

METODIKA VÝROBY MIKROSKOPICKÝCH PREPARÁTŮ ZE VZORKŮ DŘEVA

H. Vavrčík, V. Gryc

Došlo: 5. dubna 2004

Abstract

VAVRČÍK, H., GRYC, V.: *The methodology of making microscopical preparations of wood*. Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun., 2004, LII, No. 4, pp. 169-176

In this paper, there are discussed methods of making woody tissues microscopical preparations and making its microslides. There are described common methods of preparation of wood blocks, sectioning of woody tissues, staining and mounting. The differences of making wood sections and non-lignified plant sections are highlighted. The authors recommendate the fast methodology of making quality microslides of wood sections based on their own experiences.

wood, microslides, microscopical preparations, methods

1 Úvod

Pozorování struktury dřeva (xylému) na mikroskopické úrovni světelnými mikroskopy v procházejícím světle je v zásadě možné provádět na dvou typech vzorků. Prvním typem jsou vzorky dřeva rozvlákněného vhodným maceračním činidlem – v tomto případě lze pozorovat pouze jednotlivé anatomické elementy (buňky), tedy nikoliv celá pletiva (dřeňové paprsky, pryskyřičné kanálky apod.) tvořená těmito elementy. Ve většině případů je při zkoumání mikrostruktury dřeva nebo při identifikaci neznámých vzorků dřev nutné pozorovat anatomické elementy tak, jak byly uspořádány do pletiv v rostoucím stromě. K těmto účelům je potřebné zhotovit druhý typ vzorků dřev – mikroskopické řezy.

Oproti ostatním částem rostlinného těla lze dřevo (xylém) považovat za poměrně tvrdý materiál, který vyžaduje specifické postupy při výrobě mikroskopických preparátů. Největší potíže způsobuje zmiňovaná tvrdost především při zhotovování mikroskopických řezů na mikrotomu.

Tento článek vychází především z praktických zkušeností pracovníků Ústavu nauky o dřevě (ÚNoD) Lesnické a dřevařské fakulty (LDF) Mendelovy

zemědělské a lesnické univerzity v Brně (MZLU), kteří pro své výzkumy často potřebují zhotovovat mikroskopické preparáty ze vzorků dřev. Cílem bylo vybrat postup výroby trvalých mikroskopických preparátů dřeva, který by byl snadný a rychlý při zachování vysoké kvality výsledných preparátů.

2 Přehled používaných postupů

2.1 Příprava vzorků

Vzhledem k tomu, že dřevo je složeno z anatomických elementů, které jsou uspořádány jak rovnoběžně s axiální osou kmene (např. cévy, vertikální tracheidy, buňky axiálního dřevního parenchymu apod.), tak i kolmo na osu kmene (ležaté tracheidy, parenchymatické buňky dřeňových paprsků), provádí se pozorování mikrostruktury na třech základních řezech (Strasburger, 1910; Panshin a Zeeuw, 1980; Hoadley, 1990; Wagenführ, 1999). Na základě pozorování těchto tří základních řezů je možné odlišit jednotlivé druhy dřev.

Základními řezy rozumíme řez transverzální (příčný) a dva řezy podélné (radiální a tangenciální) (Požgaj *et al.*, 1997). Z tohoto důvodu je tedy třeba věnovat pozornost orientaci jednotlivých řezných rovin již při

přípravě hranolků dřev pro následné měkčení a krájení na mikrotomu (Wagenführ, 1999; Ives, 2001).

Pro sáňkové mikrotomy se používají dřevěná tělíska ve tvaru hranolu, zpravidla o rozměrech $10 \times 10 \times 20$ mm (delší rozměr odpovídá podélnému směru) (Wagenführ, 1999). Tělíska pro výrobu mikroskopických preparátů nesmí obsahovat žádné vady dřeva (suky, trhliny, hniloba).

