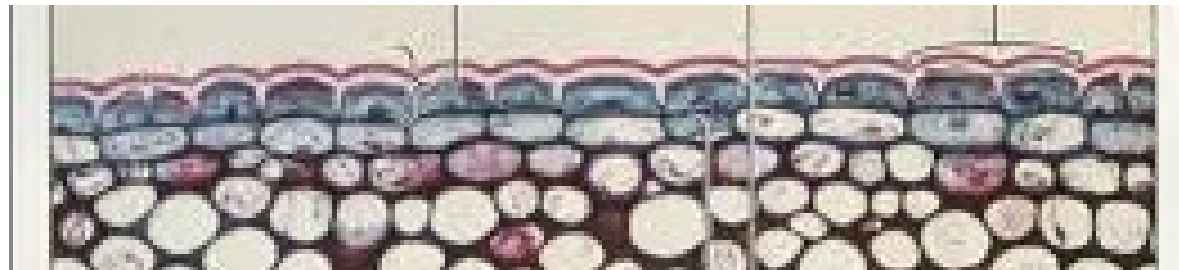


# Metody studia neprůhledných objektů – Mikroreliéfová metoda

Botanická mikrotechnika 2024

H. Cempírková



# Cíle cvičení

- vyjmenovat různé metody studia povrchu rostlinného těla
- vysvětlit principy těchto metod
- vytvořit preparát, na kterém je možné rozlišit jednotlivé struktury na povrchu pozorovaného objektu
- posoudit vhodnost metody na různé rostlinné objekty a vybrat tu nejvhodnější
- posoudit kvalitu získaného preparátu a ovládat možnosti, jak preparát nebo pozorování vylepšit

