


Adapter stabilizujący do długich preparatów mikroskopowych – budowa i zastosowanie w cyfrowym pozyskiwaniu obrazu

Marcin Klisz, Adam Miodek, Paweł Kojs

Abstrakt. Możliwość wykonywania, za pomocą mikrotomu typu „core-microtome”, preparatów z całych wywierców wygenerowała problem związany ze stabilizacją preparatów podczas procesu pozyskiwania i zapisu ich obrazu. Zaproponowane ostatnio dwa adaptery do długich preparatów mikroskopowych rozwiązały problem ich stabilizacji oraz umożliwiły kontrolę pozycji docelowych fragmentów w polu widzenia obiektywu. Konstrukcje te nie rozwiązują wszystkich potrzeb pojawiających się podczas pozyskiwania obrazu na potrzeby ilościowej anatomii drewna. W artykule proponujemy udoskonaloną wersję adaptera do długich preparatów mikroskopowych wychodzącą naprzeciw potrzebom użytkowników wcześniejszych wersji. Konstrukcje te pozwalają na dalszy rozwój ilościowej anatomii drewna, koncentrując się na seriach pomiarowych komórek ksylemu.

Słowa kluczowe: ilościowa anatomia drewna, preparatyka mikroskopowa, akwizycja obrazu, mikroskopia świetlna

Abstract. Holder for long microslides – construction and application in image acquisition. Automation of the wood microscopic specimens image analysis along with development of new procedures for double-staining slides preparation allow effective use of quantitative wood anatomy in retrospective analysis of xylem structure formation and tree reactions to stressful growth conditions or restoration of long-term growth trends. So far, the main technical challenge in the digitization of long microscopic specimens (up to 400 mm) created from cores, was their stabilization and precise shifting over optical microscopy stage. Recently proposed two adapters solved the above-mentioned problem of stabilization and enabled control of the target positions of the long microscopic specimens fragments in the field of view of the lens. Unfortunately, these devices did not solve all the needs emerging during image acquisition. In this article, we propose an improved version of the adapter for long microscopic specimens that meets the expectations of end-users of earlier versions. Our adapters enable further development of quantitative wood anatomy in particular when focusing on the xylem-cell time series.



Key words: quantitative wood anatomy, micro sectioning, image acquisition, light microscopy

Wstęp

W ostatnim czasie obserwujemy dynamiczny rozwój oraz postępującą automatyzację technik związanych z ilościową anatomią drewna (Fonti i in. 2010, Wegner i in. 2013, von Arx i in. 2014, 2015, 2016, Pacheco i in. 2018). W szczególności związany jest on z ograniczeniem pracochłonności rozpoznawania i pomiaru powierzchni światła oraz ścian komórek ksylemu. Pierwszym etapem tego procesu było skonstruowanie mikrotomu (core-microtome) umożliwiającego tworzenie długich preparatów mikroskopowych z wywierców dordzeniowych oraz opracowanie dedykowanych protokołów preparatyki mikroskopowej, co pozwoliło usprawnić część prac laboratoryjnych (Gärtner i Nievergelt 2010, Schneider i Gärtner 2013, Wegner i in. 2013, Gärtner i in. 2015b, Ivanova i in. 2015). Kolejnym wyzwaniem stojącym przed ilościową anatomią drewna było opracowanie techniki pozyskania obrazów z długich preparatów (Wegner i in. 2013, von Arx i in. 2016).