2.2 Měkčení vzorků

Většinu biologického materiálu není možné z důvodu nízké tuhosti a přílišné poddajnosti přímo upnout do držáku vzorků mikrotomu, a proto se takové vzorky musí zalít do vhodné hmoty, která se dobře krájí (Pazourková, 1986). V případě vzorků nedegradovaného dřeva tato procedura odpadá. Dřevo je dostatečně tuhé a lze je tedy bez problémů upnout do držáku. Současně je však dřevo poměrně tvrdý materiál, což znesnadňuje krájení vzorků na mikrotomu a vzorky dřeva je před vlastním krájením nutné změkčit (Wagenführ, 1999; Ives, 2001). Při zpracování měkkých dřev v čerstvém stavu (absolutní vlhkost dřeva $w_{abs} > 80\%$) měkčení není potřebné (Wagenführ, 1999; Ives, 2001). Pokud se jedná o vzorek dřeva tvrdého nebo suchého, je nutné přistoupit k měkčení.

Mezi používané metody měkčení vzorků dřeva patří:

- vaření ve vodě (Wagenführ, 1999; Ives, 2001),
- vaření ve 2–4% roztoku NaOH a KOH (Němec, 1962),
- máčení ve směsi glycerinu a 30% etanolu v poměru 1:1 (Horáček, 1999; Vavřík, 2002)
- máčení v HF (Němec, 1962),
- vaření ve směsi ledové kyseliny octové a 30% roztoku peroxidu vodíku v poměru 1:1 (Franklin, 1945),
- vaření ve směsi ledové kyseliny octové, 30% roztoku peroxidu vodíku a vody v poměru 1:2:3 (Pazourková a Pazourek, 1955),
- máčení nebo vaření ve 4% roztoku ETD (etylendiamin nebo 1,2-diaminoetan) (Ives, 2001).

2.3 Mikrotomy

Mikroskopické řezy dřeva se zhotovují buď pomocí čepelky, břitvy, nebo na mikrotomech. Výroba mikrořezů pomocí čepelky vyžaduje zkušenost a zručnost. U takto vytvořených řezů se zpravidla musíme smířit s nestejnou tloušťkou řezu a plochou řezu maximálně 6 mm² (Ives, 2001). Pro výrobu kvalitních trvalých mikroskopických preparátů s řezy o tloušťce 10–20 μm je nutné použít mikrotom (Vavřík, 2002).

Existuje více hledisek, podle kterých lze rozdělit mikrotomy. Jedním z nich je hledisko pohybu nože nebo vzorku:

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

Jiné členění rozděluje typy mikrotomů na ruční, konzolové, rotační a sáňkové. V současnosti jsou nejčastěji používány mikrotomy rotační a sáňkové. Rotační mikrotomy jsou vhodné pro výrobu sériových řezů. Pro výrobu mikroskopických řezů dřeva nejsou příliš vhodné, protože není možné měnit geometrii řezu z důvodu pevného upevnění nože (Ives, 2001). Pro zpracování vzorků dřeva se jeví jako vhodnější použít sáňkové mikrotomy.

Rozhodujícím faktorem pro kvalitu řezu je mikrotomový nůž. Pro výrobu mikrořezů ze dřeva se běžně používají nože vyrobené z těchto materiálů:

- ocel Jsou vyrobeny z kvalitní vysokouhlíkové nebo nástrojové oceli s tvrzeným ostřím (Glen, 1985). Nejlepší jsou takové nože, které jsou z tvrzené oceli celé.
- karbid wolframu Nože vyrobené z vysoce kvalitního karbidu wolframu jsou nerezové, prakticky nemagnetické a jsou stokrát tvrdší než nejtvrdší nástrojová ocel (anonymus, 1986).
- diamant Diamantové nože jsou vyrobeny z kvalitních diamantů bez kazů (anonymus, 1987).

Pokud je mikrotom vybaven držákem čepelky, místo nože lze použít speciálních výměnných čepelky. V tomto případě odpadá broušení. Naopak nevýhodou je nižší tuhost čepelky, proto je její použití možné pouze pro měkká dřeva.