# 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



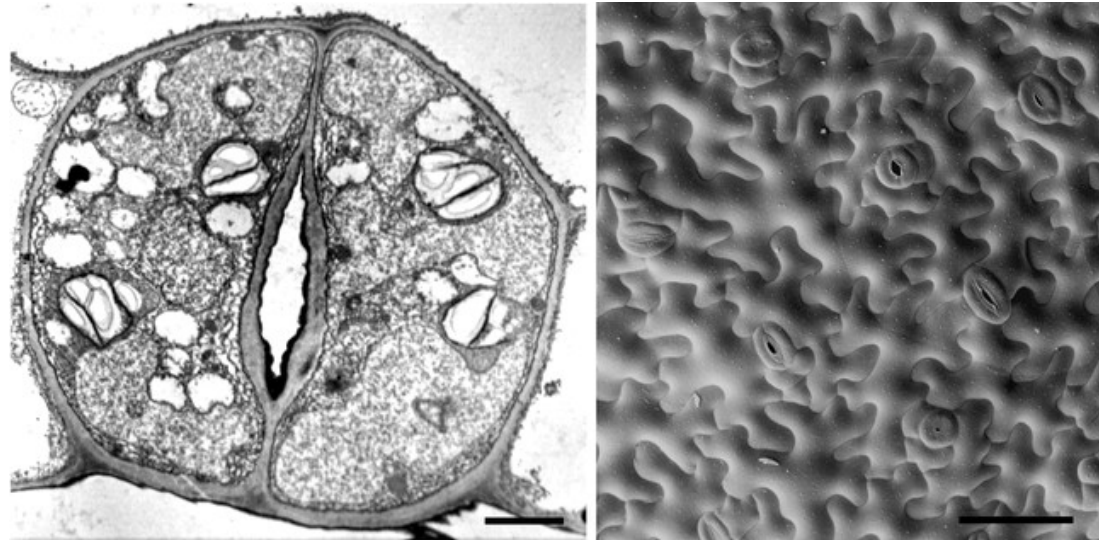
**2 svěrací  
buňky**

Průduchová štěrbin

**Vedlejší buňky** **Stomatální  
komplex**

**Epidermální buňky**

**Tvar a rozmístění průduchů  
děloha *Arabidopsis thaliana* Heynh.**



**Transmission electron  
micrograph  
Zhao and Sack (1999)  
Bar = 2  $\mu$ m**

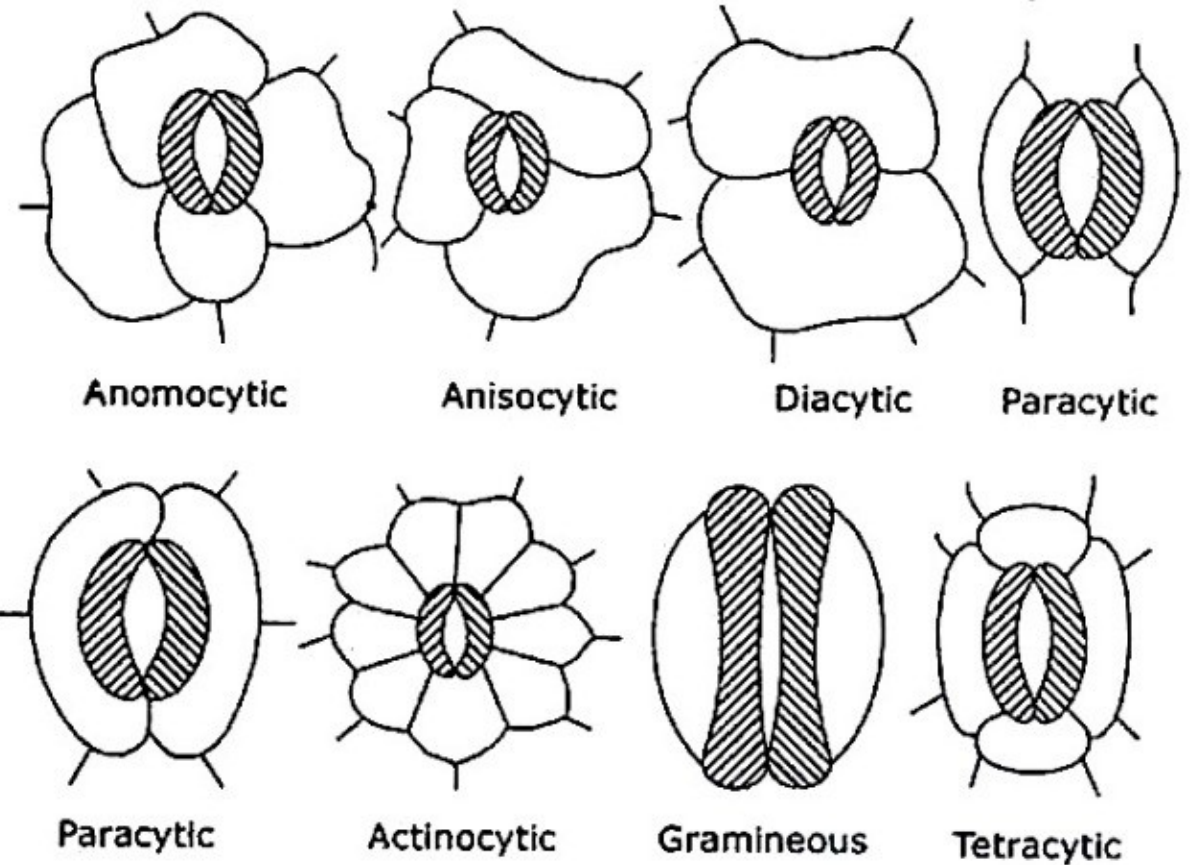
**Cryo-scanning electron micrograph  
of maturing epidermis from a cotyledon.  
The larger, non-stomatal cells are pavement cells  
that are shaped like pieces of a jigsaw puzzle.  
Nadeau J.A. and Sack F.D. Bar = 30  $\mu$ m  
The Arabidopsis Book, 2002**

