

Mikroreliefová metoda

metoda studia povrchu
neprůhledných objektů

Možnosti studia povrchu neprůhledných objektů

- mikroskopie v dopadajícím „osvětlení“
 - optická (např. mikroskop Lug Zeiss)
 - elektronová - SEM, kryo SEM (aquaSEM)
- izolace povrchové vrstvy
- zhotovení otisku mikroreliéfu
- konfokální mikroskopie

Lug Zeiss Jena

Mikroskop pro práci
v **dopadajícím** světle

speciální konstrukce
objektivu, který
štěrbinou ve vnějším
plášti osvětluje
objekt shora

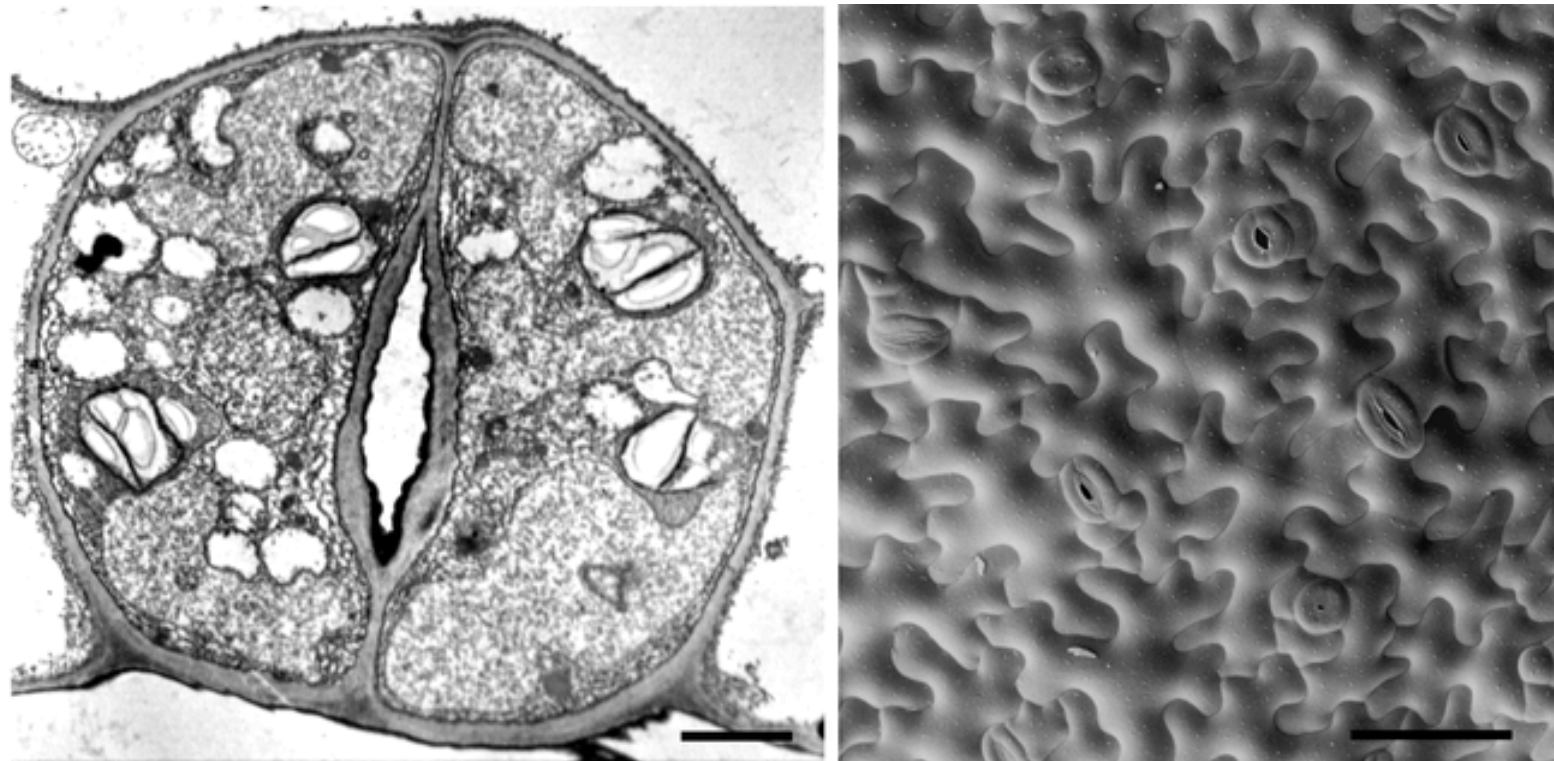
časté využití při
studiu epidermis a
průduchů