2.4 Výroba trvalých preparátů

Mikroskopické preparáty lze dle trvanlivosti rozdělit na dočasné a trvalé (Pazourková, 1986). Předpokladem trvanlivosti preparátu je především neměnnost a trvanlivost struktury objektu. Tento předpoklad je v případě dřeva zajištěn. Jestliže se objekt nemění, záleží trvanlivost preparátu pouze na uzavíracím médium.

Uzavírací médium, někdy také montovací médium, je kapalná látka, která vyplňuje prostory v řezech a nahrazuje tak vzduch, který by mohl způsobovat neostrost obrazu při pozorování (Ives, 2001). Uzavírací médium by mělo mít index lomu blízký indexu lomu skla (Ives, 2001).

Pro výrobu mikroskopických preparátů dřeva jsou vhodná tato uzavírací média:

- voda (Pazourková, 1986) Vzhledem k rychlému odpařování tohoto média je toto médium vhodné pouze pro dočasné preparáty.
- glycerin Oproti předchozímu se pomaleji odpařuje, a tudíž má preparát delší trvanlivost (Kisser, 1970; Ives, 2001).
- kanadský balzám Jedno z nejstarších uzavíracích médií pro výrobu trvalých preparátů. Jedná se o přírodní pryskyřici, která se získává z jedle (*Abies balsamea* (L.) Mill.) (Ives, 2001).
- syntetické pryskyřice (např. pod obchodními názvy Numount, Ralmount, Practamount)

Jsou dostupné pod různými obchodními názvy. Jsou cenově dostupnější než kanadský balzám.

Postup výroby mikroskopických preparátů z mikrořezů dřeva se skládá z následujících operací: barvení, odvodnění a uzavírání do uzavíracího média.

2.4.1 Barvení mikrořezů

Vzhledem k tomu, že xylém domácích dřevin je oproti xylému tropických dřevin málo pigmentovaný (důvodem je rozdíl v množství extraktivních látek), je nezbytné mikroskopické řezy barvit. Barvením pletiv dřeva je docíleno vyššího kontrastu a zvýšení viditelnosti detailů, které by jinak byly obtížně pozorovatelné nebo by vůbec nebyly vidět (Ives, 2001).

Pro neselektivní barvení veškerých pletiv dřeva je nejčastěji používáno červené barvivo safranin (Němec, 1962; Wagenführ, 1999; Ives, 2001). Při selektivním barvení se nejčastěji používá safranin a světlá zeleň (Němec, 1962; Ives, 2001). Selektivní barvení u dřeva je vhodné pro účely, kdy je potřeba odlišit lignifikované a nelignifikované anatomické elementy dřeva (Horáček et al., 1999; Vavřík, 2002).

2.4.2 Odvodňování mikrořezů

Kanadský balzám i jeho syntetické náhražky jsou rozpustné v xylolu, tudíž je nutné před vlastním uzavřením preparátu provést odvodnění (Ives, 2001).

Němec (1962) uvádí, že po obarvení řezů barvivy rozpustnými ve vodě je následně nutné postupně odvodňování v 50% etanolu, pak v 75% a 95% etanolu. Pokud mikrořezy dřeva barvíme činidly rozpustnými v etanolu, lze odvodnění provést přímo v 95% etanolu. Dalším prostředím je karbol-xylol (kyselina karbolová a xylol v poměru 1:3), nakonec xylol.

K odvodnění barvených i nebarvených řezů pro výrobu trvalých preparátů navrhl Wagenführ (1999) vzestupnou alkoholovou řadu:

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.

2.4.3 Uzavírání

Odvodněné řezy se umístí na čisté podložní sklo. Na řezy se kápne přiměřené množství uzavíracího média. Pomocí vhodného nástroje (skleněná tyčinka nebo krycí sklo) se uzavírací médium rozetře přes všechny řezy. Pomalu, tak aby došlo k vytlačení vzduchu, se přiklopí krycí sklo.

