

Jaroslav Pazourek a Zdeňka Pazourková:

Rychlé zhotovování mikroskopických preparátů zdřevnatělých rostlinných orgánů

(Ústav pro fyziologii rostlin a genetický ústav Karlovy university)

Zhotovování mikroskopických preparátů zdřevnatělých orgánů bývá spojeno s jistými obtížemi.

Mikroskopické preparáty dřeva (máme-li na mysli technické označení) se zhotovují většinou ze špalíčků, vyříznutých ze starších kmenů tak, aby-
chom je při řezání mohli vhodně orientovat. K jejich řezání užíváme speciálních
nožů a mikrotomů, jejichž klín a tím i nůž je pevně veden. Tyto objekty ob-
vykle nezaléváme do parafinu, ale je nutno před řezáním je měkčit. Není
účelem tohoto článku popisovat různé metody, užívané k měkčení dřeva, ale
chceme jen upozornit na tu, kterou jsme s úspěchem užívali při našich pracích.
Měkčení v glycerolu, případně ve směsích glycerolu s alkoholem je poměrně
velmi zdoluhavé. Vaření špalíčků dřeva ve vodě za účelem změkčení trvá ne-
poměrně kratěji, ale přesto je i tato doba dosti dlouhá, zvláště chceme-li
dřevo řezat běžným typem sáňkového mikrotomu. Metoda, při které vedeme
na řezaný objekt horkou páru, je příliš komplikovaná a práce při ní je nepo-
hodlná.

Rychle a spolehlivě měkkí všechna dřeva následující směs: 1 díl ledové
kyseliny octové, 2 díly 30% peroxidu vodíku a 3 díly vody. V této směsi
vaříme špalíčky dřeva v uzavřené nádobě se zpětným chladičem několik hodin.
Směs zhotovená podle původního předpisu (Franklin G. L.) (ledová
kyselina octová a 30% peroxid vodíku bez přidání vody) pracuje také dobře,
dokonce rychleji (1 až 3 hod.), ale působí příliš silně. Zatím co uvnitř špalíčku
není dosud dřevo téměř vůbec změkklé, je na povrchu již rozmacerované
a vrstvička právě vhodná pro řezání je poměrně tenká. Ředěním vodou docí-
líme toho, že přechod mezi rozmacerovanou a ještě tvrdou částí špalíčku není
tak příkrý a vhodně měkká vrstvička je tlustší.

Obtížnější je řezání mladších větviček, u kterých nejde jen o zachování
anatomické stavby dřevních partií, ale i všech partií ostatních, kambiem po-
čínaje a kutikulou konče. Tyto nelze měkčit vařením, protože pak při řezání
se vnější vrstvy odlupují. U několikaletých větviček lze postupovati prostě
tak, že je po fixaci propereme, spodní částí upevníme ve svorce mikrotomu
a řežeme je pak šikmým nožem. Barvit je pak můžeme na hodinovém sklíčku
nebo na Petriho miskách, na kterých je pak převádíme přes alkohol do xylo-
lu a uzavíráme do kanadského balsámu. Přitom můžeme užít i podvojného
barvení, na př. safranin — anilinová modř, safranin — světlá zeleň, safranin —
Delafieldův haematoxylin a pod. Při správném sklonu nože a při správném
úhlu lze řezat řezy 15 až 20 μ tlusté zcela bez obtíží. Tak lze zpracovat velké
množství vzorků ve velmi krátkém čase.

Tímto způsobem nelze ovšem řezat větvičky tenké, nebo ne dosti zdřevnatělé, t. j. ty, které by se tlakem nože ohýbaly. Takové je nutno zalít do parafinu a měkčit je pak po zalití. Převádění alkoholovou řadou bývá velmi zdoluhavé, protože objekt musí být alkoholem, xylenem či benzenem dokonale prosycen, což u těchto objektů trvá poměrně velmi dlouho. Rovněž dokonale prosycení parafinem si vyžaduje značného času. Při tomto postupu objekty nejen tvrdnou, ale i křehnou, což můžeme pozorovati na tvrdších pletivech v lodyhách, kořenech a listech bylin. Zkrácení tohoto postupu je možné, převádíme-li objekty pomocí ultrazvuku nebo pomocí vibrátoru. To má jistě veliký význam, protože zkrátíme-li dobu, po kterou je objekt umístěn na př. v xylenu nebo benzenu, objekt tolik nekřehne.

Protože již řadu let zaléváme různé objekty pomocí terciárního butylalkoholu a mohli jsme se přesvědčit o výhodách této zalévací metody zvláště pro zdřevnatělé objekty, rozhodli jsme se ji kombinovat se zaléváním pomocí vibrátoru (W o l f J., H r š e l I.).

