkladně opláchnout mikrořez xylenem.
- K fixaci preparátu se běžně používá Kanadský balzám. Nanese se pár kapek na preparát a přikryje se krycím sklem. Takto připravený preparát se zatíží magnetem a dá se sušit do sušárny na 60 °C / 26 hodin. Abychom nemuseli příliš dlouho čekat, použijeme místo Kanadského balzámu průhledný lak na nehty.
- Počkáme půl hodiny. Po zaschnutí mikrořezy nafotíme a spolu je popíšeme.



Obr. 1: Roční přírůsty vybraných druhů rostlin (jetel, jahodník a podběl). Předpokládaný výsledek první části praktického cvičení. Zde jsou fotografie bez popisu.

## 2. Část

- a) Vybereme si větvičku listnatého stromu a na základě její morfologické stavby odhadneme stáří jednotlivých letorostů. Označíme si je a vyfotíme. Připravíme si příčný mikrořez vybrané části větvičky listnatého stromu.
- b) – h) se opakuje podle první části praktického cvičení.



Obr. 2: Předpokládaný výsledek druhé části praktického cvičení.

## Fotografický postup přípravy mikrořezů:



Obr. P1: Technická údržba Lab-Microtome – výměna žiletky a čištění.



Fig. 3.70. Position of the pulling angle of the blade in relation to the object. The optimum angle of the knife is around 45 degrees, but depending on the species of your sample and the desired quality of your section, this angle should be adjusted until an optimal section is achieved.



Fig. 3.71. Position of the angle of inclination of the blade in relation to the object. For hard woods, e.g., tropical woods the incline should be fairly steep. In soft material, e.g., archeological wet wood, the incline should be as flat as possible.

Obr. P2: Detailní náhled na uchycení vzorku do držáku mikrotomu.



Fig. 3.72. Keeping the section flat with a painting brush on the blade.



Fig. 3.73. 'Swimming' or gliding a section from the blade onto the glass slide.

Obr. P3: Řezání příčného mikrořezu vzorku a manipulace s ním pomocí štětce.



Fig. 4.1. Holder with chemicals for preparation of permanent slides. It contains dyes, ethanol and xylene and corresponding pipettes.



Fig. 4.2. Preparation tools: gloves, paint brushes, tweezers, pipettes, needle, paper knife, marker, slides and cover glasses.

Obr. P4: Potřebné chemikálie a laboratorní pomůcky k barvení a fixaci mikrořezů.

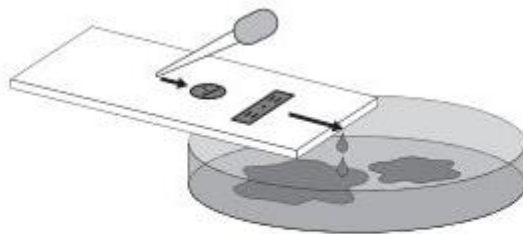


Fig. 4.3. Schematic view of the staining/cleaning process. Use a pipette for the chemicals and run the liquids over the section. For removing the surplus stain you can also place the pipette on top of the section and pump the ethanol through. By doing so you ensure that the dye is also removed from very small cell lumina.

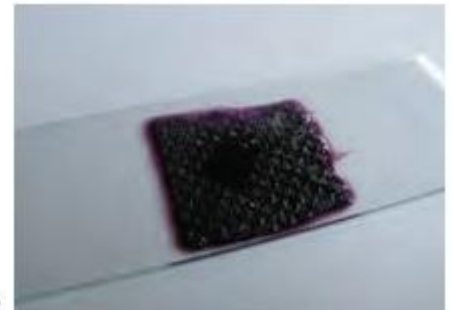


Fig. 4.5. Dye on a slide with a piece of tissue and very small micro sections.

Obr. P5: Postup oplachování mikrořezu a barvení mikrořezu.



Fig. 4.28. Dehydration of a section of wood.



Fig. 4.29. Dehydration of tiny sections of grasses on a tissue.

Obr. P6: Oplachování přebytečné barvy z mikrořezu pomocí několika typů lihů a xylenu.

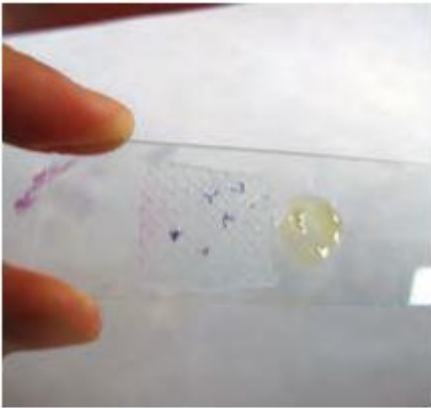


Fig. 4.31. Tissue with small sections next to the glass with a drop of Canada balsam.