## 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



# Klasifikace stomat podle počtu a uspořádání obklopujících buněk

- stomata izocytická – epidermální buňky se neliší od buněk sousedních

- anomocytická

- anomotetracytická (*Chlorophytum, Iri*



- stomata anizocytická –

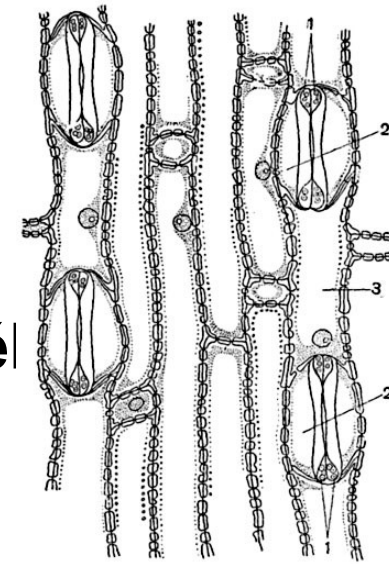
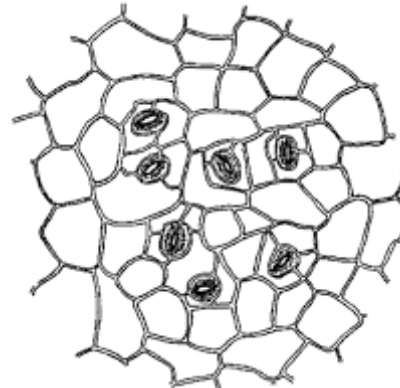
- diferencované sousední buňky různě uspořádané:

- paracytická (*Magnolia, Cyperus*)

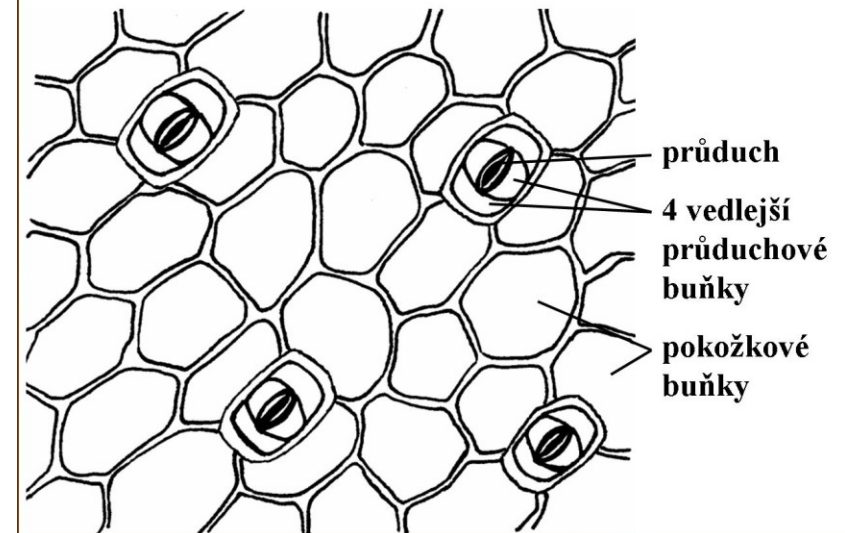
- brachyparatetracytická (*Tradesc*

- polocytická (*Dryopteris, Nephrole*

- amfianizocytická (*Begonia*)

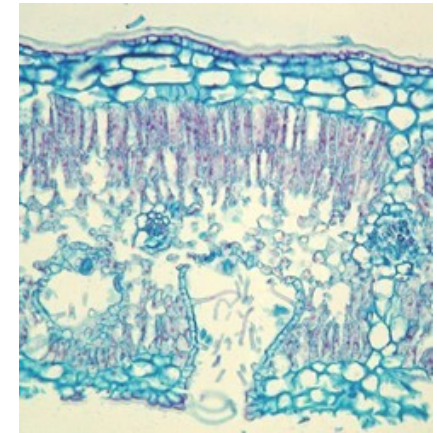
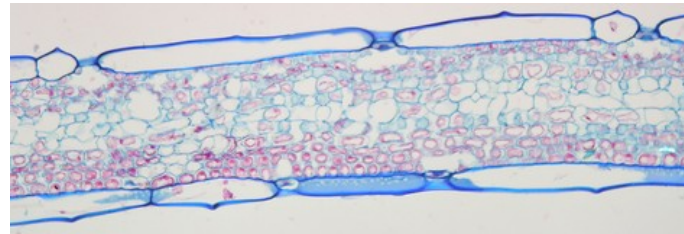