Terminologie průduchů

- **průduch** (**stoma**, pl. **stomata**) - zajišťují výměnu plynů (CO_2 , O_2) mezi ovzduším a mezofylem listu a výdej vodní páry z listu do ovzduší
- je tvořen 2 **svěracími buňkami**, nejčastěji ledvinovitého tvaru, které ohraničují pór, jehož velikost je aktivně regulována
- změny tvaru svěracích buněk jsou ovlivňovány turgorem
- **stomatální komplex** = průduch + okolní epidermální buňky
- **buňka sousední** (**Neighbour cell**) - epidermální buňka v kontaktu s průduchem nebo jeho prekurzorem morfologicky stejná jako ostatní epidermální buňky
- **buňka vedlejší** (**Subsidiary cell**) - epidermální buňka v kontaktu s průduchem nebo jeho prekurzorem, morfologicky odlišná od ostatních epidermálních buněk

Tvar a rozmístění průduchů děloha *Arabidopsis thaliana* Heynh.



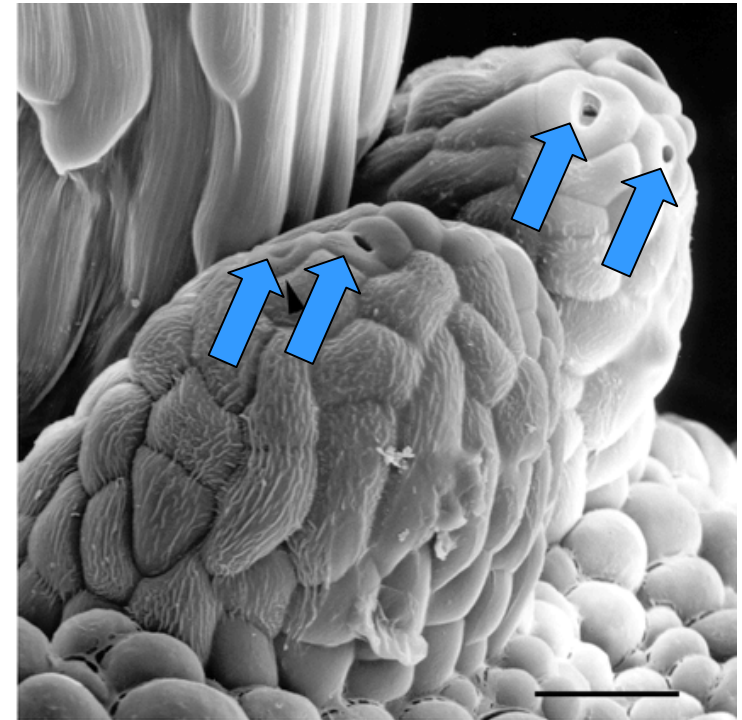
Transmission electron micrograph
Zhao and Sack (1999)
Bar = 2 μm

Nadeau J.A. and Sack F.D.
The Arabidopsis Book, 2002

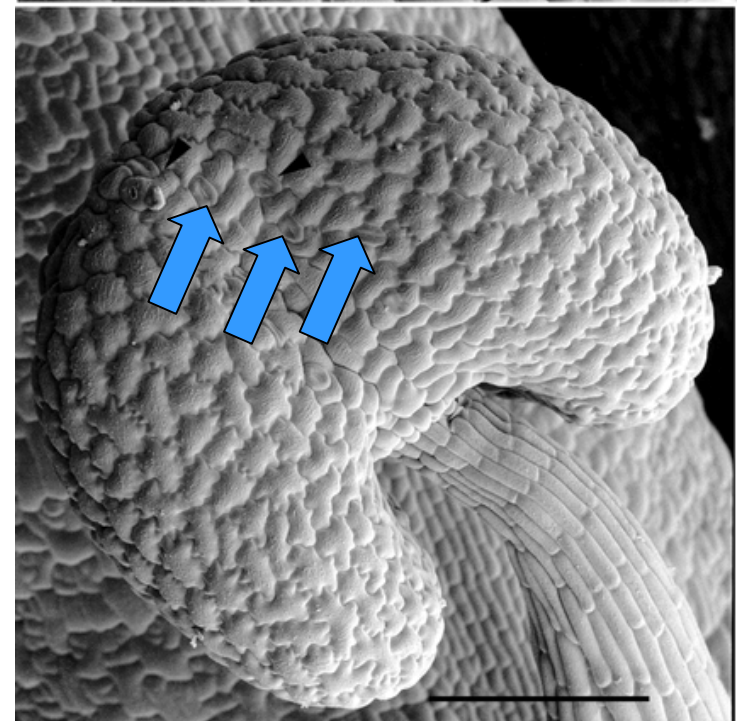
Cryo-scanning electron micrograph
of maturing epidermis from a cotyledon.
The larger, non-stomatal cells are pavement cells
that are shaped like pieces of a jigsaw puzzle.
Bar = 30 μm

