

Mikroskopické techniky rostlinných pletiv



(cv04) Metody výroby mikroskopických preparátů z rostlinných pletiv (2. část) Preparáty pro dokumentaci tvorby dřeva a lýka



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

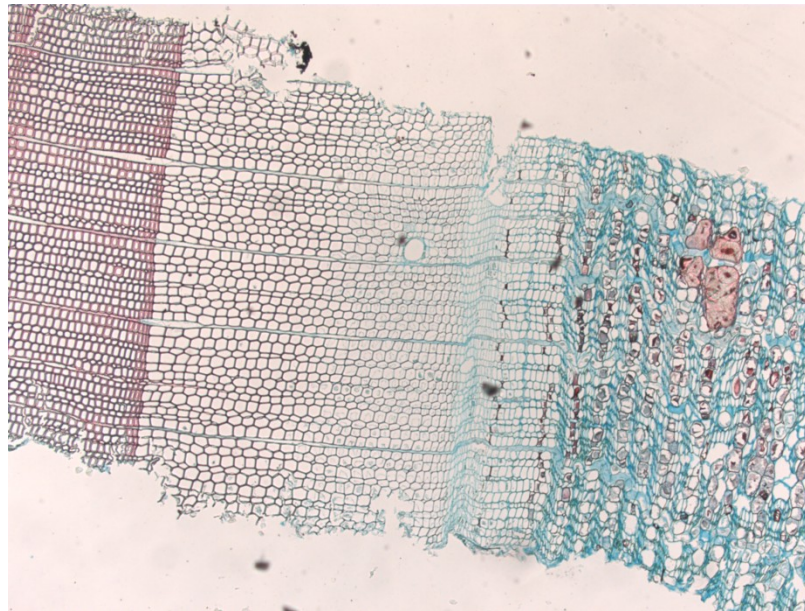
- Tvorba xylému a floému (teorie)
- Periodické odběry mikrovývrtů
- Výroba mikroskopických preparátů

Tvorba xylému a floému (teorie)

Tvorba xylému a floému (teorie)

4

- **Kambium** – dělivé pletivo (*meristém*), které odděluje nové buňky:
 - *xylému* (dřeva) centripetálně
 - *floému* (lýka) centrifugálně
- Buňky které jsou odděleny z kambiální zóny, ztrácí dělivou schopnost a prochází tzv. *diferenciací*



Tvorba xylému a floému (teorie)

5

Sekvence
buněčných
dělení v
kambiální zóně

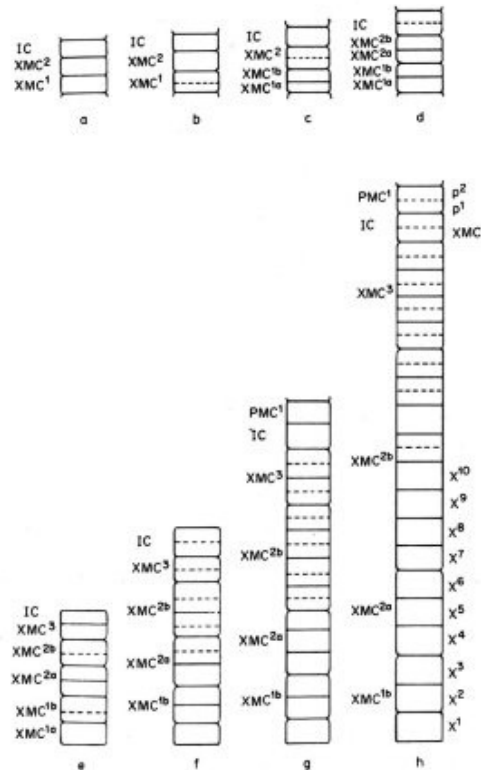
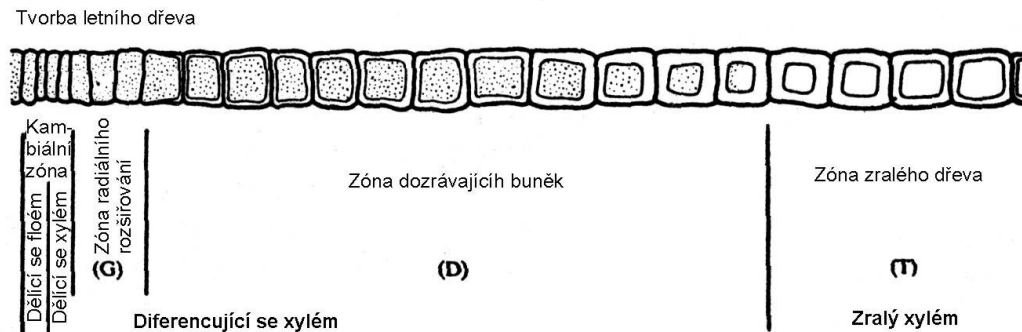
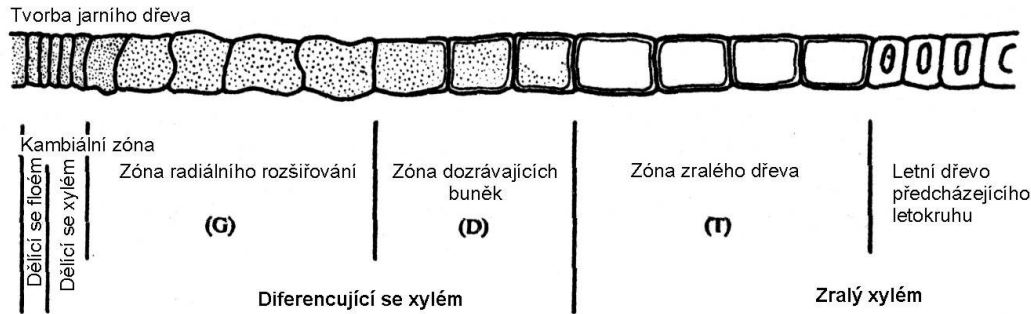


