

Mikroskopické techniky rostlinných pletiv



(cv03) Metody výroby mikroskopických preparátů z rostlinných pletiv



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a Státním rozpočtem ČR InoBio – CZ.1.07/2.2.00/28.0018

Osnova této prezentace

- příprava vzorků
- měkčení vzorků
- mikrotomy
- výroba preparátů
 - barvení řezů
 - odvodňování mikrořezů
 - uzavírání

Příprava vzorků

Příprava vzorků

4

Dřevo tvořeno **anatomickými elementy**.

Orientace anatomických elementů:

- rovnoběžně s axiální osou kmene
(např. cévy, vertikální tracheidy, buňky axiálního parenchymu)
- kolmo na osu kmene
(např. ležaté tracheidy, parenchymatické buňky dřeňových paprsků)

Příprava vzorků

5

Studium stavby na 3 základních řezech:

- příčný,
- radiální,
- tangenciální.

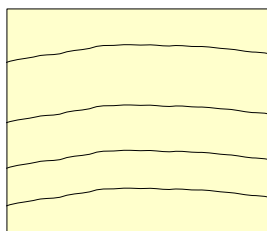
Správná orientace vzorků!



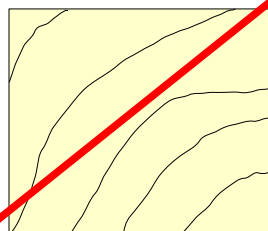
Příprava vzorků

6

- Vzhled letokruhů na P řezu

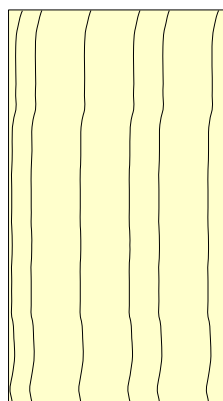


ANO

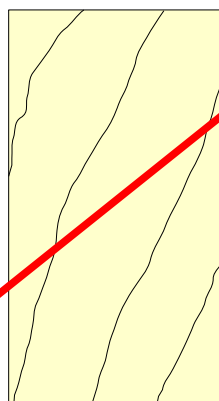


NE

- Vzhled dřevních vláken na R řezu



ANO



NE

Měkčení vzorků

Měkčení vzorků

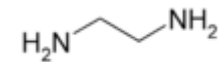
8

Dřevo je:

- dostatečně tuhé (Ize ho upnout)
- tvrdé (problém při krájení)

Měkčení dřeva:

- **vaření ve vodě,**
- vaření ve 2–4% roztoku NaOH a KOH,
- **máčení ve směsi glycerinu a 30% etanolu v poměru 1:1,**
- máčení v HF,
- vaření ve směsi ledové kyseliny octové a 30% roztoku peroxidu vodíku v poměru 1:1,
- vaření ve směsi ledové kyseliny octové, 30% roztoku peroxidu vodíku a vody v poměru 1:2:3,
- máčení nebo vaření ve 4% roztoku ETD.



etylendiamin

Měkčení vzorků

9

Délka měkčení závisí:

- na druhu dřeva (hustota),
- na počáteční vlhkosti,
- druhu mikrotomu

Poznámka: měkká dřeva s vysokou vlhkostí není nutné měkčit.

Měkčení dřeva se provádí:

- v kádinkách
- v kádinkách se zpětným chladičem

Vaříč, kádinka a zpětný chladič



Mikrotomy

Mikrotomy - rozdělení

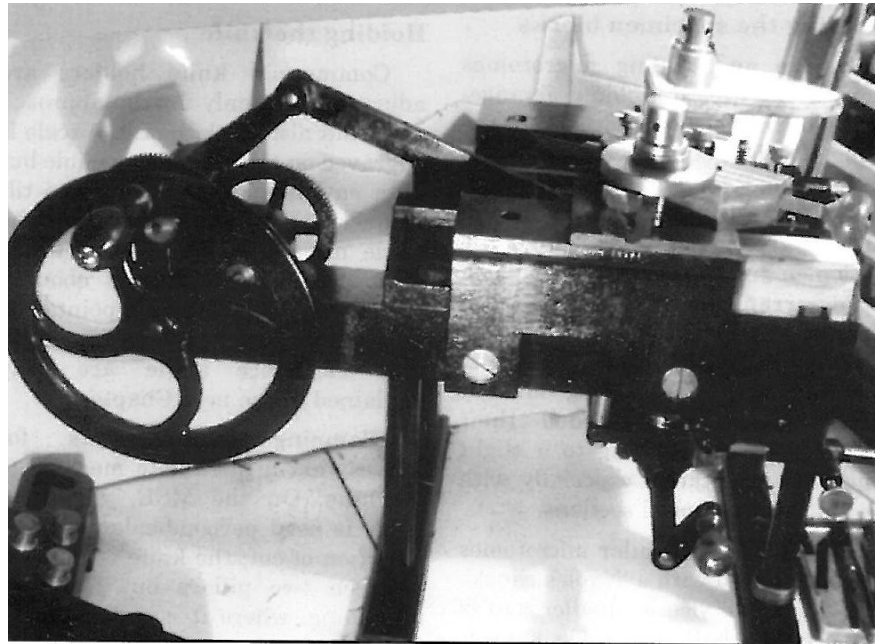
11

Z hlediska pohybu nože nebo vzorku:

- nůž je stacionární a vzorek je veden do řezu,
- vzorek je stacionární a nůž je veden do řezu.

Typ mikrotomů:

- ruční,
- konzolové,
- **rotační,**
- **sáňkové.**

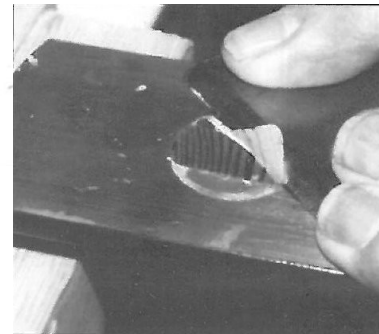


Mikrotom K. Jung z roku 1928 (Ives 2001)

Mikrotomy – rozdělení

12

- **Ruční mikrotomy**
 - spíše držáky vzorků
 - umožní krájení klasickou čepelkou za použití obou rukou



Mikrotomy – rozdělení

13

- **Rotační mikrotomy**
 - sériově vyráběné řezy
 - vzorky zality do parafínu



Nevýhody pro krájení dřeva

- čepelka/nůž kolmo ku dráze vzorku a bez možnosti změny úhlu ostří vůči vzorku

Mikrotomy – rozdělení

14

- Sáňkové mikrotomy
 - individuální výroba řezů
 - lze upnout větší vzorky



Leica SM2000R



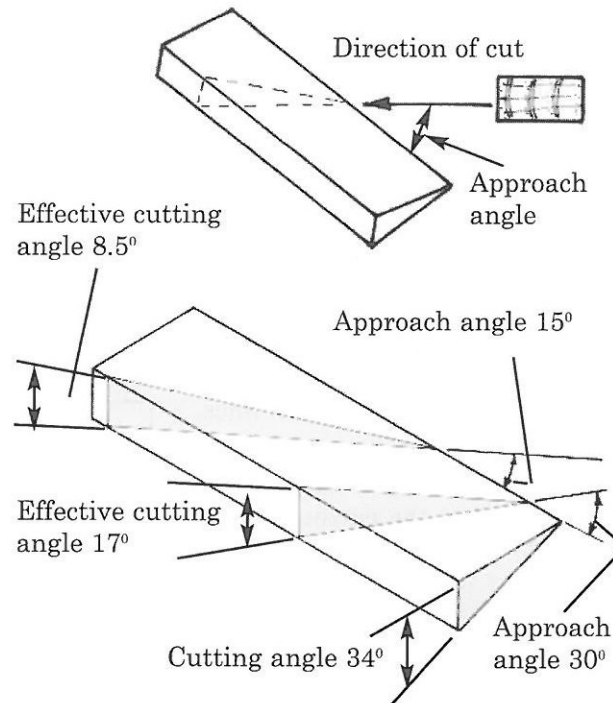
G. S. L. 1 – mikrotom na dřevo

Mikrotomy – rozdělení

15

Krájení je prováděno pomocí:

- mikrotomového nože,
 - ocel, vysokouhlíková nástrojová ocel
 - karbid wolframu
 - diamant
- čepelek.



