



# Bi6589

## Laboratorní a bioinformatické metody rostlinné biosystematiky

# Mikroskopické techniky

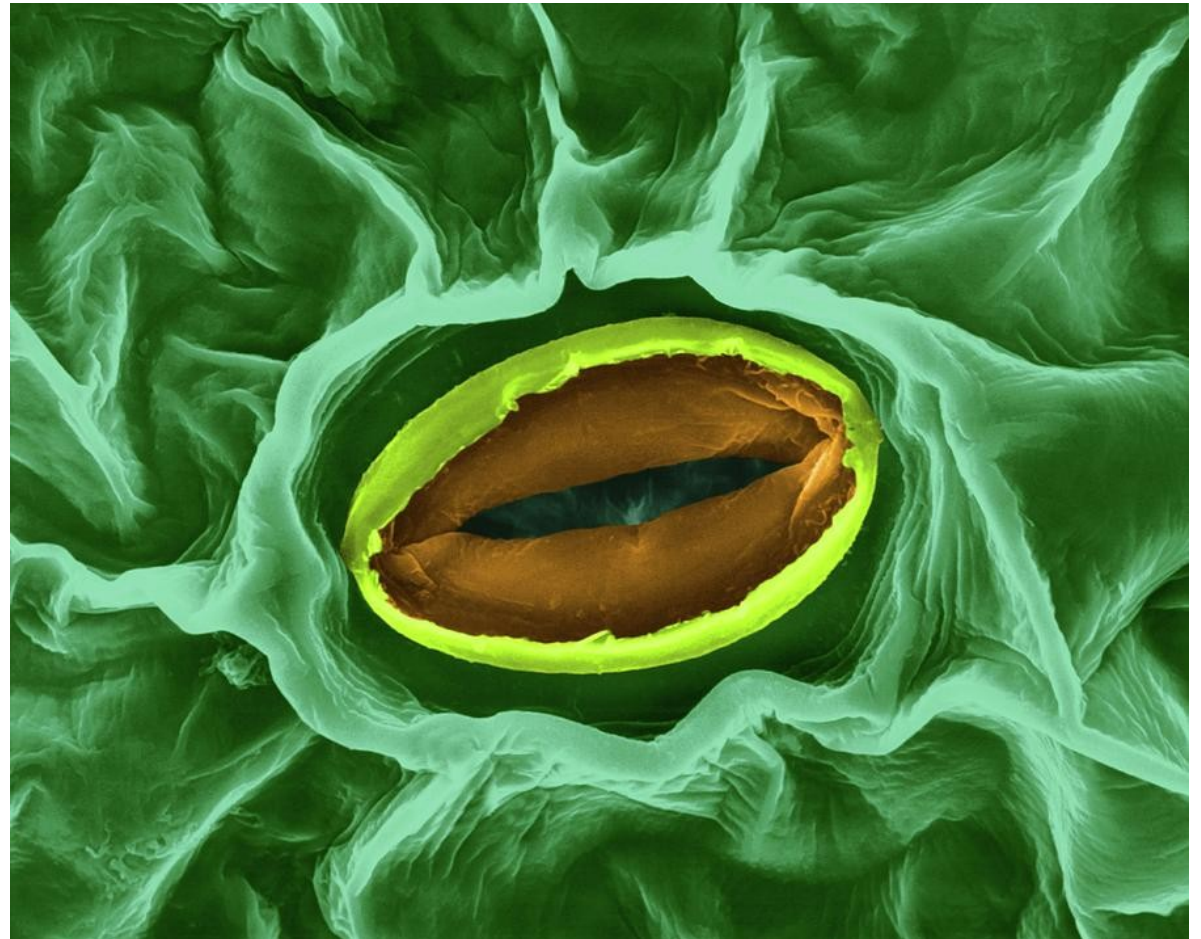
Průduchy

Pyl

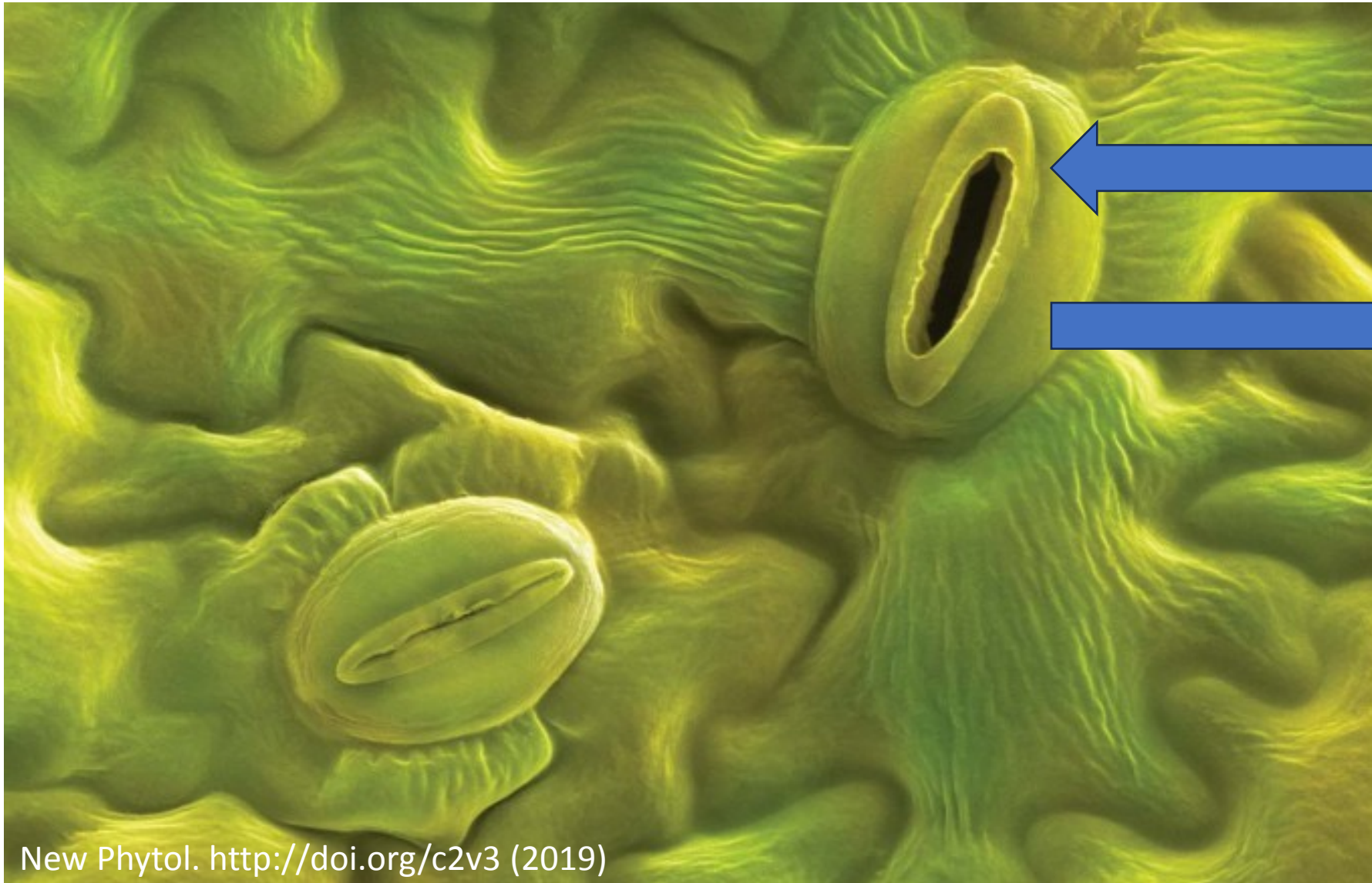
Chromozomy

# Mikroskopické techniky

Průduchy