Pokožka a průduchy ze spodní strany listu *Rhoëo discolor* (*Tradescantia spathacea*)



# Listy podle umístění průduchů

- **hypostomatické** – nejčastější typ, dvouděložné
- **amfistomatické** – (Iris, trávy), jednoděložné
- **epistomatické** – (vzplývavé listy vodních rostlin, některé trávy – *Festuca*, *Melica*, *Brachypodium*)



- HYPOSTOMATIC LEAF



- EPISTOMATIC LEAF



- AMPHYSTOMATIC LEAF



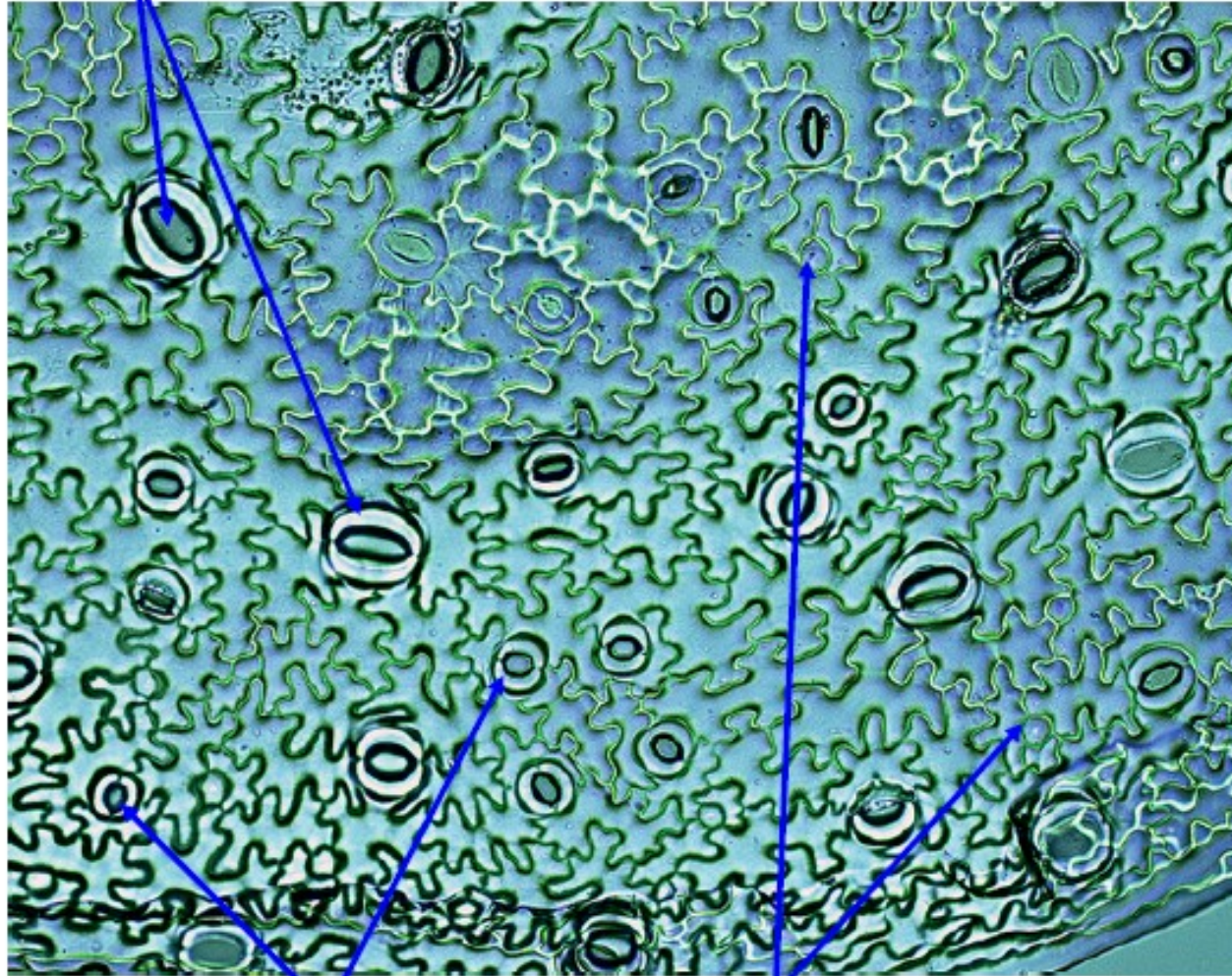
## Stomata podle umístění na listech

- **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*)