Jednym z kluczowych elementów przygotowania obrazów cyfrowych preparatów mikroskopowych jest ich digitalizacja za pomocą mikroskopu świetlnego współpracującego z kamerą cyfrową (Gärtner i in. 2015a). Problem stabilizacji długich preparatów na stoliku mikroskopowym podczas procesu ich digitalizacji może być rozwiązany poprzez użycie tekturego adaptera montowanego w zastępstwie klasycznego uchwytu do preparatów mikroskopowych (Gärtner i in. 2015b). Wspomniane rozwiązanie umożliwia utrzymanie szkiełka mikroskopowego w pozycji prostopadłej do osi obiektywu mikroskopowego jedynie podczas pracy w obrębie środkowej części slajdu. Po przesunięciu slajdu do skrajnej pozycji brak podpory pod całą długością preparatu powoduje jego destabilizację. Jednocześnie możliwość wykorzystania śrub mikrometrycznych stolika mikroskopowego do precyzyjnego przesuwania preparatu ograniczona jest ich maksymalnym zakresem ruchu w osi X, zwykle wynoszącym ok. 80 mm. W konsekwencji przesuwanie preparatów o długości 400 mm na stoliku mikroskopowym musi być realizowane manualnie przy ograniczonej precyzji (Ivanova i in. 2015). Alternatywnym rozwiązaniem jest zaproponowany ostatnio adapter do stolika mikroskopu świetlnego (w dwóch wersjach), pozwalający zarówno stabilizować, jak i precyzyjnie kontrolować przesuw długich preparatów mikroskopowych w świetle obiektywu (Klisz i in. 2018). Urządzenia te, pomimo rozwiązania wielu dotychczasowych wyzwań z zakresu digitalizacji preparatów mikroskopowych, nadal wymagają rozwijania ich konstrukcji.

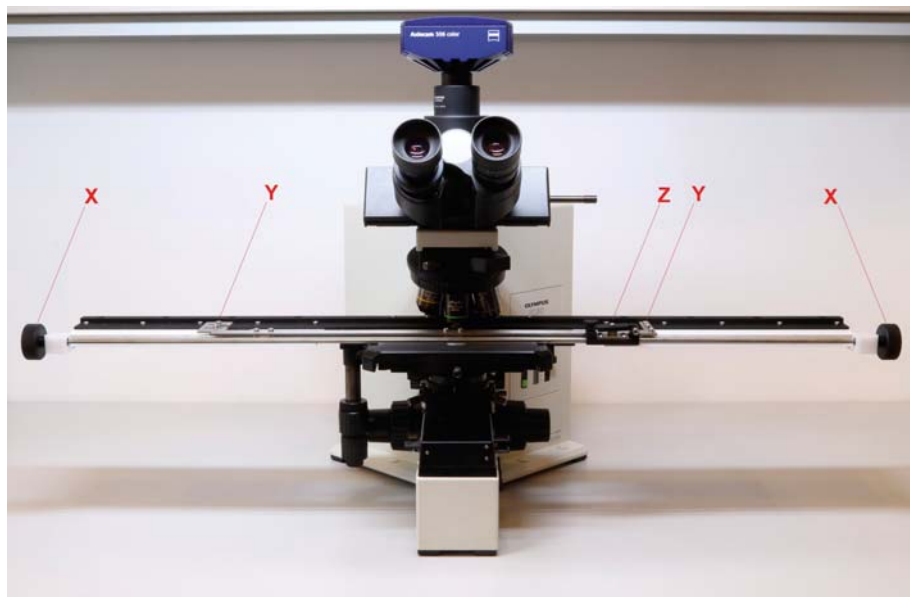
W artykule opisujemy najnowsze rozwiązania techniczne implementowane w konstrukcji trzeciej wersji adaptera do długich preparatów mikroskopowych.

Adapter mikroskopowy do digitalizacji długich preparatów mikroskopowych

Podstawową funkcjonalnością najnowszej wersji adaptera jest stabilizacją długich preparatów mikroskopowych. Urządzenie to umożliwia również mechaniczne przesuwanie preparatów za pomocą dedykowanych śrub mikrometrycznych (ryc. 1, 2a). Konstrukcja adaptera