# Funkce průduchů



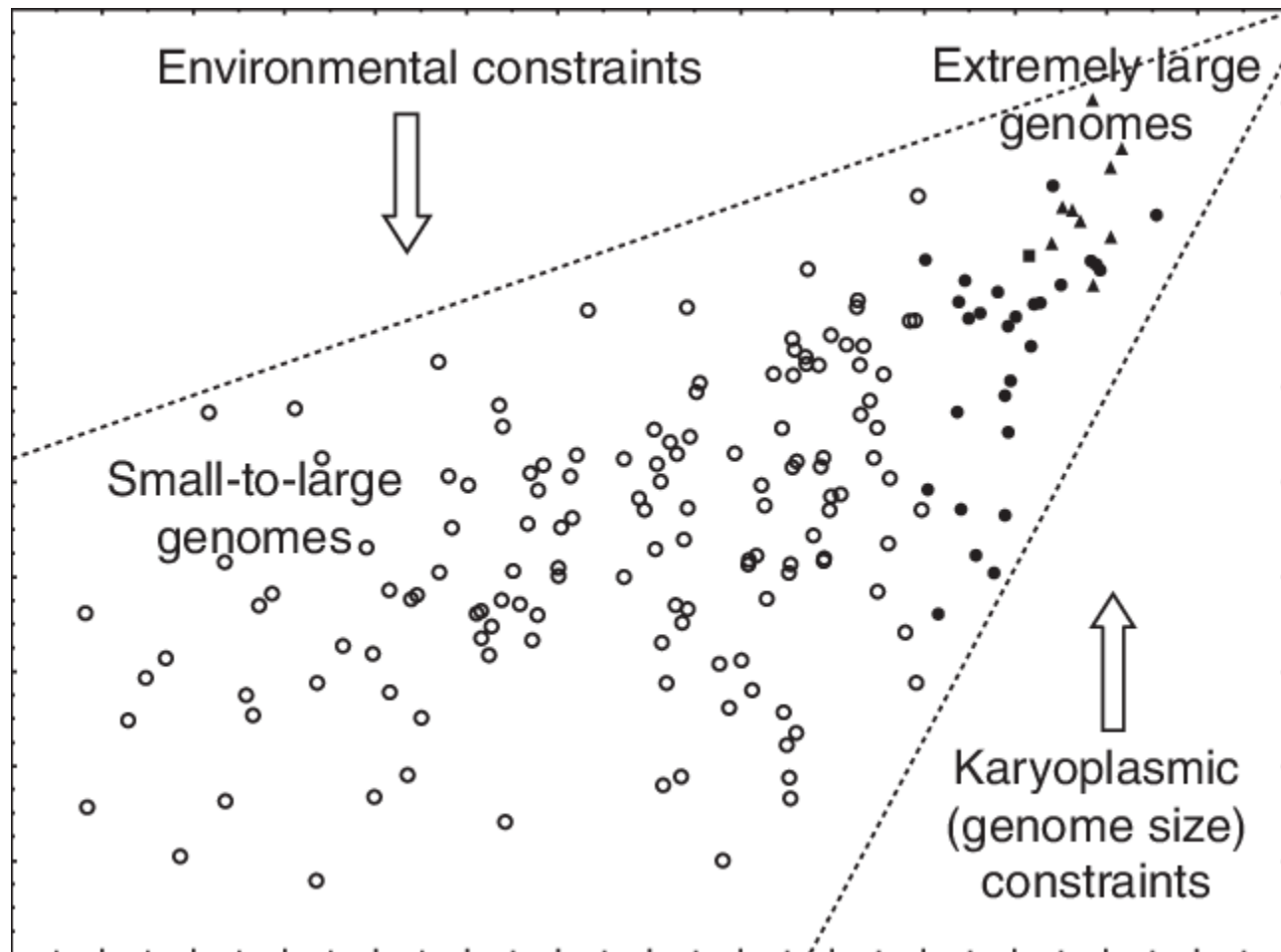
Výměna plynů  
 $O_2$  a  $CO_2$

Ztráta  $H_2O$

Při dýchání se uvolní cca 14%  $CO_2$ , který rostlina přijala při fotosyntéze

**Fotosynteticko–transpirační kompromis:** maximální přísun oxidu uhličitého při únosných ztrátách vody.

# Proč studovat průduchy?



**Závislost velikosti průduchů (délky svěracích buněk) na velikosti buněčného jádra!**

Vyplývá z „**karyoplasmatického poměru**“ = optimální poměru mezi objemem jádra ( $\approx$  obsah DNA) a cytoplazmy

