

METODIKA VĚDECKÉ PRÁCE

Kombinovaná metoda preparace listových pokožek

Ein kombiniertes Verfahren für die Gewinnung von Blattepidermen

Zlatko Kvaček

Geologický ústav ČSAV, Spořilov, Boční II/1401, Praha 4

Došlo dne 25. ledna 1965

Abstrakt — Beim Vergleich von Blättern fossiler und heutiger Pflanzen bieten die Blattepidermen sehr wichtige systematische Unterscheidungsmerkmale. Bei Präparierung rezenter Blattepidermen wird das Mesophyll in geeigneten Lösemitteln aufgelöst und die Epidermis wird auf chemischem Wege isoliert. Bei der Verwendung der beschriebenen kombinierten Mazerationsmethode werden die Blätter in der ersten Phase in alkalisiertem 30% Wasserstoffsperoxyd mazeriert, bei der zweiten Phase dient das Gemisch nach SCHULZE als Mazerationsmittel. Die Zeit der Wirkung dieses Gemisches ist sehr verkürzt (2—15 Min.). Zur Lösung der mazerierten Proben verwendet man eine 10% Lösung von Kalilauge. Gegenüber den übrigen früher beschriebenen Methoden besitzt diese Methode den Vorteil, dass man in breitem Bereiche die Intensität der Mazeration regulieren kann.

V botanických laboratořích se používá v podstatě dvou až tří procesů, jak získat obraz listové pokožky:

1. Pokud lze pokožku stáhnout s listu mechanicky, pak stačí takto oddělenou pokožku fixovat a barvit. Ve většině případů se to nepodaří, neboť lpí obvykle pevně na ostatních pletivech listu. Tehdy se doporučuje střídavé vaření a ochlazení listu ve vodě, aby se pokožka poněkud uvolnila. Tento postup podle mých zkušeností často selhává. Jinak lze použít mikrotomových řezů. Objekty se zalévají do parafinu či jiného média a řežou mikrotomem co možná rovnoběžně s povrchem listu. Metoda je dosti náročná na čas a vedle toho se obvykle nepodaří získat řez, který by zachycoval větší část povrchu listu. Zejména tehdy, leží-li jednotlivé elementy pokožky v různých horizontálních rovinách, např. chlupy, žlázy, ponořené průduchy, není stavba dosti přehledná a jasná. Složením jednotlivých řezů na sebe lze ovšem sledovat prostorové uspořádání pokožky zpětně (třeba vytvořením modelu apod.).

2. Pro kvantitativně anatomickou práci je doporučována metoda mikroreliefová (PAZOUŘEK 1963). Povrch pokožkových buněk v čerstvém stavu je totiž více méně vypouklý a takto vzniklý reliéf lze zachytit potřením listu jemným lakem. Po zaschnutí se stáhne tenká blanka laku pomocí průhledné samolepicí pásky a pod mikroskopem za použití bočního osvětlení, fázového kontrastu apod. pak vystoupí struktura pokožky. Tato metoda je vhodná zvláště pro přehledné preparáty. Jistou její nevýhodou je, že vyžaduje listy v čerstvém stavu, aby reliéf turgorem napjatých buněk byl dostatečně vý-

razný. Pro herbářový materiál se dobře nehodí. Často nejsou dosti dokonale podány podrobnosti průduchů a odění a dále nelze sledovat různou obarvovací schopnost jednotlivých pokožkových buněk.

Pro systematické a anatomické studie, kdy pracujeme se sušeným materiálem z herbářů, s výše zmíněnými metodami (podrobné návody viz NĚMEC et al. 1962) nevystačíme. V takových případech, kdy nám jde o věrné podání a celkový obraz stavby pokožky (průduchů, odění, žlázek atd.), vyhovuje nejlépe izolace zkutinizovaných částí pokožky chemickou cestou, tj. rozpouštěním mesofylu vhodnými činidly. Tato metoda byla vyzkoušena a upravená celou řadou botaniků a paleobotaniků. V kombinaci s metodou příčných řezů dává úplný a přehledný obraz stavby listu.

Jako maceračního činidla se nejčastěji užívá Schulzeho směs (kyselina dusičná + chlorečnan draselný). Hlavně se tato směs používala k preparaci fosilních kutikul (NATHORST 1908, JURASKÝ 1939). Je vhodná též pro maceraci kožovitých recentních listů (KISSER 1939, FLORIN 1931). Postupujeme tak, že vzorek ponoříme nejprve na 24 a více hodin do zředěné Schulzeho směsi (podle povahy listu) a po omytí vodou do silně zředěného roztoku louhu či amoniaku.