Tvar a rozmístění průduchů květní orgány *Arabidopsis thaliana* Heynh.

Cryo-scanning electron micrograph - stomata
(hydatody) na vrcholu nektarií



Cryo-scanning electron micrograph - stomata
na abaxiální epidermis prašníku



Anther micrograph from Kim Findlay.
Bars = 30 μm (top) and 100 μm (bottom).

Nadeau J.A. and Sack F.D.
The Arabidopsis Book, 2002

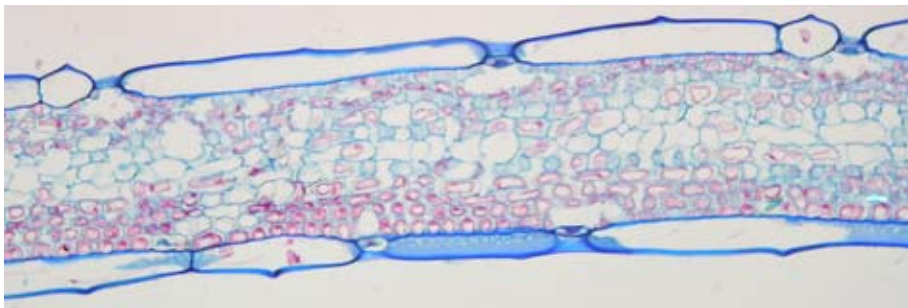
Listy podle umístění průduchů

- **hypostomatické** - stomata většinou (až u 90%) na spodní (**abaxiální**) straně listu, ve svrchní epidermis mohou zcela chybět = nejčastější typ
- **amfistomatické** - stomata na obou stranách listu ve srovnatelném počtu (*Iris*, trávy)
- **epistomatické** - stomata pouze na svrchní (**adaxiální**) straně listu (vzplývavé listy vodních rostlin, některé trávy - *Festuca*, *Melica*, *Brachypodium*)

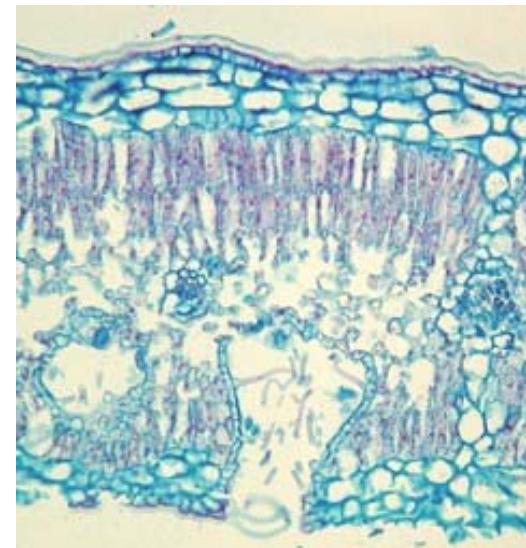
Stomata podle umístění na listech

- **stomata faneroporní** - svěrací buňky a epidermis leží v jedné rovině = nejčastější případ
- **stomata emerzní** - vyčnívají nad úroveň epidermis - hygropyty, plovoucí listy vodních rostlin
- **stomata submerzní** - ponořená stomata - xerofyty (*Iris*, *Chlorophytum*, *Pinus*, *Nerium oleander*)