Větvičky fixujeme nejčastěji FAA, zvláště jde-li o fixaci v přírodě; je-li třeba preparáty zhotovit rychle, je možno fixovat směsí Carnoyovou na vibrátoru. Je pochopitelné, že je nutno objekty rozřezat na kousky pokud možno nejtenčí: chceme-li zhotovit řez příčný, řežeme větvičky na plátky asi 3 mm tlusté. Při řezech podélných (radiálních), vyřízneme z větvičky plátek co možno nejtenčí tak, že vedeme na dvou protilehlých stranách řezy nedaleko dřene. Takto upravené řezy stačí obvykle fixovat Carnoyem na vibrátoru 1 hod. (podle velikosti a hustoty objektu). Fixujeme-li jinou fixází, po níž je nutno objekty vyprat ve vodě, užíváme také při vypírání vibrátoru. Potom převádíme zalévací řadou s terciárním butylalkoholem. Užíváme následujících směsí (J o h a n s e n D. A.):

Směs čís.	1	2	3	4	5
Destilovaná voda	50	30	15		
95% ethylalkohol	40	50	50	45	
Terciární butylalkohol	10	20	35	55	75
100% ethylalkohol					25

Po těchto pěti směsích vkládáme objekty do butylalkoholu, který alespoň jednou vyměňujeme. Směsí nepoužíváme nikdy dvakrát.

Objekty umístíme do zkumavky velikosti 15 × 80 mm, kterou vložíme do stojánku, připevněného na vibrátor. Když uplynula doba, během níž tekutina objekt pronikla, vylejeme ji a nalejeme na objekt další. Abychom šetřili butylalkoholem, užíváme pouze první dvakrát až třikrát.

Tato metoda spojuje výhody metody zalévání pomocí vibrátoru a zalévací metody s terciárním butylalkoholem, který rychle proniká a objekty v něm nekřehnou.

Pronikání tekutiny se usnadní, vypudíme-li při fixaci ze zdřevnatělých objektů vzduch pomocí vodní vývěvy.

Objekty fixované fixází, po níž vypíráme vodou, převádíme celou butanolovou řadou, objekty fixované FAA vkládáme bez vypírání do směsi č. 2,

u objektů fixovaných Carnoyem začínáme bez vypírání směsí č. 3. Fixáž, zbylou po vylití ve zkumavce, můžeme v obou posledních případech odstranit tím, že zkumavku s objekty vypláchneme 70% alkoholem po FAA a 96% alkoholem po Carnoyovi.

Tímto způsobem zaléváme i nezdřevnatělé objekty, na př. kořenové špičky pro cytologické účely, listy, nezdřevnatělé lodyhy a pod. Ve všech těchto případech úplně stačí ponechat objekty v každé směsi i v butanolech po 10 minutách. U lodyh, řapíků a stopek, kde jsou některá pletiva zdřevnatělá, přistupuje k tomu i to, že lze tyto orgány rychle zalévat i že je lze dobře řezat, protože zmíněná pletiva netvrdnou a nekřehnou.

Stejným způsobem jsme zalévali i mladší větve ovocných stromů, lípy, *Ampelopsis Weitschii*, víceletou lodyhu *Aristolochia* a pod. Jde-li o příčný řez, stačí u všech těchto objektů doba 10 min, aby každá z uvedených směsí objekt dokonale pronikla. Při zalévání objektů, určených pro podélné řezy, je nutno dobu v jednotlivých fixážích prodloužit, jako u ostatních method je ovšem především nutno se řídit velikostí a hustotou (tvrdostí) objektu.

Měkčí objekty, které neobsahují příliš zdřevnatělá pletiva, můžeme řezati přímo. Větvičky a podobné objekty, je většinou nutno před řezáním měkčit některým ze způsobů, kterými měkkíme objekty zalité v parafinu. Parafinový bloček tam, kde chceme řezat mikrotomem, seřízneme až na objekt. Pak vložíme bloček, obvykle již přivařený na špalíčku, do tekutiny, která nám objekt změkčí. Při popsaném postupu zalévání stačí obvykle voda. Lodyhy, které nebyly příliš zdřevnatělé bylo možno, jak jsme se již zmínili, řezat přímo. Případně stačilo před každým řezem kápnout na řeznou plochu kapku vody. Silnější zdřevnatělé lodyhy bylo možno řezat po krátkém namočení do vody. Víceletá lodyha podražce se po 10 min. namočení ve vodě dala řezat na 15 μ , po 1 hod. na 6 až 12 μ . Tříletou větévku lípy, zdřevnatělou lodyhu *Ampelopsis Weitschii* a pod. bylo možno řezat na 10 až 15 μ po půl až jednohodinovém ponoření do vody. Pro jiná, tvrdší dřeva je vhodné užít k měkčení zředěných kyselin. Při řezání nemá řezná plocha oschout. Je proto vhodné jak do vody, tak do kyselin, kterými měkkíme, přidat 10 až 25 % glycerolu.

Tato metoda znamená tedy nejen ulehčení a zjednodušení práce při řezání zdřevnatělého materiálu, ale i značné urychlení celého procesu. Zvláště se uplatňuje tam, kde nelze řezat zdřevnatělé orgány bez zalévání na př. při sledování tvorby kalusu u zakořeňovaných řízků, při roubování a pod.

Literatura.