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

zralý průduch



mladý průduch

mateřská buňka průduchu

*Stomatální densita:*  
(hustota průduchů)

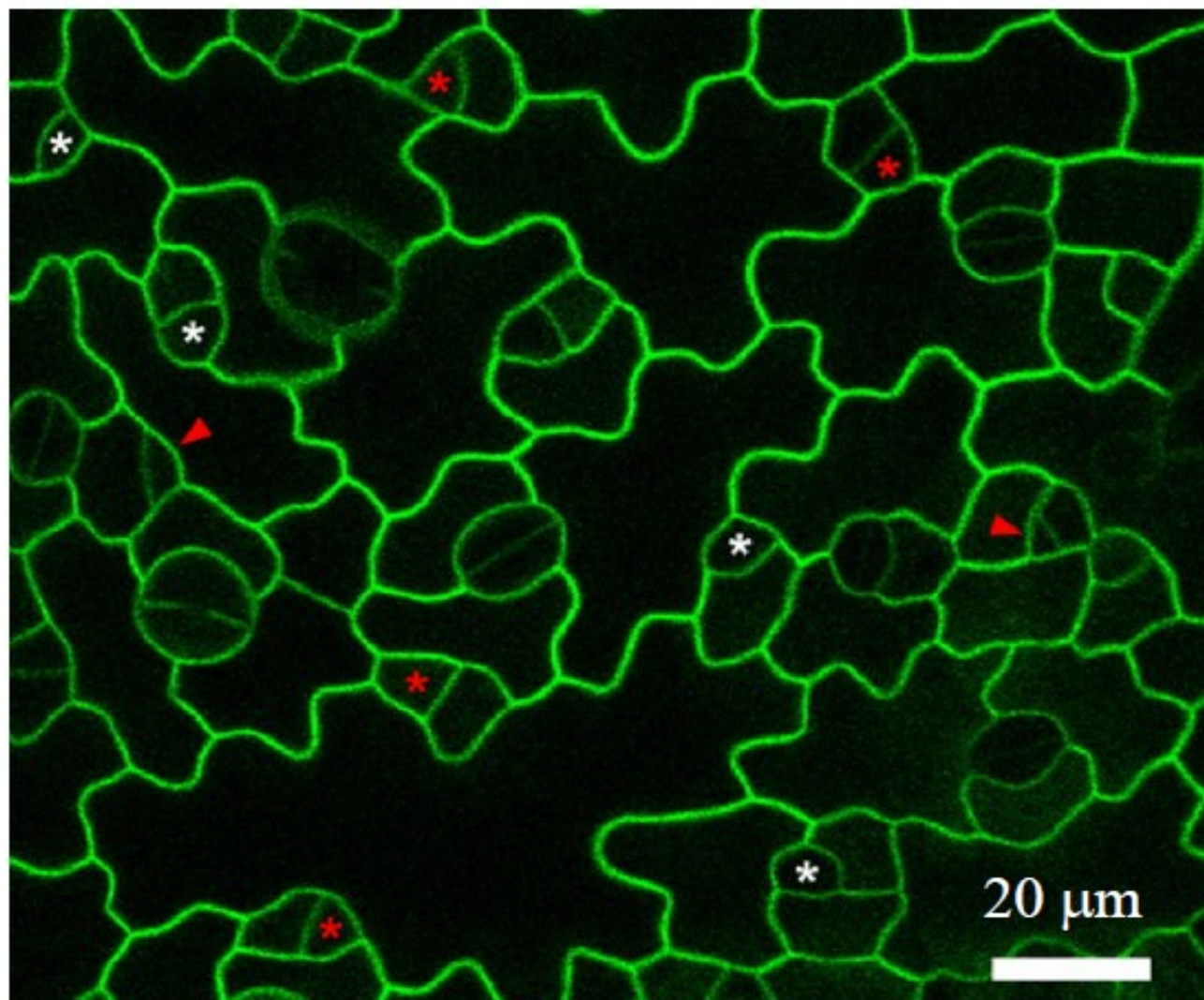
=

počet průduchů na  
jednotku plochy

*Stomatální index:*

počet průduchů dělený  
celkovým počtem  
epidermálních buněk  
včetně stomat.