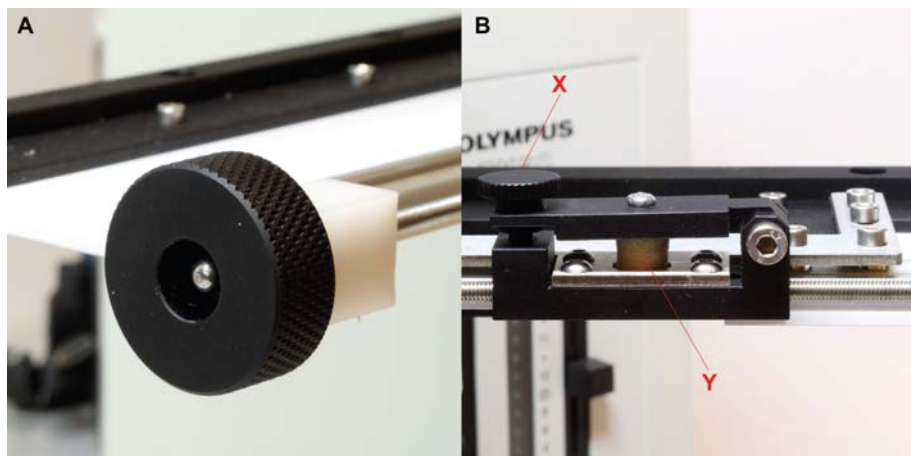
znacząco różni się od poprzednich wersji (Klisz i in. 2018). Podstawę tworzą dwie nieprzezroczyste płyty plastikowe o wymiarach 112 × 98 mm oraz zamknięty profil aluminiowy. Preparat mikroskopowy stabilizowany jest za pomocą dwóch C-kształtnych uchwytów pozwalających na dostosowanie ich rozstawu do długości i szerokości preparatu za pomocą dwóch śrub (ryc. 3a i b). Maksymalna szerokość szkiełka podstawowego możliwa do zamocowania w uchwytach wynosi 40 mm. Ruch preparatu mikroskopowego wzdłuż adaptera realizowany jest po prowadnicy jednocześnie stabilizującej jedną z krawędzi adaptera (ryc. 4).

Kontrola przesuwania slajdu odbywa się za pomocą zdublowanej śruby mikrometrycznej umiejscowionej po lewej i prawej stronie prowadnicy (ryc. 2a). Obrót śrub mikrometrycznych przenoszony jest na uchwyty preparatów za pomocą sprzęgła z filcowym trzpieniem. Docisk filcowego trzpienia do śruby mikrometrycznej regulowany jest poprzez śrubę mocującą sprzęgła (ryc. 2b). Zwolnienie śruby sprzęgła pozwala na manualny przesuw slajdu wzdłuż całej prowadnicy. Konstrukcja ta mocowana jest do stolika mikroskopowego poprzez aluminiowy płaskownik wyprofilowany w sposób umożliwiający mocowanie adaptera do różnych typów stolików mikroskopowych (OLYMPUS, ZEISS) (ryc. 4).

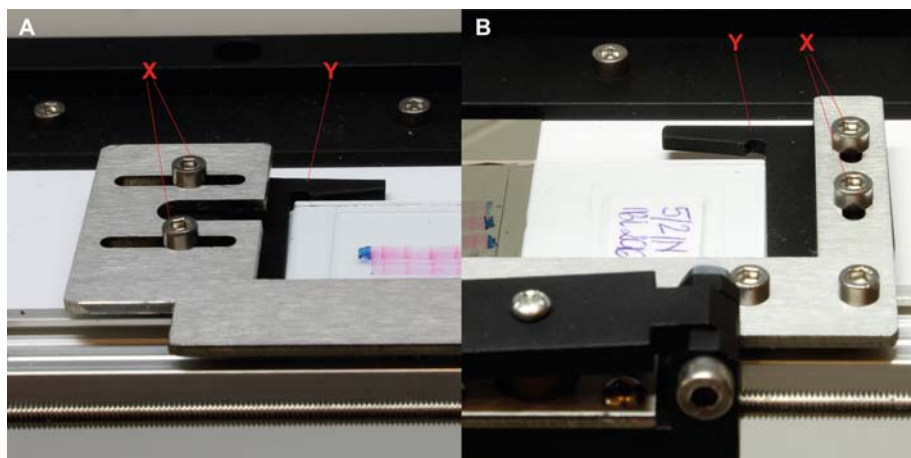


Ryc. 1. Adapter do długich preparatów mikroskopowych zamocowany na stoliku mikroskopu OLYMPUS BX50: X – śruby mikrometryczne, Y – C-kształtne uchwyty do szkiełek podstawowych, Z – sprzęgło do przenoszenia obrotu śruby mikrometrycznej