1. Franklin G. L. (1946): Rapid Method of Softening Wood for Microtome Sectioning. Tropical Woods: 35—36, Cit. podle Mikroskopie 1948 : 382.
2. Hršel I. (1952): Urychlené převádění a zalévání do parafinu pomocí vibračního motorku. Čs. biologie: 59—61.
3. Johansen D. A. (1940): Plant Microtechnique. New York and London I. vyd.
4. Kavina K. (1932): Botanická mikrotechnika, Praha.
5. Schneider H. (1922): Die botanische Mikrotechnik, Jena, II. vyd.
6. Wolf J. (1950): Užítí ultrazvuku v mikroskopické technice. Biol. listy: 206—210; Supplementum II.

Быстрое приготовление микроскопических препаратов одревесневших растений.

Модификация метода обезвоживания и заливки парафином одревесне-
лого материала при помощи третичного бутилалкоголя. Для обезвожи-
вания применяется серия растворов следующего состава:

	I	II	III	IV	V
Концентрация спирта	50	70	85	95	100
Дистиллированная вода	50	30	15		
95% этилалкоголь	40	50	50	45	
Третичный бутилалкоголь	10	20	35	55	75
100% этилалкоголь					25

Потом объекты помещают в чистый третичный бутилалкоголь, кото-
рый при этом один раз заменяют новым. Продолжительность обезвожи-
вания сокращают, применяя вибратор. Для большинства материалов бы-
вает вполне достаточно выдерживать объекты в каждой смеси в течении
10-ти минут. Только для весьма твердого материала необходимо этот
срок несколько увеличить. В случае применения смеси Carnoy, фиксация
в течении 1-го часа бывает достаточна, после чего объекты без ополаски-
вания помещают в смесь III. Таким образом общее время от фиксации до
парафинирования составляет 2 часа. Некоторые материалы допускают
резку без смягчения. Более твердые материалы смягчают таким образом,
что отрезают парафиновый блок около самого места, где должна быть
произведена резка микротомом, после чего поверхность среза погружают
на 10—60 мин. в воду. При весьма твердых объектах этот срок увеличивают
или применяют кислотные растворы. Бывает выгодно в смягчающую жид-
кость прилить 10—25% глицерола.

Jaroslav Pazourek and Zdeňka Pazourková:

Rapid making of microscopical preparations of woody plant organs.

The authors modified the method of dehydration with tertiary butyl
alcohol for embedding of the woody material in paraffin wax. The following
series of solutions had been used (J o h a n s e n):

	I	II	III	IV	V
Approximate total percentage of alcohol	50	70	85	95	100
Distilled water	50	30	15		
95%ethyl alcohol	40	50	50	75	
Tertiary butyl alcohol	10	20	35	55	75
100 % ethyl alcohol					25

Following the 100% solution, there should be two changes of pure tertiary butyl alcohol.

The time of dehydration is considerably shortened by the use of a vibrator, producing the oscilation of solutions. Thus ten minutes in each solution is sufficient usually, except very hard material, which should be immersed for a longer time. One hour's fixing in Carnoy's mixture is quite satisfactory in most objects. They are transferred immediately into the third solution. The time from fixing to paraffin is 2 hours maximally. Some objects can be cut after the embedding in paraffin wax without any softening, but most of the material should be softened before cutting. In such case, the required piece of the paraffin block must be cut out, and the end of the object, which is to be microtomed, must be immersed in distilled water. The time of 10—60 minutes is sufficient for softening of most woody objects, very hard objects must be immersed for a longer period. Only the hardest woody material must be immersed in a solution of acids. 10—25% of glycerol should be added to the softening solutions.

The metod described is very useful for quick microscopic observation of woody material in some experimental work, e. g. in the callus formation in cuttings, growing together of grafts a. s. o.

Vysvětlivky k tabulce VII. a VIII.

- Obr. 1. Kalus mezi roubem (meruňkou) a podnoží (slivoň). — Калус между черенком (абрикосом) и подножьем (сливой). — Calus between scion (apricottree) and stock (plumtree).
- Obr. 2. *Aristolochia siphon*: lenticela z příčného řezu lodyhou. — Лектицела из поперечного разреза стебля. — Lenticel on the cross section of the stem.
- Obr. 3. *Aristolochia siphon*: tříletá lodyha: partie z dřevní části svazku cévního. — Трехлетний стебель: участок древесной части сосудистого пучка. — 3 years old stem: cross section of an vascular part of vascular bundles.
- Obr. 4. *Aristolochia siphon*: kambium z příčného řezu lodyhou. — Камбий из поперечного разреза стебля. — Cambium from an cross section of an older stem.

Všechny objekty fixovány FAA, zalévány methodou terciárního butylalkoholu pomocí vibrátoru. Barveno safraninem a Delafieldovým haematoxylinem. — Все препараты фиксированы FAA и залиты при помощи вибратора по методу третичного мерилалкоголя. Окрашено сафранином и гематоксилином Делафиельда. — All objects was fixed with FAA, dehydration with tertiary butyl alcohol shortened by the use of a vibrator. Stained with safranin and Delafield's haematoxylin.