Odlišný postup popisuje KISSER (1939) s použitím kyseliny sírové a peroxidu vodíku. Vzorek se nechá asi 24 hodin v 50% kyselině sírové při zvýšené teplotě (70° C), pak se omyje a působí se na něj 5–10% peroxidem vodíku s amoniakem rovněž 24 hodin při 70° C.

Podobně lze užít dalších činidel, která rozpouštějí mesofyl, jako je např. kyselina chromová (PRÁT 1944) apod. PAČLOVÁ (1961) nejprve vzorky suchých listů změkčila ve směsi ledové kyseliny octové a kyseliny sírové nebo v 3% peroxidu vodíku a po oddělení pokožek je macerovala v Erdtmanově acetylovační směsi.

Výše uvedené postupy většinou obsahují příliš drastické látky, které narušují kutinizované části pokožek. Pro maceraci jemných listů se příliš neosvědčily. Krom toho jsou taková činidla při práci nepříjemná a dráždivá.

Při zpracování fosilních listových zbytků systematicko-anatomickou srovnávací metodou jsem byl nucen řešit metodiku rychlého pořizování pokožkových preparátů recentních listů. Následující postup se mi ve většině případů osvědčil. Účinky působení se totiž dají značně upravovat, aby neutrpěly různě silně kutinizované vrstvy pokožky. Dokonce i v těch případech, kdy vertikální stěny pokožky nebyly ani málo kutinizované, podařilo se získat při trochu opatrnosti obraz pokožkových buněk. Jinou výhodou tohoto postupu je to, že zkracuje použití zdraví škodlivých činidel (Schulzeho směs) na minimum.

Malé části listů (úločky 5 mm v průměru) se nechají ponořené v 30% peroxidu vodíku, mírně zalkalizovaném několika kapkami 10% roztoku draselného louhu. Doba působení a teplota lázně závisí na povaze listu. Zvláště tenké listy macerujeme při pokojové teplotě 1–3 dny (se zvýšenou teplotou se doba působení zkrátí). Tužší listy vyžadují maceraci při zvýšené teplotě (70° C). Vzorky velmi kožovitých listů raději považíme v této lázni asi 30–60 min. Směs se rychle vyčerpává a je třeba ji vždy připravit pro každou maceraci čerstvou. Správně macerované vzorky jsou průsvitné a mají bělavou, slabě nazelenalou barvu. Pak po důkladném opláchnutí ve vodě je vložíme na 2–15 min. do Schulzeho směsi (nasyčený roztok chlorečnanu draselného v kyselině dusičné). Tam vzorky úplně zbělí až žloutnou. Nyní se nechají dokonale vymáčet ve vodě (10 min.). Konečně vzorky přeneseme na misku s 10% roztokem louhu draselného, kde tmavě žloutnou, mesofyl se zvolna rozpustí a pokožky se od něj uvolní. Doba působení závisí na tom, jak rychle vnikne louh do mesofylu (přibližně 5–30 min.). Obvykle jsou pokožky izolované, někdy je nutné je rozdělit preparačními jehlami. Takto získané pokožky barvíme (safranin, Sudan III) a uzavíráme do médií s vhodným indexem lomu podle výraznosti objektů (obvykle vystačíme s glycerolovou želatinou). Pro pozorování skulptury pokožky (tzv. idiokutikulární struktury podle JURASKÝHO 1934) jsou jako doplňkové vhodné preparáty, ve kterých nejsou pokožky uzavřeny v médiu, ale leží volně mezi sklíčky (viz JURASKÝ 1934).

Zvláště důležité pro zdar celého postupu je odhadnutí správné doby působení a teploty první lázně (peroxid). Je-li

nedostačující, nedojde k dokonalému rozpuštění mesofylu a pokožky budou znečištěné, půjdou-li vůbec oddělit. K přemacerování dochází zřídka, jen u jemných listů a za poměrně delší dobu. V takovém případě se nedoporučuje použít druhé lázně (Schulzeno směsi) vůbec nebo jen velmi opatrně.

Zusammenfassung

Bei botanischen und paläobotanischen komparativen systematisch-anatomischen Studien der epidermalen Verhältnisse der Blätter ist es notwendig, ein genaueres Bild der Epidermisstrukturen zu gewinnen. Die gewöhnlich angewandten Methoden weisen aber einige Nachteile auf. In den meisten Fällen gelingt es nicht, die Epidermis rein mechanisch abzuziehen. In diesem Falle gebraucht man meistens Mikrotomschnitte. Abgesehen von der Langwierigkeit dieser Methode bieten die Schnitte keinen guten Überblick über die Struktur, besonders über die Form der Trichome und Drüsen. Die in neuer Zeit empfohlene Abdruckmethode (PAZOUŘEK 1963) reproduziert die Epidermisstrukturen nicht in allen feinen Einzelheiten und gestattet keine Untersuchung der differentialen Färbung der Epidermis.