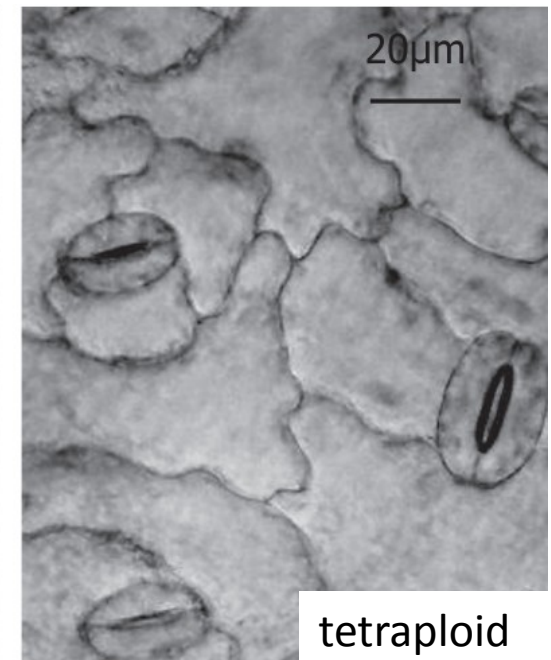
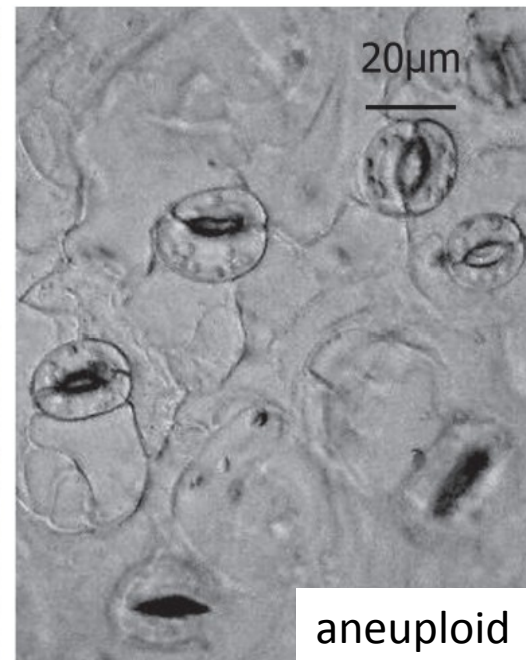
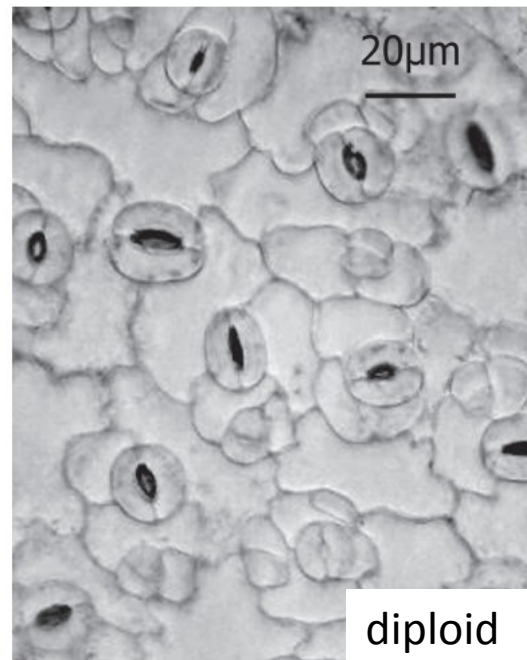
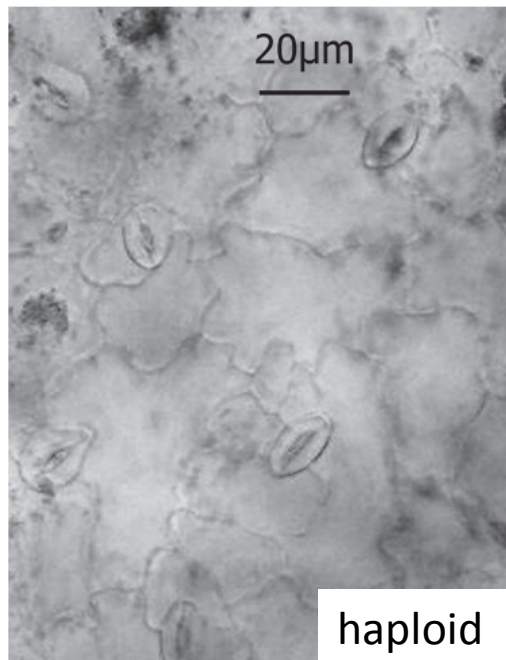
Omezená variabilita velikosti průduchu; netrpí endopolyploidii

*Velikost průduchů u rostlin s malými genomy více ovlivňují ekofyziologické a ekomorfologické omezení;*