## Konfokální snímek abaxiální epidermis listu *Arabidopsis*



vizualizace  
buněčných stěn =

GFP lokalizovaný  
v plazmatické  
membráně ("Q8")

Cutler *et al.*  
2000

# Vliv šikmého osvětlení na rozlišovací schopnost



Fotoğraf: George Steinmetz

© 2005 National Geographic Society. Her hakkı saklıdır.

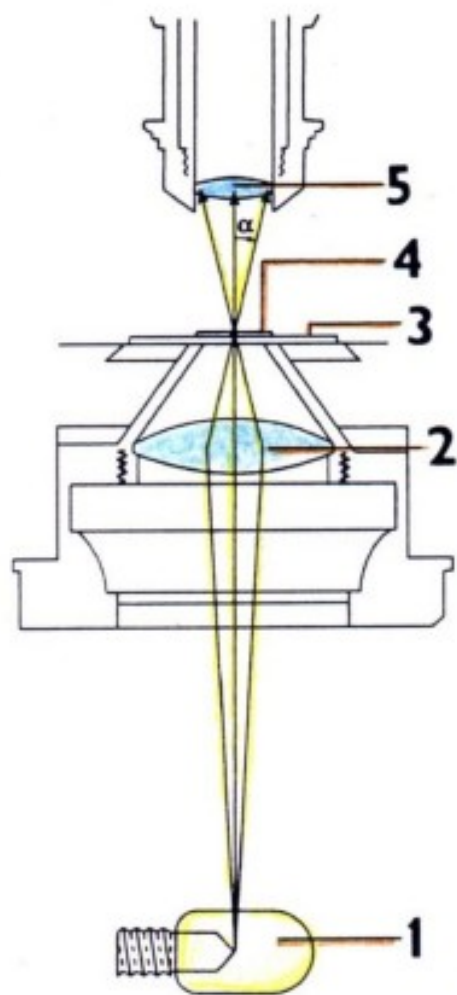
Dev Develer

National Geographic Türkiye, Şubat 2005

# Temné pole (zástin)

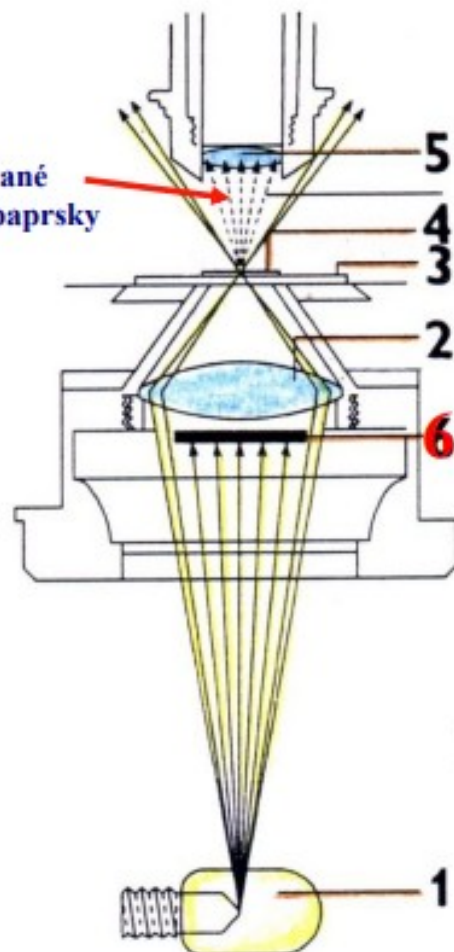
- **Princip:**

- **primární záření (nedifraktované) nevstupuje do objektivu**
- **pozorovaný objekt je osvětlen pouze šikmo dopadajícími světelnými paprsky (difraktované záření), které se od něj odrážejí, lámou a ohýbají se na něm**