Iris



amfistomatický list, stomata submerzní



*Nerium
oleander*

hypostomatický list, stomata submerzní v dutině s trichomy

Typy stomat podle anatomie a mechaniky

Pteridofytní typ

hřbetní stěna svěracích buněk je silná, lumen buněk se mění z oválu na kruh

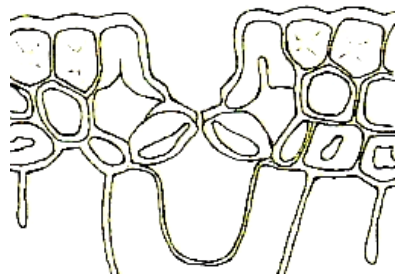
kapradiny



Gymnospermní typ

svěrací buňky ponořené, silnostěnné, malá možnost pohybu, na zimu se zavírají voskem

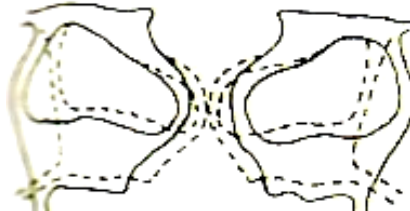
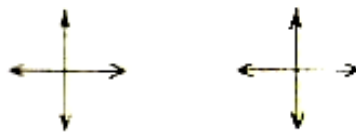
jehličnany



typ Helleborus

břišní stěna svěracích buněk je nerovnoměrně ztlustlá, hřbetní zůstává pružná dvouděložné

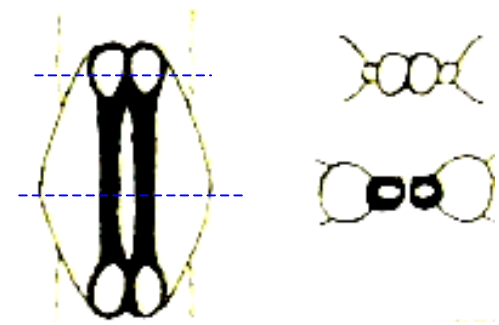
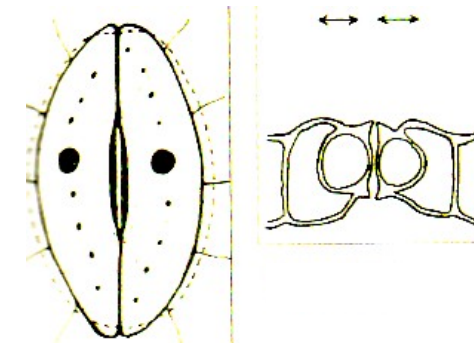
i některé jednoděložné



typ Amaryllis

břišní stěna svěracích buněk je vyztužená, nepružná, hřbetní zůstává pružná

časté u jednoděložných rostlin



Typ Graminae

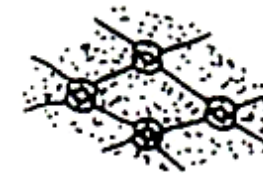
svěrací buňky tvaru piškotů + vedlejší buňky trávy, ostřice, sítiny, akácie

Klasifikace stomat podle počtu a uspořádání obklopujících buněk

- **stomata izocytická** - epidermální buňky se neliší od buněk epidermis (vývoj haplocheilický)



- **anomocytická**
- **anomotetracytická** (*Chlorophytum, Iris*)