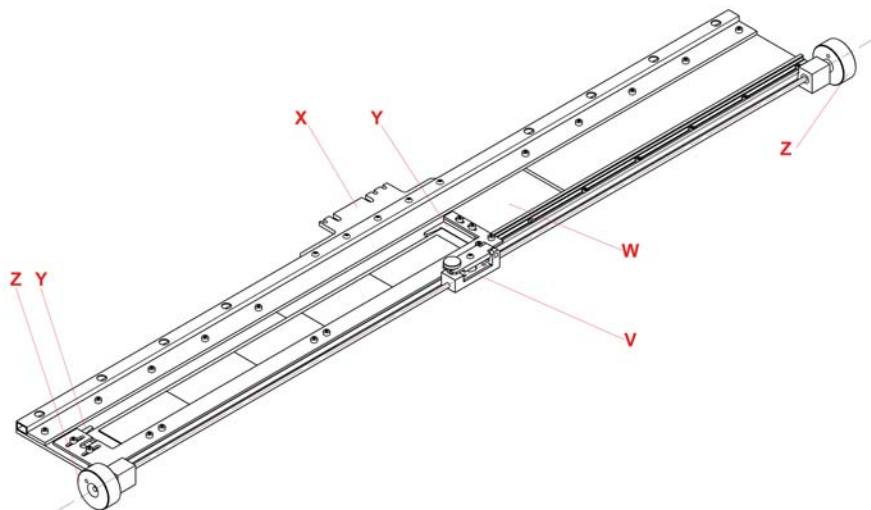
Fig. 1. OLYMPUS BX50 equipped with the long slide holder: X – left and right hand micro-screws, Y – C-shaped handles for 400 mm glass slide, Z – clutch with a felt spindle for shifting transfer



Ryc. 2. Śruba mikrometryczna (A) i sprzęgło do przenoszenia ruchu obrotu śruby mikrometrycznej (B): X – śruba mocująca, Y – filcowy trzpień
Fig. 2. Micro-screw (A) and clutch transferring rotation of the micro-screw (B): X – clamping screw, Y – felt spindle



Ryc. 3. Regulowany mechanizm mocujący do preparatów mikroskopowych – lewa (A) i prawa (B) strona: X – śruby regulacyjne, Y – C-kształtne uchwyty
Fig. 3. Adjustable fixing mechanism for a long glass slide – left (A) and right (B) side: X – adjusting screws, Y – C-shaped handles



Ryc. 4. Konstrukcja adaptera do długich preparatów mikroskopowych: W – prostokątne okno do obserwacji mikroskopowych, V – sprzęgło do przenoszenia ruchu obrotu śruby mikrometrycznej, X – płytki mocująca do stolika mikroskopowego, Y – uchwyty mocujące, Z – śruba mikrometryczna

Fig. 4. Holder for long anatomical slides: W – rectangular window for microscopic observation, V – clutch transferring rotation of the micro-screw, X – mounting plate, Y – adjustable, fixing mechanism, Z – micro-screw

Perspektywy wykorzystania

Zastosowanie zautomatyzowanych technik analizowania obrazów preparatów mikroskopowych ksylemu umożliwia śledzenie kształtowania przebiegu wzrostu promieniowego w kontekście reakcji na zmieniające się warunki sezonu wegetacyjnego (Castagneri i in. 2017, Prendin i in. 2017). Ilościowa analiza parametrów strukturalnych i funkcjonalnych elementów anatomicznych ksylemu pozwala na budowanie chronologii komórkowych umożliwiających retrospektywne analizy fenologii ksylemu, a pośrednio aktywności kambium w kontekście kluczowych parametrów klimatycznych (Carrer i in. 2017).