Doba sušení trvalých preparátů je závislá na použitém uzavíracím médiu a na teplotě prostředí. Při sušení

v sušárně je doporučená teplota 40 °C (Wagenführ, 1999), případně i vyšší, a to až 60 °C (Ives, 2001). Tím dochází ke zkrácení času sušení z možných tří měsíců na 2–3 týdny (Wagenführ, 1999; Ives, 2001).

2.4.4 Dokumentace

Neexistují žádná závazná pravidla pro značení vzorků. Vždy by se na štítku preparátu měly objevit všechny údaje relevantní pro daný účel.

3 Diskuse

3.1 Měkčení vzorků před krájením

Dosud se při výrobě mikroskopických preparátů na ÚNoD používala metoda měkčení vzorků ve směsi glycerinu a 30% alkoholu (1:1). Při použití této metody měkčení bylo nutné vzorky máčet v řádech týdnů až měsíců. I při dlouhodobém uložení vzorků v této měkčící směsi byly dostatečně proměkčeny pouze povrchové vrstvy. Vzhledem k tomu, že dřevo většiny hospodářky významných tropických dřevin vykazuje vysoké hodnoty hustoty (700–1200 kg.m⁻³), stávající způsob měkčení byl nedostatečný. Z tohoto důvodu byly vyzkoušeny jiné metody měkčení. Pouhé vaření vzorků ve vodě se ukázalo jako dostatečné pouze u dřev s nižšími hustotami (do 700 kg.m⁻³), kdy doba vaření dosahovala dvou až tří týdnů. Použitím zpětného chladiče a směsi vody s glycerinem (poměr 2:1) byla zkrácena doba vaření na 1 týden. Použitím zpětného chladiče došlo ke snížení úbytku měkčícího média v důsledku odpařování.

Byla také vyzkoušena metoda měkčení pomocí ETD. Při této metodě byl problém stanovit dobu měkčení. Při krátkém čase měkčení bylo změkčení vzorku nedostatečné, při delších časech měkčení docházelo k nežádoucím změnám v anatomické struktuře dřeva.

3.2 Krájení na mikrotomu

Před upevněním vzorku do držáku mikrotomu je vhodné osušit povrch vzorku (např. pomocí filtračního papíru), aby nedocházelo ke korozi a zbytečnému znečišťování mikrotomu.

Vzorek dřeva je nutné umístit do držáku mikrotomu s ohledem na požadovaný směr krájení. Vzorek je nutné upevnit tak, aby při kontaktu nože se vzorkem nedošlo k jeho nežádoucímu vychýlení. Současně je nutné zabránit deformaci vzorku dřeva nadměrnou silou upnutí. Počátek ronění měkčící kapaliny na povrchu tělíska bylo stanoveno jako ukazatel dosažení optimální síly upnutí. Současně bylo toto ronění známkou dostatečného sycení tělíska měkčícím médiem.

Při vlastním krájení je vhodné zvlhčit krájenou plochu vzorku směsí glycerinu s alkoholem (1:1). Také na čelo mikrotomového nože byla štětcem nanášena stejná směs. Účelem bylo zajistit plynulý náběh krájeného objektu na čelo nože.

K dispozici byly na ÚNoD dva sáňkové mikrotomy: Jung „K“, výrobcem určený ke krájení neodvápňených kostí a Leica SM2000R. První z nich byl již poměrně opotřeбенý, a tudíž nebylo možné dosáhnout tloušťky řezů menších než 40 µm aniž by nedošlo k jejich potrhání. Nový sáňkový mikrotom Leica SM2000R umožňoval bezproblémově zhotovovat kvalitní řezy o tloušťce 10–20 µm. Výhodou tohoto mikrotomu je také možnost jemně polohovat držák vzorku pro zpřesnění orientace roviny řezu.