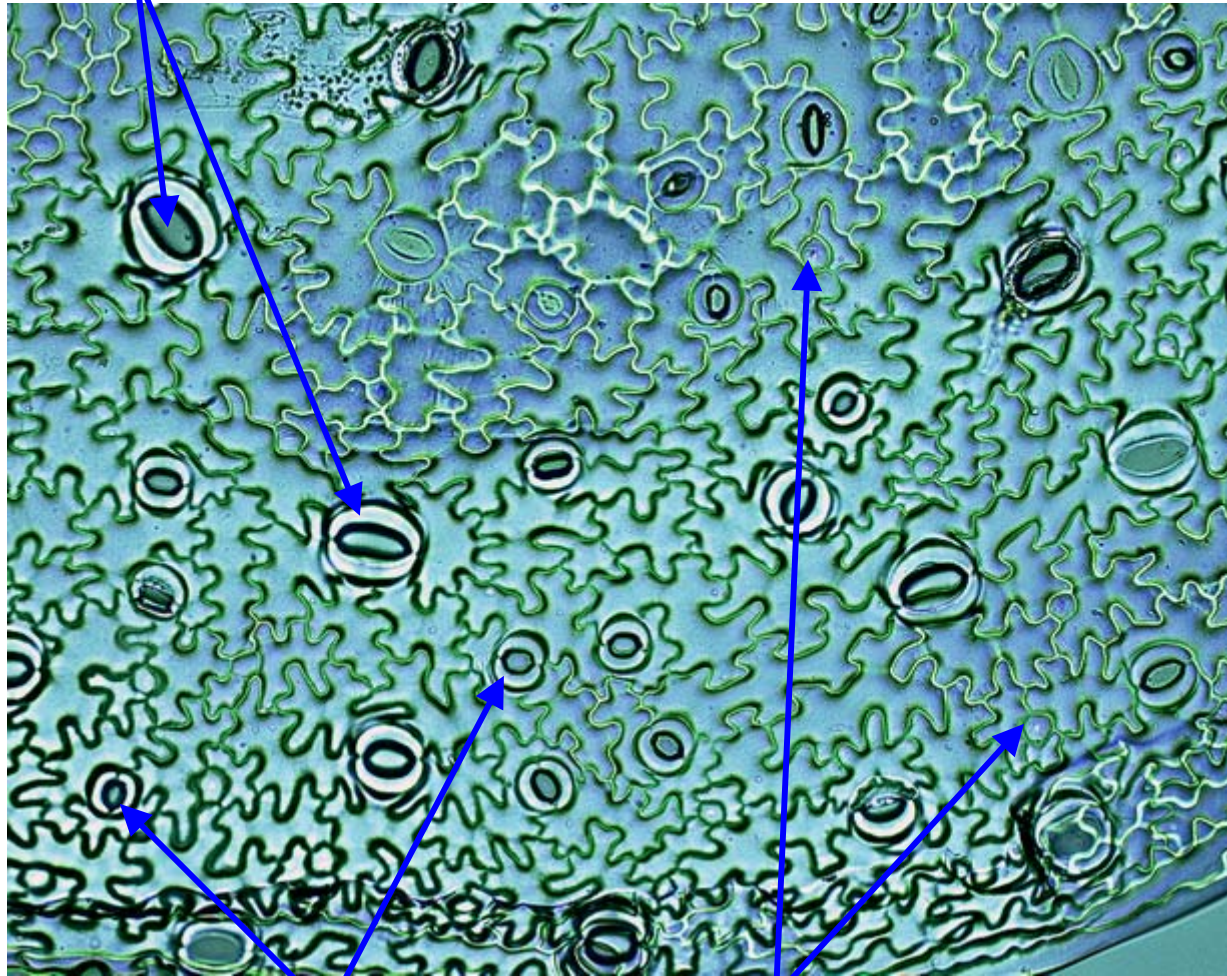
- **stomata anizocytická** - vývoj syndetocheilický - diferencované sousední buňky různě uspořádané:

- **paracytická** (*Magnolia, Cyperus*)
- **brachyparatetracytická** (*Tradescantia*)
- **polocytická** (*Dryopteris, Nephrolepis*)
- **amfianizocytická** (*Begonia*)



Tvar a rozmístění a vývoj průduchů adaxiální strana dělohy tabáku *Nicotiana tabacum* L.

zralý průduch



mladý průduch

mateřská buňka průduchu

Stomatální densita:
(hustota průduchů)

=

počet průduchů na
jednotku plochy

Stomatální index:

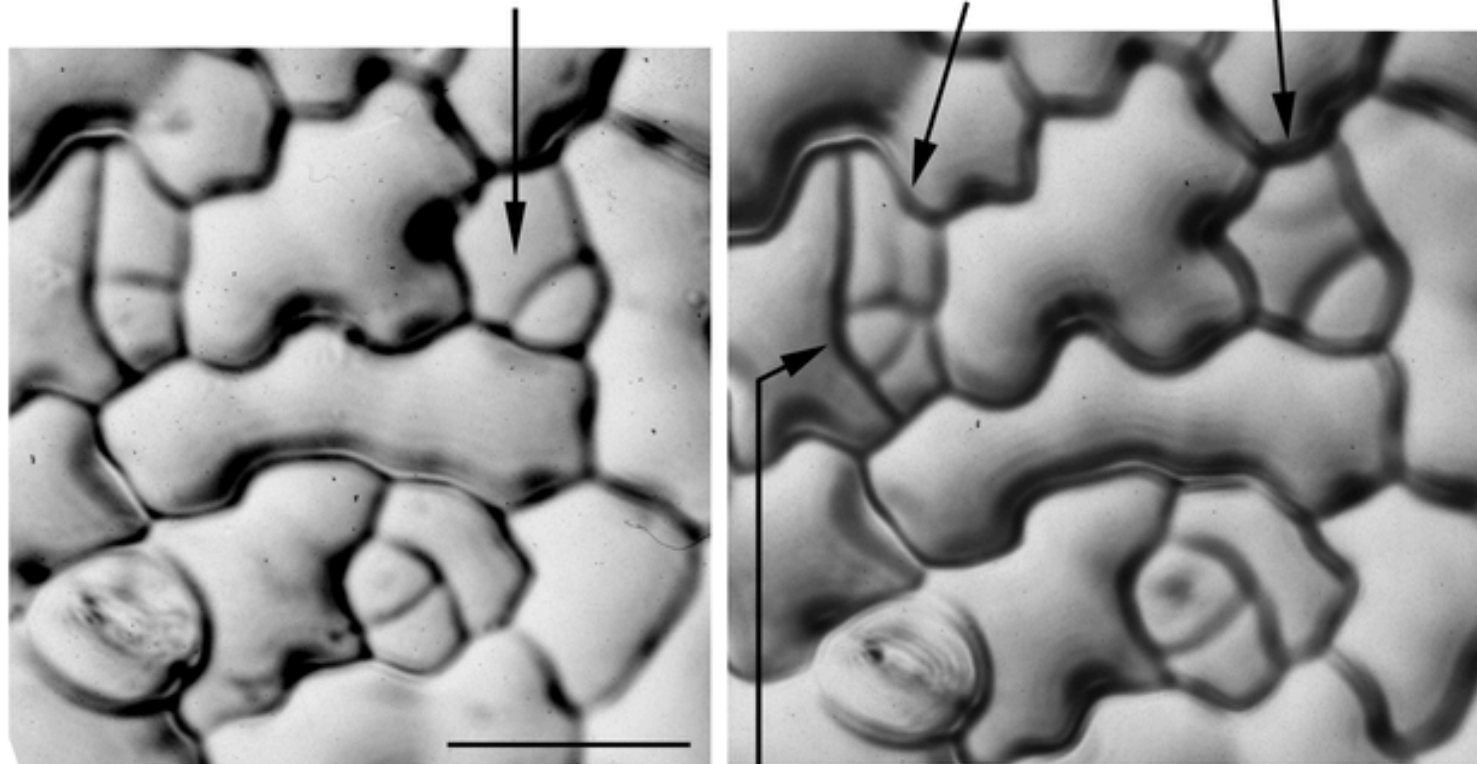
počet průduchů dělený
celkovým počtem
epidermálních buněk
včetně stomat.