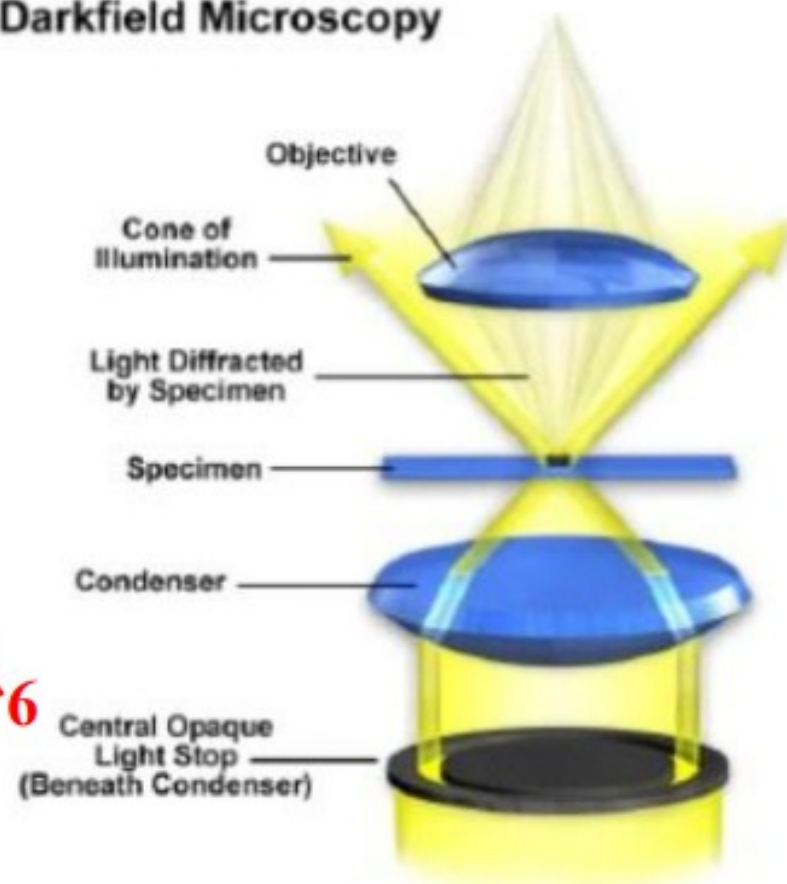
**Procházející světlo**

difraktované  
světelné paprsky



**Zástin**

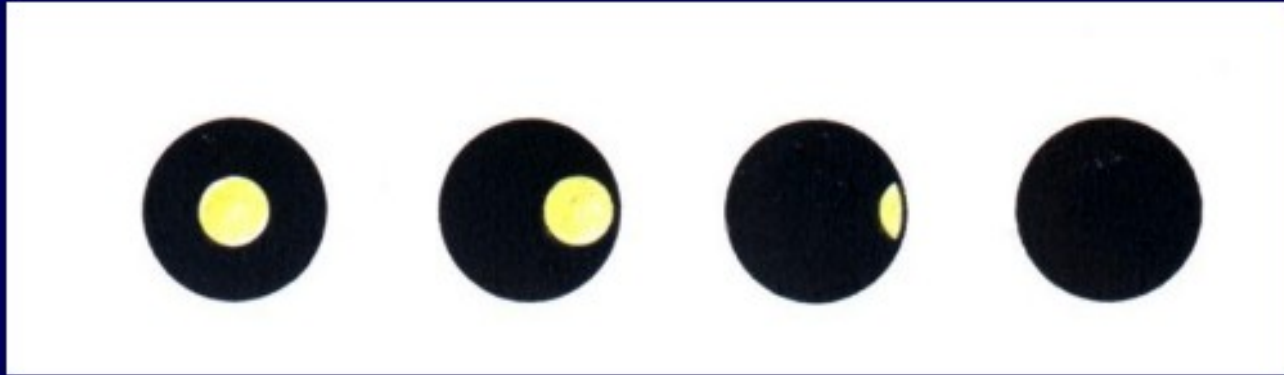
## Darkfield Microscopy



Davidson and Abramowitz

- 1 - světelný zdroj
- 2 - kondenzor (speciální kondenzor pro zástin – kardioid)
- 3 - podložní sklo
- 4 - nrenarát