Fig. 9.2 Series of diagrams showing sequence of cell divisions following reactivation of the cambium in spring. Divisions are shown as beginning in xylem mother cells, extensive re-division of which results in rapid production of xylem-destined cells. Less frequent divisions in the tier of initial cells yield new xylem mother cells on the inside and phloem mother cells towards the outside. Symbol IC denotes initial cell; XMC, xylem mother cell; PMC, phloem mother cell; X, differentiating xylem element; and P, phloem element. (From Bannan, 1962.)

Tvorba xylému a floému (teorie)

6

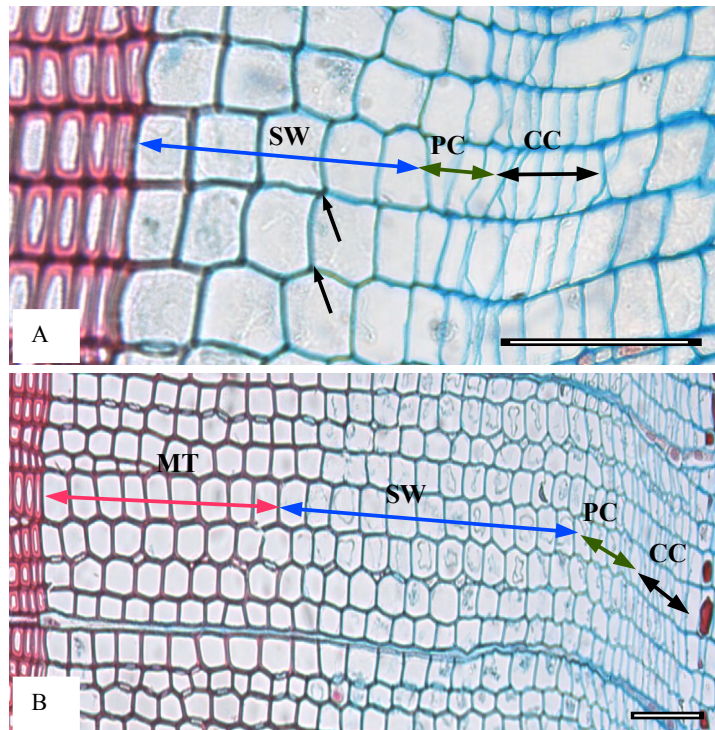
Průběh diferenciaci buněk xylému u jehličnanů



Tvorba xylému a floému (teorie)