Syndetocheilický vývoj průduchů

Abaxiální strana dělohy *Arabidopsis*

sledování pomocí otisku v laku na nehty

Symmetric division Satellite meristemoid formation



Day 6

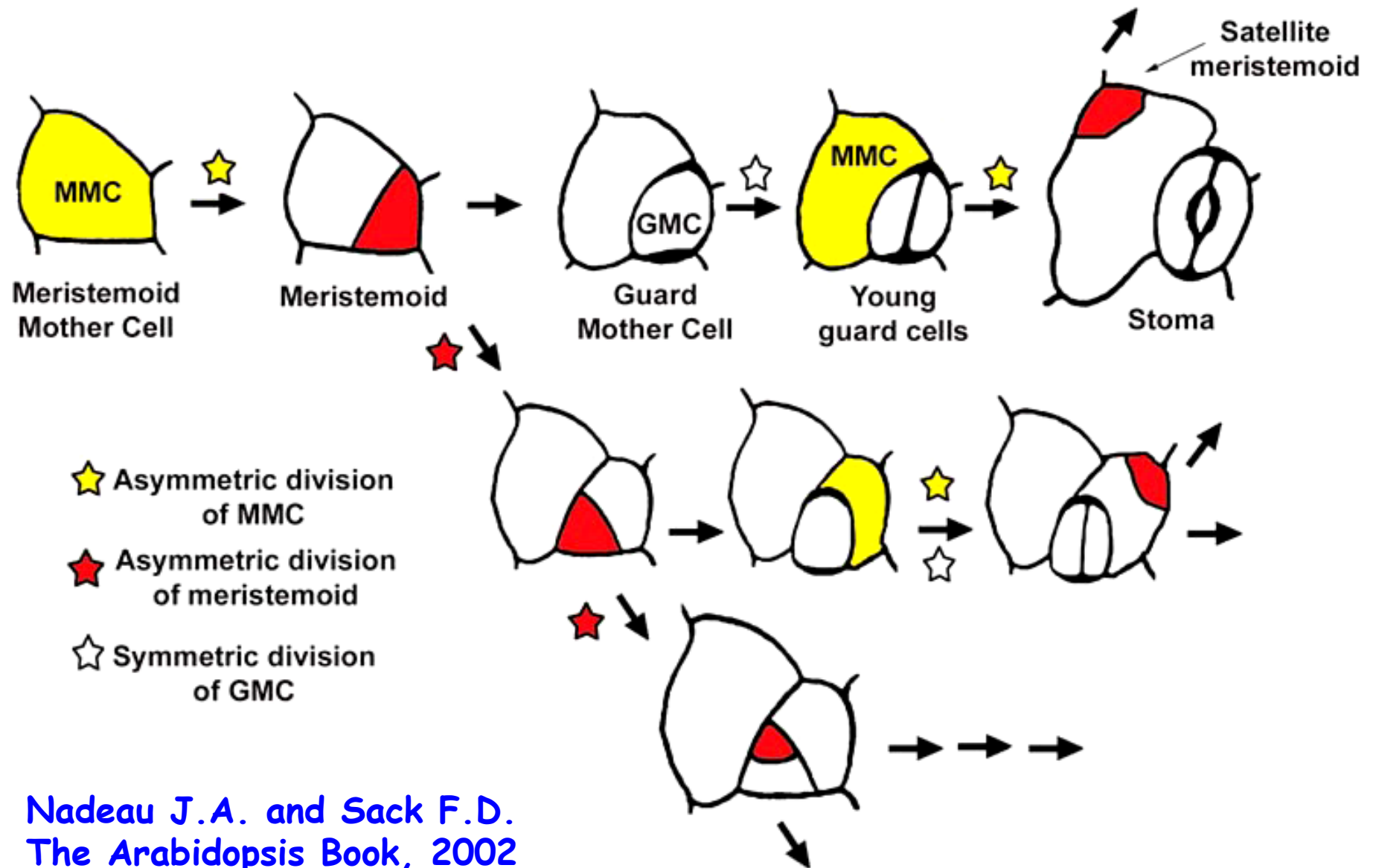
Meristemoid formation

Day 7

Bar = 25 μm

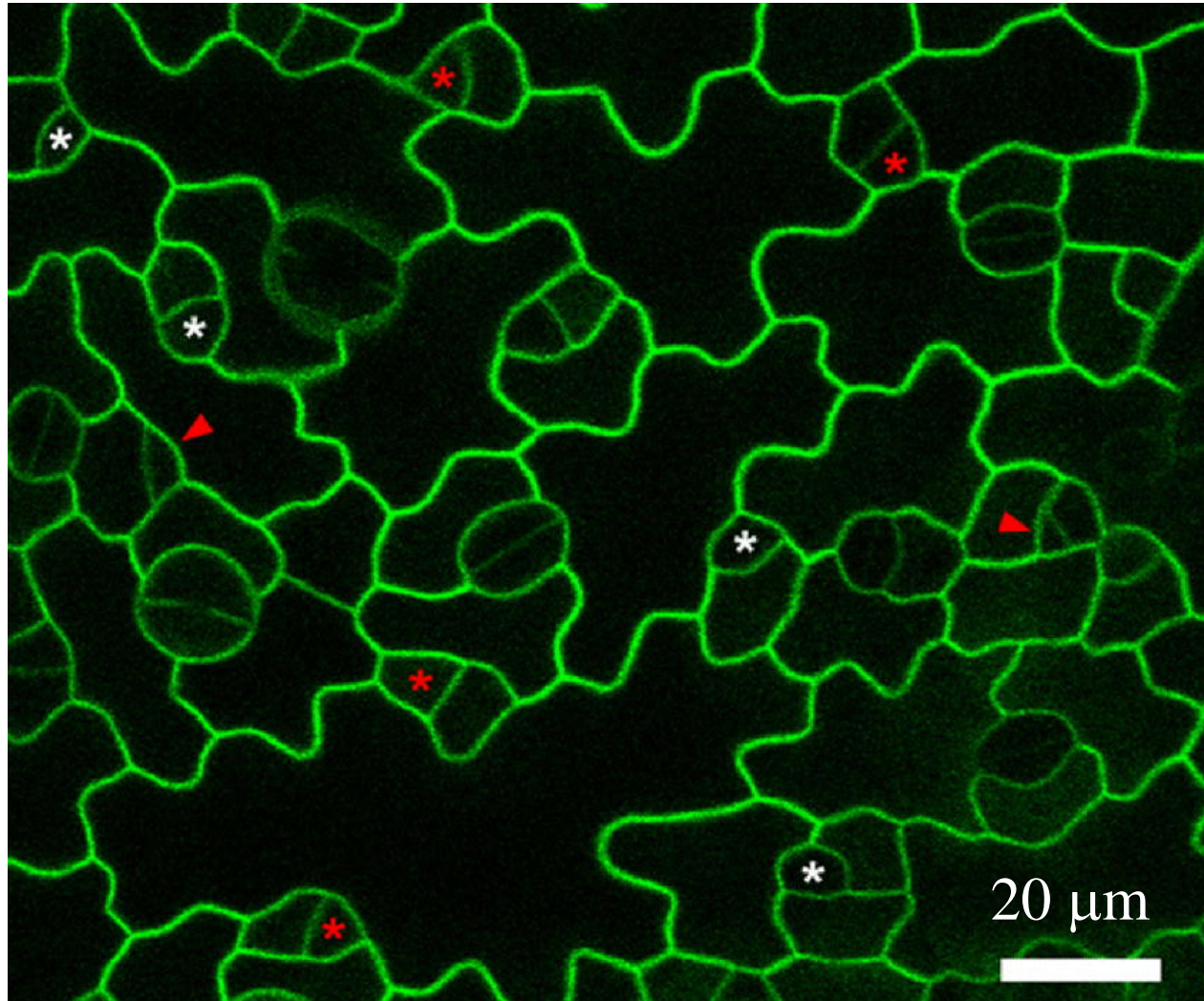
Geisler et al. (2000)

Diagram hlavních buněčných typů a dělení ve vývoji průduchů u *Arabidopsis*



Nadeau J.A. and Sack F.D.
 The Arabidopsis Book, 2002

Konfokální snímek abaxiální epidermis listu *Arabidopsis*



vizualizace
buněčných stěn =

GFP lokalizovaný
v plazmatické
membráně ("Q8")