Ekstremalne wydarzenia klimatyczne trwające zbyt krótko, aby mogły pozostawić sygnał w powszechnie wykorzystywanych w dendroklimatologii cechach struktury drewna, takich jak szerokość słoja rocznego, gęstość drewna czy maksymalna gęstość drewna późnego, mogą modyfikować charakterystyki profili anatomicznych komórek ksylemu (Carrer i in. 2016). Dotyczy to zarówno struktury anatomicznej w drzew nagozależkowych, jak i znacznie bardziej skomplikowanej budowy anatomicznej drzew okrytozależkowych (Wegner i in. 2013, von Arx i in. 2015, Petit i in. 2016, Prendin i in. 2017). Szczególnie u gatunków drzew charakteryzują-

cych się pierścieniowonacyniową budową anatomiczną drewna analizy ilościowe dają możliwość śledzenia zmian specyficznych cech, takich jak grupowanie naczyń drewna wczesnego czy średnicy naczyń drewna późnego (Fonti i in. 2013).

Możliwości wykorzystania ilościowej anatomii drewna nie ograniczają się do śledzenia przebiegu wzrostu promieniowego w części nadziemnej roślin. Metoda ta z sukcesem wykorzystywana jest w badaniach anatomii korzeni roślin zielnych oraz drzew (von Arx i in. 2005, Wrońska-Wałach i in. 2016). Równoległe zastosowanie kilku uzupełniających się metod analizowania przebiegu kształtowania się ksylemu, takich jak izotopy stabilne węgla i azotu razem z ilościową anatomią drewna, pozwala na doskonalsze wyjaśnienie mechanizmów powstawania embolizmu w komórkach systemu waskularnego oraz wykorzystania wody w procesie fotosyntezy będące podłożem zamierania drzew w wyniku suszy (Pellizzari i in. 2016).

Wyżej wymienione zastosowania technik analizowania obrazów preparatów mikroskopowych w badaniach ksylemu, o ile wykorzystywane są długie preparaty mikroskopowe otrzymane z wywiertów dordzeniowych, mogą wymagać ich stabilizacji na stoliku mikroskopowym podczas procesu akwizycji obrazu. W takiej sytuacji adapter do stolków mikroskopowych, umożliwiający stabilizację oraz precyzyjny ruch długich slajdów mikroskopowych, pozwala znacznie usprawnić prace laboratoryjne.

Podziękowania

Badania zostały sfinansowane ze środków przeznaczonych na działalność statutową IBL, 24.02.38. Badania nawiązują do COST ACTION FP 1106 STReESS. Składamy podziękowania Panom Romanowi Mańce i Adrianowi Holkowi z firmy TECH-FORM Sp. z o.o. za pomoc w skonstruowaniu oraz wykonanie adaptera mikroskopowego do digitalizacji długich preparatów mikroskopowych. Szczególne podziękowania składamy Panu Holgerowi Gärtnerowi ze Swiss Federal Research Institute (WSL) w Szwajcarii za inspirację oraz cenne wskazówki podczas prac konstrukcyjnych.

Literatura

- Carrer M., Brunetti M., Castagneri D. 2016. The imprint of extreme climate events in century-long time series of wood anatomical traits in high-elevation conifers. *Front. Plant Sci.* 7, 683. doi:10.3389/fpls.2016.00683
- Carrer M., Castagneri D., Prendin A.L., Petit G., von Arx G. 2017. Retrospective Analysis of Wood Anatomical Traits Reveals a Recent Extension in Tree Cambial Activity in Two High-Elevation Conifers. *Front. Plant Sci.* 8: 737. doi:10.3389/fpls.2017.00737
- Castagneri D., Fonti P., von Arx G., Carrer M. 2017. How does climate influence xylem morphogenesis over the growing season? Insights from long-term intra-ring anatomy in *Picea abies*. *Ann. Bot.* 119: 1011–1020. doi:10.1093/aob/mcw274
- Fonti P., von Arx G., García-González I., Eilmann B., Sass-Klaassen U., Gärtner H., Eckstein D. 2010. Studying global change through investigation of the plastic responses of xylem anatomy in tree rings. *New Phytol.* 185: 42–53. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.03030.x
- Fonti P., von Arx G., Kueffer C. 2013. Quantifying plasticity in vessel grouping - Added value from the image analysis tool ROXAS. *IAWA J.* 34: 433-445. doi:10.1163/22941932-000000035
- Gärtner H., Cherubini P., Fonti P., von Arx G., Schneider L., Nievergelt D., Verstege A., Bast A., Schweingruber F.H., Büntgen U. 2015a. A Technical Perspective in Modern Tree-ring Research - How to Overcome Dendroecological and Wood Anatomical Challenges. *J. Vis. Exp.* e52337.