*Princip transformace úhlů
mikrotomového nože (Ives 2001)*

Výroba preparátů

– barvení řezů

Výroba preparátů – barvení řezů

17

Cílem barvení je:

- zvýšit kontrast,
- zlepšení viditelnosti detailů.

Barví se především:

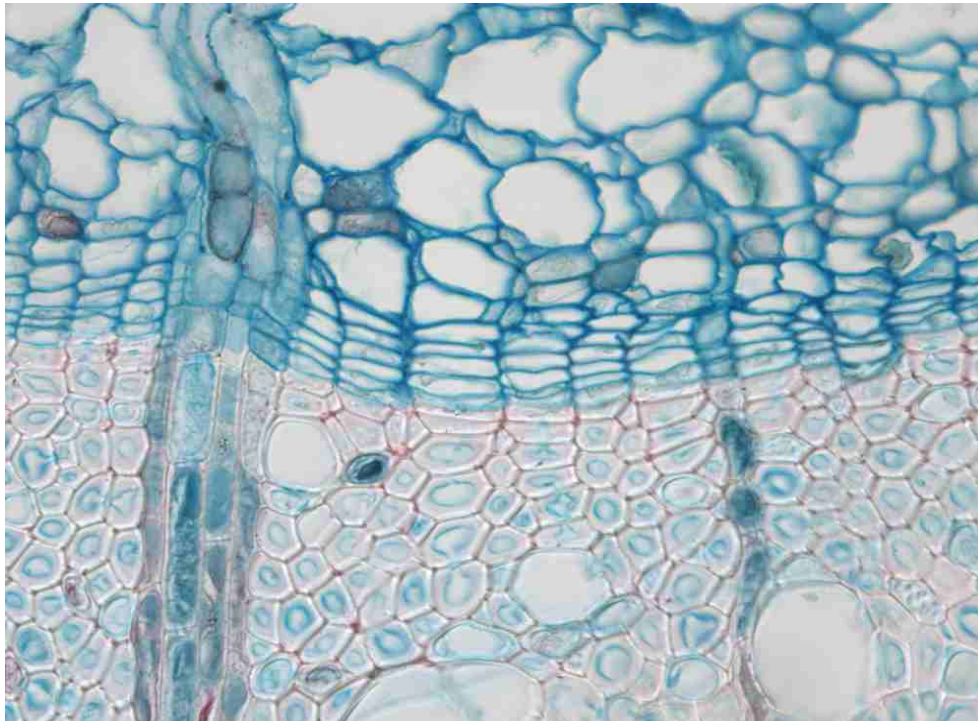
- xylém domácích dřev
- tropická dřeva málo pigmentovaná

Výroba preparátů – barvení řezů

18

Typ barvení:

- neselektivní
- selektivní barvení (lignifikované vers. nelignifikované buňky)