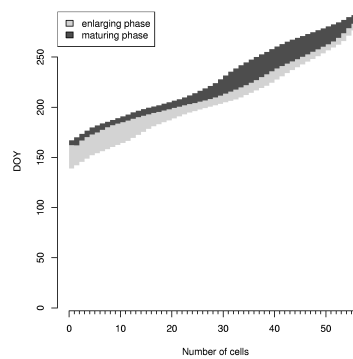
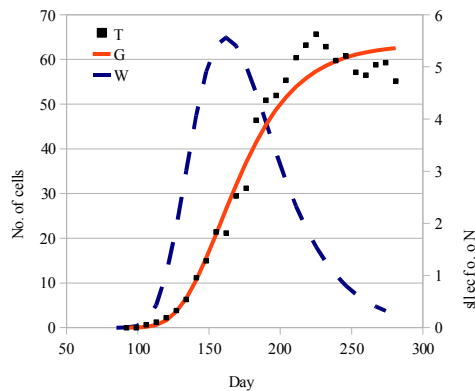
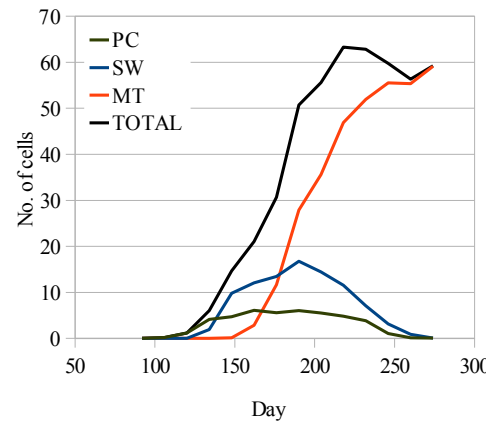
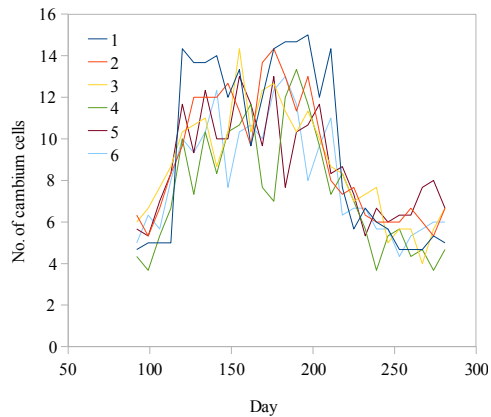
7

Proces diferenciacie tracheid. A – buňky ve fázi radiálního rozšiřování (PC) a tvorby sekundární buněčné stěny a lignifikace (SW), šipkou je označen začátek lignifikace buněk. B – buňky ve fázi radiálního rozšiřování (PC) a tvorby sekundární buněčné stěny a lignifikace (SW) a první plně lignifikované buňky (MT). Měřítko = 100 μ m



Tvorba xylému a floému (teorie)

Možné výstupy



Periodické odběry mikrovývrtů

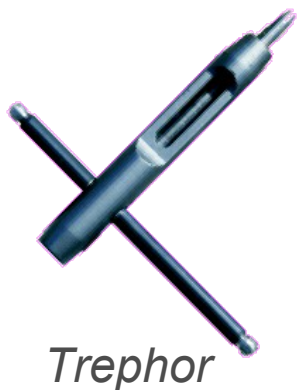
Periodické odběry mikrovývrtů

10

Pravidelné odběry mikrovývrtů pomocí Trephoru



Odběr
mikrovývrtu



Trephor



Mikrovývrt
Ø 1.8 mm

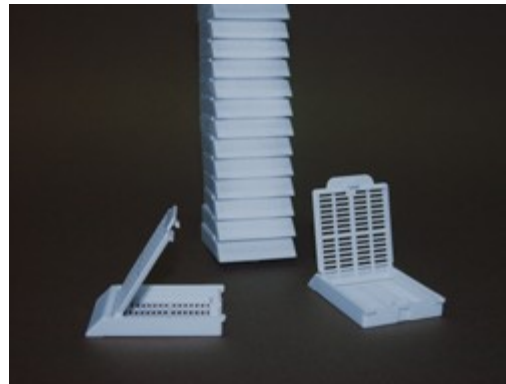
Periodické odběry mikrovývrtů

11

Odebrané mikrovývrty:

- vkládány do histologických kazetek
- kazetky uskladněny ve fixačním roztoku *FAA* (formaldehyd – kys. octová – etanol)
- po 1 týdnu kazetky promyty vodou a uskladněny ve 30% etanolu

Histologické kazetky



Výroba mikroskopických preparátů (přehled operací)

Výroba mikroskopických preparátů

13

1) Postup zpracování mikrovývrtů

- krácení mikrovývrtů
- odvodnění
- impregnace v parafinu
- zalévání mikrovývrtů do parafinu (výroba parafinových bločků)