Ze zhotovených řezů je vhodné vyrobít dočasné preparáty uzavírané v glycerinu. Tím je umožněno poměrně dlouhodobé uchování mikrořezů do doby, než bude provedeno vlastní uzavírání do kanadského balzámu.

3.3 Barvení

Pro účely, kdy není potřeba provádět selektivní barvení jednotlivých anatomických elementů dřeva, se jako nejvýhodnější ukázala metoda barvení safrani-

nem. Takto obarvené řezy jsou dostatečně kontrastní pro mikroskopická pozorování a vlastní technika barvení je snadná a rychlá. U tropických dřev s vysokým kontrastem není nutné barvení safraninem provádět.

3.4 Odvodňování

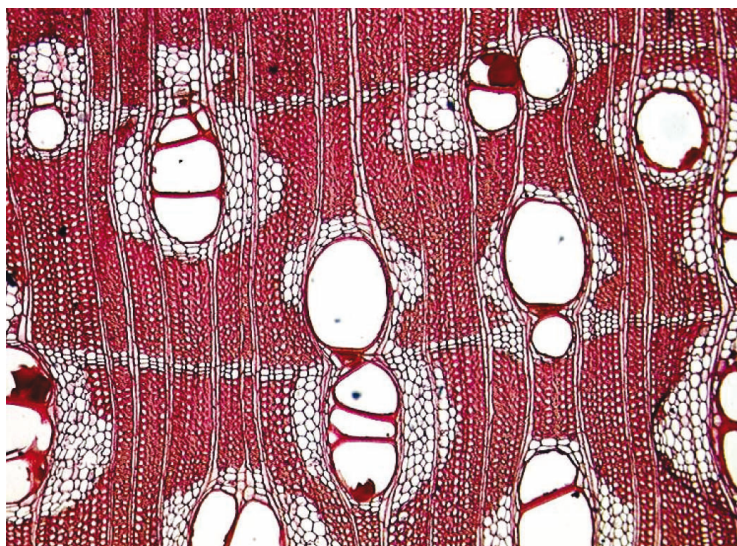
Za účelem zrychlení výroby byly hledány způsoby, jak zkrátit celkový čas odvodňování. To se podařilo použitím zkrácené etylalkoholové řady (Němec, 1962) pro mikrořezy barvené v safraninu.

Výsledné řezy jsou dostatečně odvodněny a z nich vytvořené preparáty jsou velmi kvalitní.

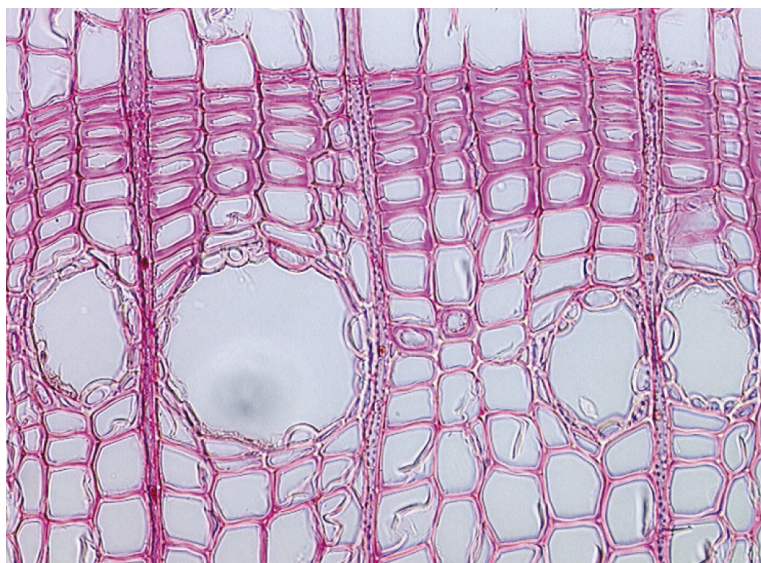
3.5 Uzavírání

Po uzavření preparátů se ukázalo jako vhodné zatížení krycích skel pryžovými zátkami. Tím je zajištěno, že krycí sklíčko zůstane po dobu tuhnutí uzavíracího média dostatečně přitisknuté.