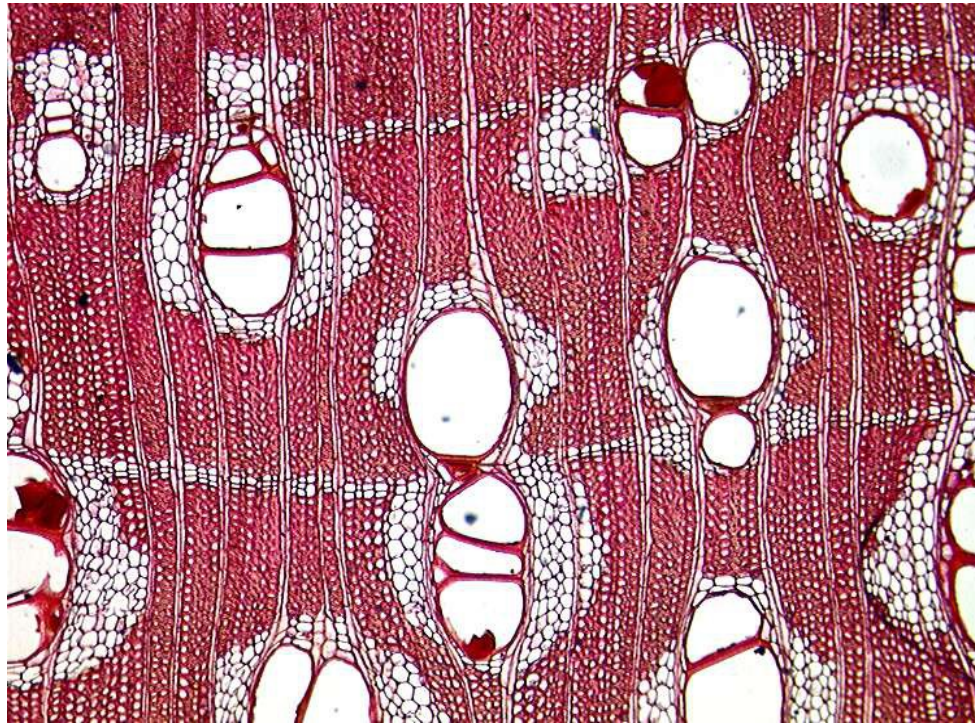


Výroba preparátů – barvení řezů

19

Neselektivní barvení (lignifikované buňky):

- safranin, destilovaná voda (1g na 100 ml)



Výroba preparátů – barvení řezů

20

Selektivní barvení:

a) Safranin (1 g), destilovaná voda (100 ml)

b) Astra blue (0,5 g), destilovaná voda (100 ml), kys. octová (2 g)



smíchat roztok **a** a **b** v poměru 1:1

Výroba preparátů

– odvodňování mikrořezů

Výroba preparátů – odvodňování mikrořezů

22

Před uzavíráním řezů je nutné řezy odvodnit!

Vzestupná alkoholová řada Wagenführ (1999):

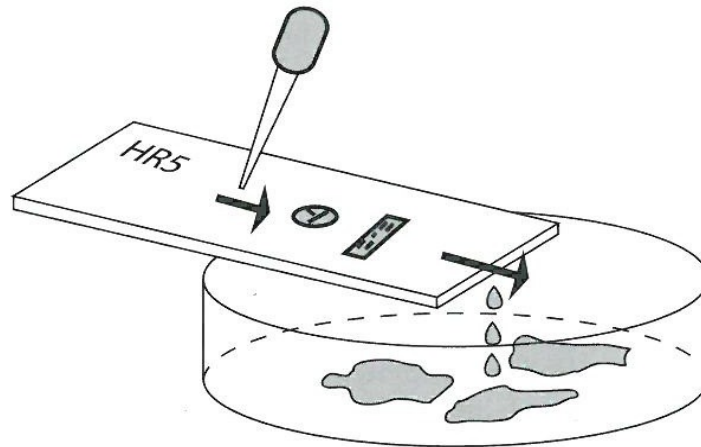
1. uložení řezu do 40% etylalkoholu (10 minut),
2. přenesení do 60% etylalkoholu (10 minut),
3. přenesení do 80% etylalkoholu (10 minut),
4. přenesení do absolutního etylalkoholu (10 minut),
5. přenesení do směsi alkoholu a xylolu v poměru 1:1 (10 minut),
6. uložení do xylolu.

Výroba preparátů – odvodňování mikrořezů

23

Odvodnění podle Schweingrubra (2007):

1. umístit řezy na podložní sklo,
2. pomocí kapátka polévat řez 95% alkoholem přenesení do 60% etylalkoholu (10 minut).