# Nejjednodušší úprava zástinu



**posunutí  
kondenzoru  
do strany**



**otvor irisové  
clonky**

**terčová clonka**

**zhotovení  
terčové clonky  
na kondenzor**

■ **Předpoklady pro pozorování v temném poli:**

**silný světelný tok** (zvýšíme intenzitu světla a odstraníme šedé filtry)

**čisté médium v preparátu**

**tenká podložní skla**

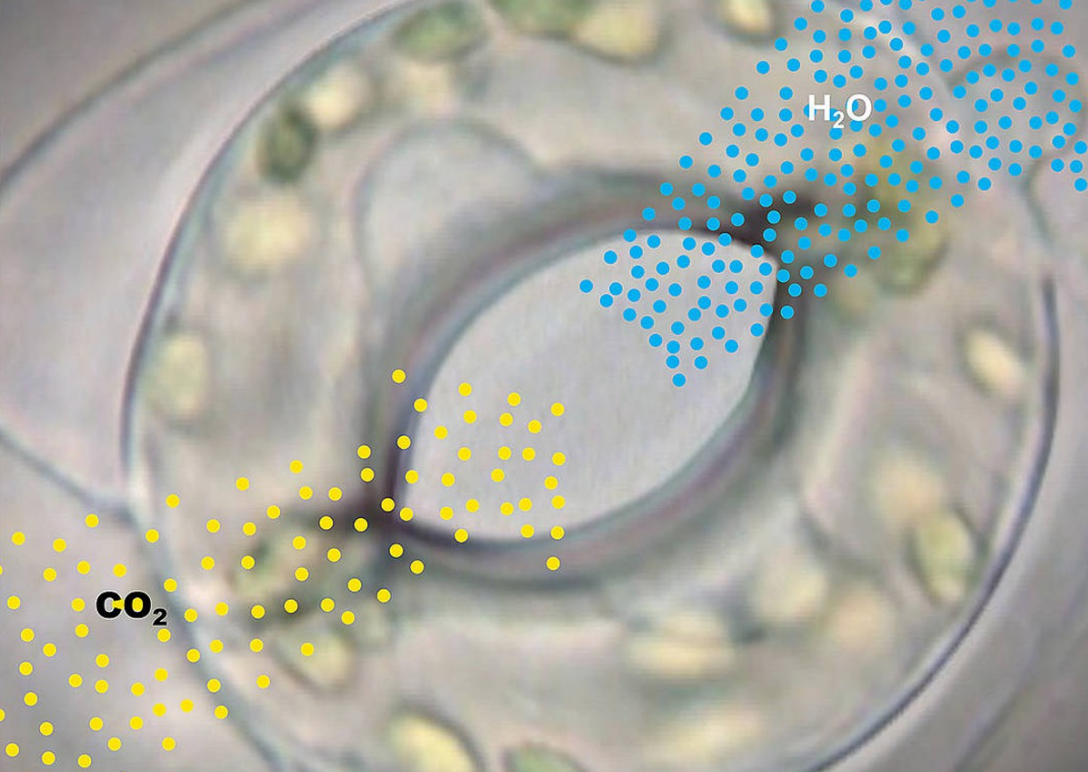
**vhodný objektiv (lépe o menší NA)**

**použití imerze na kondenzoru**

## 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





## Příprava preparátů:

### 1. Mikroreliefová metoda:

- A. otisk v laku na nehty, ve vodě
- B. otisk v laku na nehty nalepený na průhledné lepící pásce (bez vody)

Pozorování v procházejícím světle a při šikmém osvětlení

### 2. Stržená epidermis

3. Projasněný list (ethanol, SAVO, DMSO)/tenký list umožňující prosvětlení bez přípravy - okřehek

Hodnocení: srovnání metod a způsobu přípravy (náročnost, možné problémy, snadnost pozorování, výhody/nevýhody metod a různých způsobů přípravy preparátů), posouzení přínosu pozorování při šikmém osvětlení