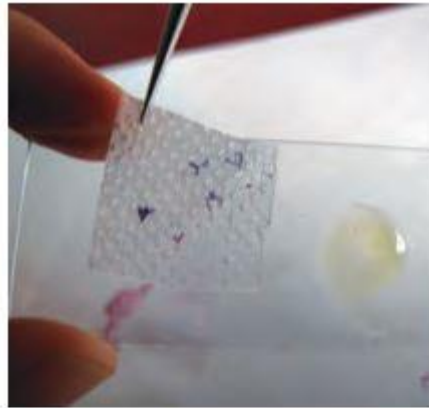


Fig. 4.32. Turning the tissue with the sections towards the Canada balsam.



Fig. 4.33. The small sections are trapped in the viscous Canada balsam.

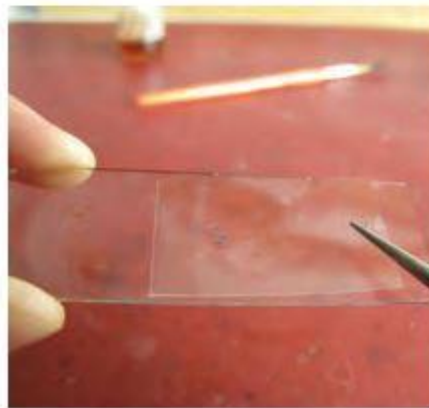


Fig. 4.34. Covering the section with the cover glass. Enclosing air bubbles can be avoided by putting the glass down from one side to the other.

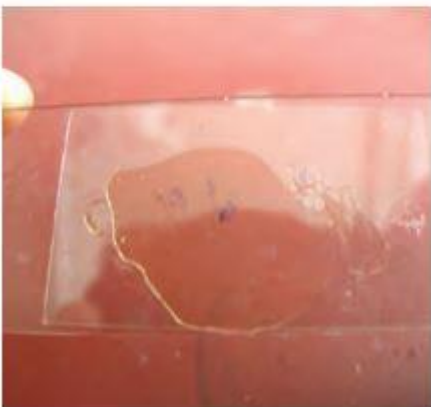


Fig. 4.35. Covered section. The Canada balsam spreads itself over the whole surface of the glass.

Obr. P7: Fixace mikrořezu Kanadským balzámem.

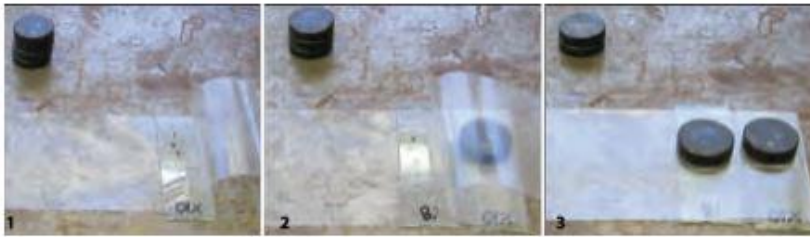


Fig. 4.36. Place the embedded sample (slide) on top of a heat resistant plastic strip on a metal plate (1). Place a second strip on top and fix it with a magnet (or other weight) (2). Repeat the procedure for all other slides (3). Always have a (heat resistant) plastic strip below and above the slide!



Fig. 4.37. Slides on an iron plate between plastic strips, and weighed down with magnets.



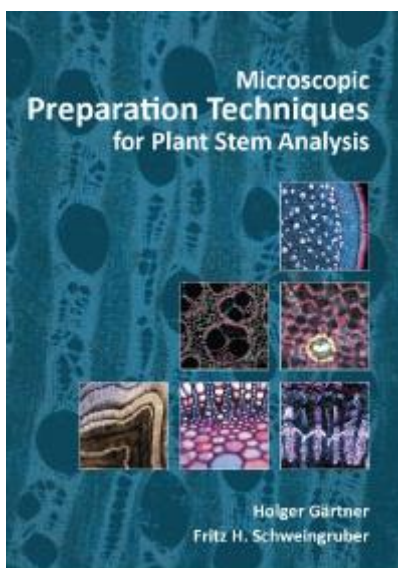
Fig. 4.38. Serial production of sections ready to be dried.



Fig. 4.39. Serial production of sections in an oven.

Obr. P8: Zatížení magnety čerstvě zafixovaných mikrořezů a sušení v peci.

## Literatura:



CRIVELLARO, Alan, Fritz H. SCHWEINGRUBER. 2015. Stem anatomical feature of dicotyledons. Xylem, phloem, cortex and periderm characteristics for ecological and taxonomical analyses. ISBN: 978-3-945941-08-9. ©2015 Verlag Dr. Kessel

Poznámka: Fotografie s anglickým popisem byly vybrány z příručky **Microscopic Preparation Techniques for Plant Stem Analysis** (Crivellaro & Schweingruber, 2015).