Výroba preparátů

– uzavírání

Výroba preparátů – uzavírání

25

Uzavírací médium

- kapalně médium, které vyplní mezeru kolem řezu a dutiny v řezu
- vyplní vzduchové mezery, které by „rozmazávaly“ výsledný obraz
- pro řezy dřevem by měl být index lomu média blízký indexu lomu skla
- pro trvalé preparáty je vyžadováno médium na bázi pryskyřice

Uzavírání (mounting) – proces uzavření preparátu krycím sklíčkem za pomoci uzavíracího média

Výroba preparátů – uzavírání

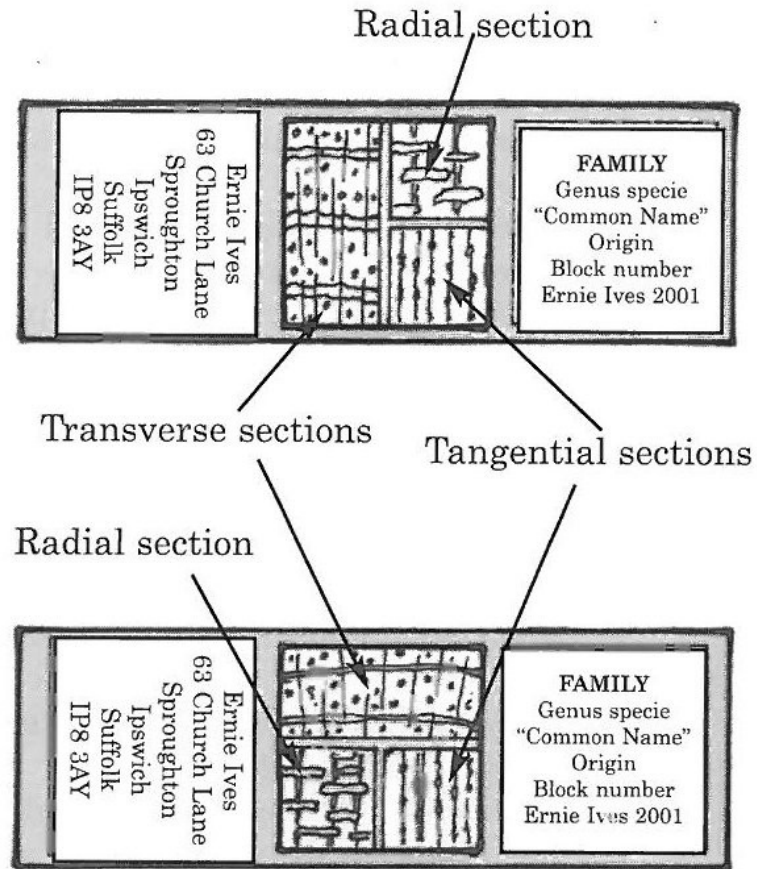
26

Uzavírací média – typy

- přírodní pryskyřice: *kanadský balzám*
- syntetické pryskyřice
 - mísitelná s xylenem: *Numount, Ralmount, Practamount*
 - mísitelná s absolutním alkoholem: *Euparal*
- syntetické polymery
 - nevhodné pro dřevo – zůstávají vzduchové bubuliny

Výroba preparátů – uzavírání

27



Ukázka možného uspořádání řezů na preparátu a štítek na preparátu (Ives 2001)

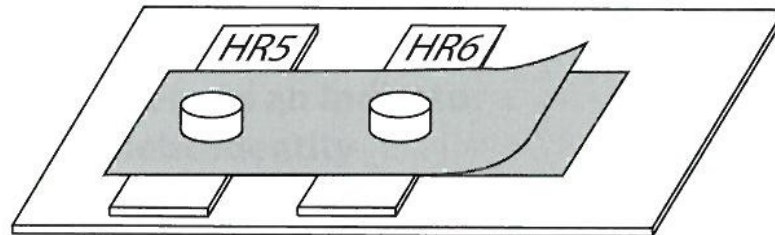
Výroba preparátů – uzavírání

28

Důležitá operace, která rozhoduje o výsledné kvalitě.

Postup při uzavírání preparátů:

1. vložit řezy na podložní sklo
2. kápnout malé množství uzavíracího média
3. pomalu přiložit krycí sklo
4. zatížit krycí sklo (např. pomocí magnetu, Schweingruber 2007)
5. nechat zaschnout uzavírací médium
(urychlení pomocí sušárny, 60 °C)



Prostor pro vaše dotazy