Cutler et al.
2000

Definice rozlišovací schopnosti

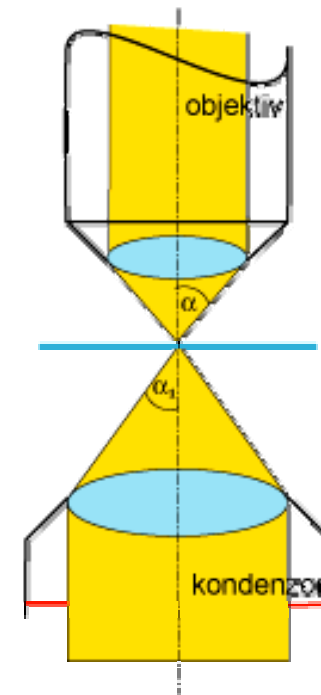
$$a = \frac{\lambda}{A} = \frac{\lambda}{n \cdot \sin \alpha}$$

λ - vlnová délka světla

A - numerická apertura

n - index lomu

α - polovina otvorového úhlu (otvorový úhel lze zvětšit pomocí šikmého osvětlení)



Vliv šikmého osvětlení na rozlišovací schopnost



Možnosti nastavení šikmého osvětlení

- zešikmením zrcátka (používáme plochou stranu zrcátka)
- vložením stínícího disku s excentricky umístěným otvorem
- vysunutí aperturní clony mimo optickou osu
- vysunutí kondenzoru mimo optickou osu