Výroba mikroskopických preparátů

14

2) Postup výroby řezů a výroba preparátů

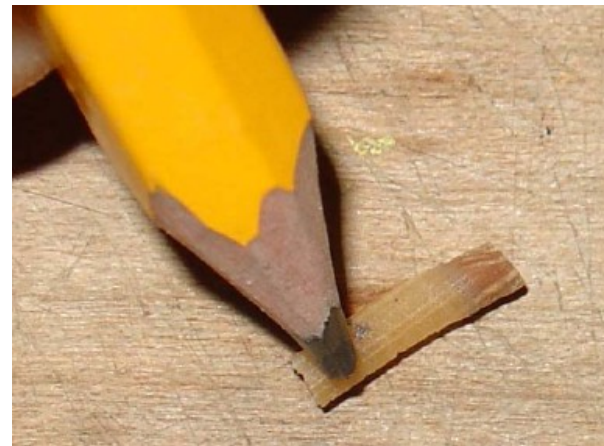
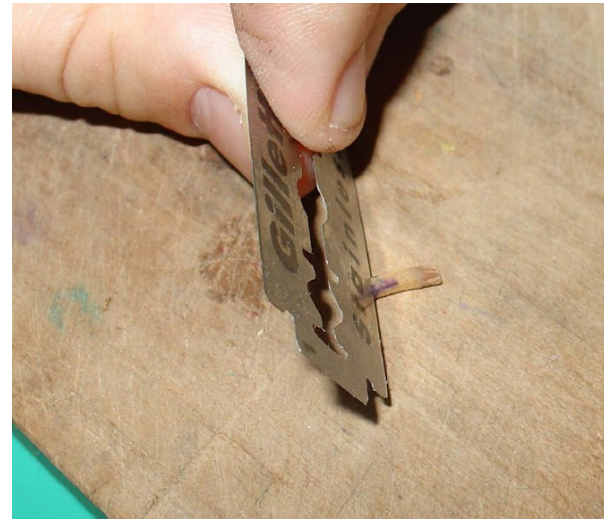
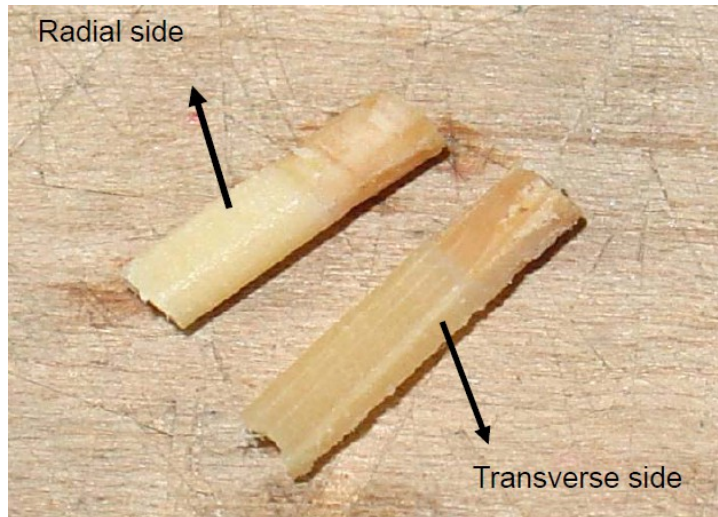
- krájení bločků na mikrotomu
- napínání řezů na vodní hladině
- nalepování řezů na sklíčka
- barvení a odvodňování
- uzavírání preparátu
- schnutí preparátů

Výroba mikroskopických preparátů (podrobný rozpis operací)

Výroba mikroskopických preparátů

16

- krácení a orientace mikrovývrtů
– tužkou označíme příčný řez



Výroba mikroskopických preparátů

17

- odvodňování
 - alkoholová vzestupná řada:
vždy 90 min v etanol 70 %, 70 %, 90 %, 90 %, 95 %, 100 %, 100 %
- „clearing“
 - 3 × xylen (90 min)



Výroba mikroskopických preparátů

18

- impregnace v parafinu
 - Petriho misky, 60 °C, 2 × 2 h



Výroba mikroskopických preparátů

19

- zalévání mikrovývrtů do parafinu (výroba parafinových bločků)



Zalévání parafinem (vlevo), parafinové bločky (nahore) a seřezávání parafinu

Výroba mikroskopických preparátů

20

- krájení bločků
 - fáze 1: trimování + máčení ve vodě (přes noc)
 - fáze 2: vlastní krájení (viz video)



Výroba mikroskopických preparátů

21

- napínání řezů na vodní hladině (viz video)
 - vyhřívaná lázeň ~45 °C
 - dojde k napnutí parafinu na vodní hladině
- nalepování řezů na sklíčka
 - na podložní sklíčko se nanese Albumin
 - sklíčkem se vyloví sada řezů z vodní lázně
 - sušení (přirozené × umělé 70 °C, 5 min)

Výroba mikroskopických preparátů

22

- barvení a odvodňování

Chemické látky	doba [min]
Bioclear	30
Bioclear	30
etanol (96 %)	15
etanol (96 %)	15
Safranin + Astra Blue	15
etanol (96 %)	5
etanol (96 %)	5

Safranin + Astra blue

50 mg Safranin + 150 mg Astra blue +
100 ml destilovaná voda + 2 ml kys.
octová (ledová)



Výroba mikroskopických preparátů

23

- uzavírání preparátu
 - uzavírací médium: Euparal
 - po uzavření preparátu položit na kovovou desku a zatížit magnetem



Výroba mikroskopických preparátů

24

- schnutí preparátů
 - dojde k ztuhnutí uzavíracího média
 - možnosti:
 - přirozené schnutí – asi 14 dní
 - umělé schnutí (v sušárně)
- skladování
 - ve speciálních zásobnících