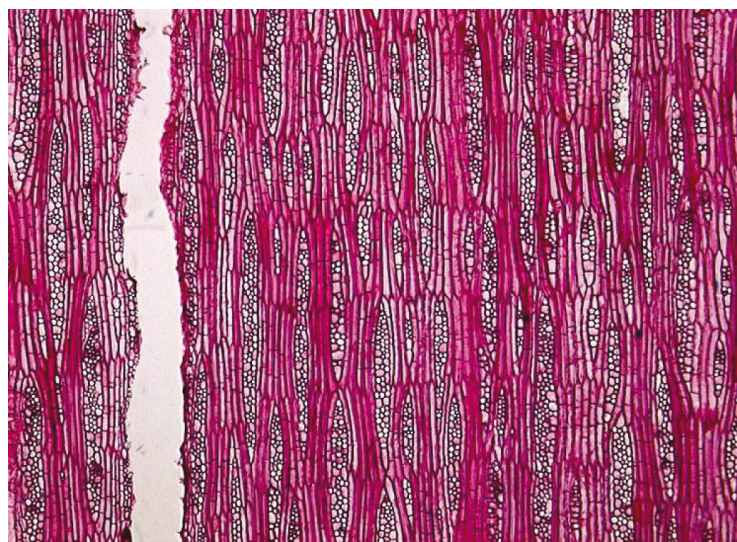
Veškeré vyrobené preparáty je nutné neprodleně opatřit vhodným štítkem s popisem.



1: Ukázka snímku mikroskopického preparátu. *Intsia amboinensis* Thouars, příčný řez (foto: autoři).



2: Ukázka snímku mikroskopického preparátu. Modřín opadavý (*Larix decidua* Mill.), příčný řez (foto: autoři).



3: Ukázka snímku mikroskopického preparátu. Ochroma sp., tangenciální řez (foto: autoři).

SOUHRN

Byly vyzkoušeny stávající postupy výroby trvalých mikroskopických preparátů dřeva. Výsledkem je zrychlení procesu výroby trvalých preparátů při zachování vysoké kvality. Dokladem jsou trvalé preparáty domácích i tropických dřev, které byly zhotoveny v rámci projektů FRVŠ 65/2002 – Anatomická stavba dřeva – multimediální výukové texty, FRVŠ 1328/2003 – Lexikon vybraných tropických dřev a Grantové agentury České republiky – Současný stav a trendy vývoje lesů v kulturní krajině (526/03/H036). Digitalizované mikroskopické preparáty z těchto projektů lze najít na <http://www-ldf.mendelu.cz/ldf/ustavy/naukadreva/Projects/>. Práce byla realizována za podpory Grantové agentury České republiky – Současný stav a trendy vývoje lesů v kulturní krajině (526/03/H036).

Nejlépe se osvědčila následující metodika výroby trvalých mikroskopických preparátů barvených safraninem:

1. Příprava vzorků

Z požadovaných vzorků dřev nařezeme tělíska ve tvaru hranolů s přesně orientovanými základními řezy, přibližně $10 \times 10 \times 20$ mm. Rozměry tělísek jsou limitovány jednak držákem vzorků konkrétního mikrotomu a také reálnou možností vyrobit mikrořezy příslušných rozměrů.

2. Měkčení vzorků

Měkká dřeva s absolutní vlhkostí dřeva nad 80 % můžeme přímo krájet. Ostatní vzorky dřev musíme vařit v 10% roztoku glycerinu ve vodě. Doba vaření: 3–8 dní.

3. Krájení na mikrotomu

Na mikrotomu zhotovíme tři základní řezy. Pokud je krájení problematické, je vzorek pravděpodobně málo změkčený a musíme měkčení opakovat.