In den Fällen, wo es sich wirklich um ein vollkommenes Bild der Blattoberfläche handelt, ist es am besten, eine solche Methode anzuwenden, die die kutinisierten Teile der Epidermis durch die Auflösung der Mesophyllgewebe isoliert. Die am häufigsten gebrauchten Reagenzien, wie das Schulzesche Gemisch (vgl. FLORIN 1931, JURASKY 1939), Schwefelsäure mit Hydroperoxyd (KISSER 1939), Chromsäure (PRÁT 1944), Erdtmans Azetolysis-Gemisch (PAČLTOVÁ 1961) u. a., korrodieren gewissermaßen die Kutikula und eignen sich nicht besonders für Mazeration krautiger Blätter.

Der Verfasser erprobte ein Verfahren, das eine Regulation des Wirkungsgrades entsprechend der Blattbeschaffenheit gestattet und das sich bei der Bearbeitung der Laubblätter fast in allen Fällen bewährte.

Die Blattproben mazeriert man in 30% Wasserstoffperoxyd, das durch 10% KOH alkalisiert wurde. Die Wirkungszeit und Temperatur des Bades hängt von der Blattbeschaffenheit ab. Die zarten krautigen Blätter werden binnen 3 bis 5 Tagen bei Zimmertemperatur, die derberen Blätter bei erhöhter Temperatur (70° C) mazeriert. Besonders lederartige Blätter werden 30 bis 60 Min. gekocht. Die richtig mazerierten Proben weisen eine weisse bis schwach grünliche Färbung auf. Dann werden sie gewässert und auf 3–15 Min. ins Schulzesche Gemisch übertragen. Dort färben sie sich ein wenig gelb. Nach gründlichem Abspülen kann man sie in 10% KOH übertragen, wo sich die Mesophyllgewebe auflösen und die Epidermisreste von ihnen trennen. Manchmal ist es notwendig, die Epidermen mit Präparierernadeln zu trennen. Die Epidermisreste kann man dann färben (Safranin, Sudan III) und in Medien mit einem günstigen Brechungsindex montieren. Um ein gutes Gelingen des ganzen Verfahrens zu erreichen, ist es sehr wichtig, die Wirkungszeit und Temperatur des ersten Bades (Wasserstoffperoxyd) richtig abzuschätzen. Wenn die Mazeration ungenügend ist, kann es nicht zur vollkommenen Auflösung des Mesophylls kommen und die Epidermen sind unrein, soweit es überhaupt gelingt, sie vom Mesophyll zu trennen.

Für das Verfahren ist kennzeichnend, dass die kutinisierten Teile der Epidermis nicht zusehr korrodiert werden. Dadurch eignet es sich besonders für die Mazeration krautiger Blätter. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass dieses Verfahren unangenehme gesundheitsschädliche Reagenzien vermeidet.

Literatura

- FLORIN R. (1931): Untersuchung zur Stammesgeschichte der Coniferales und Cordaitales. — K. Svenska Vetén.-Akad. Handl., Stockholm, Berlin, Paris, III, 10 (1) : 1–588.
- JURASKY K. A. (1934): Kutikular-Analyse I. — Biologia generalis, Wien, Leipzig, 10 : 383–402.
- (1939): Die Mazerationsmethoden in der Paläobotanik. — Hanb. biol. Arbeitsmeth., Berlin, Wien, 11 (4) : 331–352.
- KISSER J. (1939): Die Mazerationsmethoden für rezente Pflanzengewebe. — *ibid.* 11 (4) : 285–330.
- NATHORST A. G. (1908): Paläobotanische Mitteilung. 4. Über die Untersuchung kutinisierten fossiler Pflanzenreste. — K. Svenska Vetén.-Akad. Handl. Uppsala, Stockholm, II, 43 (6).
- NĚMEC B. et al. (1962): Botanická mikrotechnika. — Praha.
- PAČLTOVÁ B. (1961): Zur Frage der Gattung Eucalyptus in böhmischer Kreideformation. — Preslia, Praha, 33/2 : 113–129.
- PAZOUŘEK B. (1963): Studium listové epidermis mikroreliefovou metodou. — Preslia, Praha, 35/3 : 210–216.
- PRÁT S. (1944): Rostlina pod drobnohledem. — Praha.