doi:10.3791/52337

- Gärtner H., Banzer L., Schneider L., Schweingruber F.H., Bast A. 2015b. Preparing micro sections of entire (dry) conifer increment cores for wood anatomical time-series analyses. *Dendrochronologia* 34: 19-23. doi:10.1016/j.dendro.2015.03.004
- Ivanova A., Dolezal J., Gärtner H., Schweingruber F., Ivanova A. 2015. Forty centimeter long transverse and radial sections cut from fresh increment cores. *IAWA J.* 36: 460-463. doi:10.1163/22941932-20150115
- Klisz M., Kojs P., Miodek A., Gärtner H. 2018. Holders for long anatomical slides for microscope stages. *IAWA J.* 40(1):1-8. DOI 10.1163/22941932-20170213.
- Pacheco A., Camarero J.J., Carrer M. 2018. Shifts of irrigation in Aleppo pine under semi-arid conditions reveal uncoupled growth and carbon storage and legacy effects on wood anatomy. *Agric. For. Meteorol.* 253-254: 225-232. doi:10.1016/j.agrformet.2018.02.018
- Pellizzari E., Camarero J.J., Gazol A., Sangüesa-Barreda G., Carrer M. 2016. Wood anatomy and carbon-isotope discrimination support long-term hydraulic deterioration as a major cause of drought-induced dieback. *Glob. Chang. Biol.* 22: 2125-2137. doi:10.1111/gcb.13227
- Petit G., Savi T., Consolini M., Anfodillo T., Nardini A. 2016. Interplay of growth rate and xylem plasticity for optimal coordination of carbon and hydraulic economies in *Fraxinus ornus* trees. *Tree Physiol.* 36: 1310-1319. doi:10.1093/treephys/tpw069
- Prendin A.L., Petit G., Carrer M., Fonti P., Björklund J., von Arx G. 2017. New research perspectives from a novel approach to quantify tracheid wall thickness. *Tree Physiol.* 37: 976-983. doi:10.1093/cercor/bhw393
- Schneider L., Gärtner H. 2013. The advantage of using a starch based non-Newtonian fluid to prepare micro sections. *Dendrochronologia* 31: 175-178. doi:10.1016/j.dendro.2013.04.002
- von Arx G., Carrer M., 2014. Roxas -A new tool to build centuries-long tracheid-lumen chronologies in conifers. *Dendrochronologia* 32: 290-293. doi:10.1016/j.dendro.2013.12.001
- von Arx G., Arzac A., Olano J.M., Fonti P. 2015. Assessing Conifer Ray Parenchyma for Ecological Studies: Pitfalls and Guidelines. *Front. Plant Sci.* 6: 1016. doi:10.3389/fpls.2015.01016
- von Arx G., Crivellaro A., Prendin A.L., Cufar K., Carrer M. 2016. Quantitative wood anatomy - practical guidelines. *Front. Plant Sci.* 7: 781. doi:10.3389/fpls.2016.00781
- Wegner L., Eilmann B., Sass-Klaassen U., von Arx G. 2013. ROXAS - An efficient and accurate tool to detect vessels in diffuse-porous species. *IAWA J.* 34: 425-432. doi:10.1163/22941932-00000034
- Wrońska-Walach D., Sobucki M., Buchwał A., Gorczyca E., Korpak J., Wałdykowski P., Gärtner H. 2016. Quantitative analysis of ring growth in spruce roots and its application towards a more precise dating. *Dendrochronologia* 38: 61-71. doi:10.1016/j.dendro.2016.03.009

Marcin Klisz¹ *, Adam Miodek^{2,3}, Paweł Kojs²

¹ Instytut Badawczy Leśnictwa, Zakład Hodowli Lasu i Genetyki Drzew Leśnych

² Polska Akademia Nauk, Ogród Botaniczny, Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej w Powsinie

³ Uniwersytet Opolski, Samodzielna Katedra Biosystematyki

* m.klisz@ibles.waw.pl