4. Barvení mikrořezů

Mikrořezy ponecháme 5 minut v safraninu.

5. Odvodňování mikrořezů

- a) Mikrořezy uložíme do 96% etanolu (10 min),
- b) přeneseme do karbol-xyلولu (1:3) (3 min),
- c) přeneseme do xyلولu (3 min).

6. Uzavírání

Odvodněné řezy položíme na očištěné podložní sklo, kápneme na ně přiměřené množství kanadského balzámu, který opatrně rozetřeme po celém mikrořezu. Pomalu přikládáme krycí sklo. Takto vyrobený trvalý mikroskopický preparát zatížíme uprostřed krycího skla např. pryžovou zátkou po dobu jednoho dne. Preparáty zakryjeme, aby se na ně neprášilo a necháme zaschnout dva týdny.

7. Označení

Každý preparát opatříme štítkem s popisem.

dřevo, mikrořezy, mikroskopické preparáty, metody

LITERATURA

- Austral Scientific. Disposable tungsten carbide microtome blades and holder for paraffin and frozen sectioning. Canberra ACT; Austral Scientific. 1986
- Diatome. The diamond knife for light microscopy. Diatome Ltd. Switzerland. 1987
- FRANKLIN, G. L.: Preparation of thin sections of synthetic resins and wood-resin composites and a new macerating method for wood. *Nature* 1945, 155, s.51
- Glen Creston. Glen Creston microtome knives. Glen Creston Ltd. Stanmore, Middlesex, U.K. 1985
- HOADLEY, R. B.: Identifying wood. Newtown, 1990, 223 s.
- HORÁČEK, P., ŠLEZINGEROVÁ, J., GANDE-LOVÁ, L.: Effects of environment on the xylogenesis of Norway spruce (*Picea abies* /L./ Karst.) In: WIMMER, R., VETTER, R. E. (eds.): Tree ring analysis: biological methodological, and environmental aspects. CABI International, University Press, Cambridge, 1999, 33–53.
- IVES, E.: A Guide to Wood Microtomy; Making quality microslides of wood sections. Suffolk Offset Martlesham Suffolk, 2001. 114 s.
- KISSER, J.: Mikrotomie des Holzes. In: Freund, H.: Handbuch der Mikroskopie in der Technik. Frankfurt, 1970.
- NĚMEC, B.: Botanická mikrotechnika. ČSAV Praha, 1962, 482 s.
- PANSHIN, A. J.; DE ZEEUW, C. Textbook of wood technology. 4.ed. New York: Mc-Graw-Hill, 1980.

- PAZOURKOVÁ, Z., PAZOUREK, J.: Nová modifikace nigrosinové metody. *Preslia*, 1955, 27, s. 442-446
- PAZOURKOVÁ, Z.: Botanická mikrotechnika. Skriptum. Univerzita Karlova, Praha, 1986, 166 s.
- POŽGAJ, A., CHOVANEC, D., KURJATKO, S., BABIAK, M.: Štruktúra a vlastnosti dreva. *Príroda*, a.s., Bratislava, 1997, 488 s.
- SIGMUND, F.: Anatomie der Phanerogamen. Franckh'sche Verlagshandlung, Stuttgart, 1915
- STRASBURGER, E.: Lehrbuch der Botanik für Hochschulen., verl. von Gustav Fisher, Jena, 1910
- VAVRČÍK, H.: Využití fluorescenční mikroskopie při detekci ligninu ve zdřevnatělé buněčné stěně dřeva smrku. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 2002, 5, p. 21-29, ISSN 1211-8516.
- WAGENFÜHR, R.: Holz. Anatomie – Chemie – Physik. Anatomie des Holzes. DRW-Verlag Weinbrenner GmbH & Co., 1999, 188 s.

Adresa

Ing. Hanuš Vavrčík, Ph.D., Ing. Vladimír Gryc, Ústav nauky o dřevě, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 3, 613 00 Brno, Česká republika