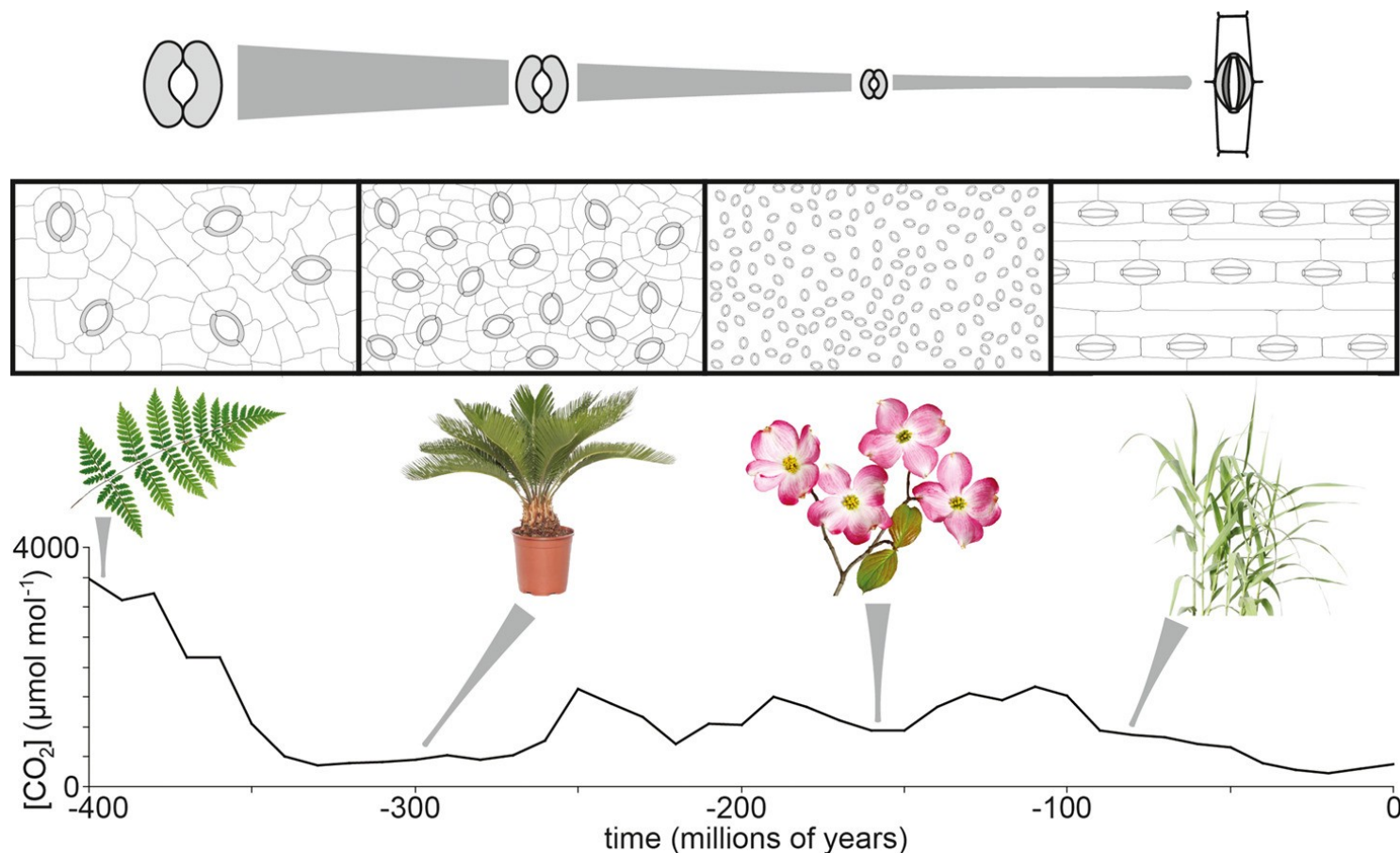
*Velikost průduchů u rostlin s velkými genomy je ovlivněna limity spojenými s fungováním buňky*

# Proč studovat průduchy?

## Vztah průduchů a ploidie



# Proč studovat průduchy?



**Velikost genomu negativně koreluje s hustotou průduchů.**

Mezi velikostí průduchů a hustotou průduchů je inverzního vztahu.

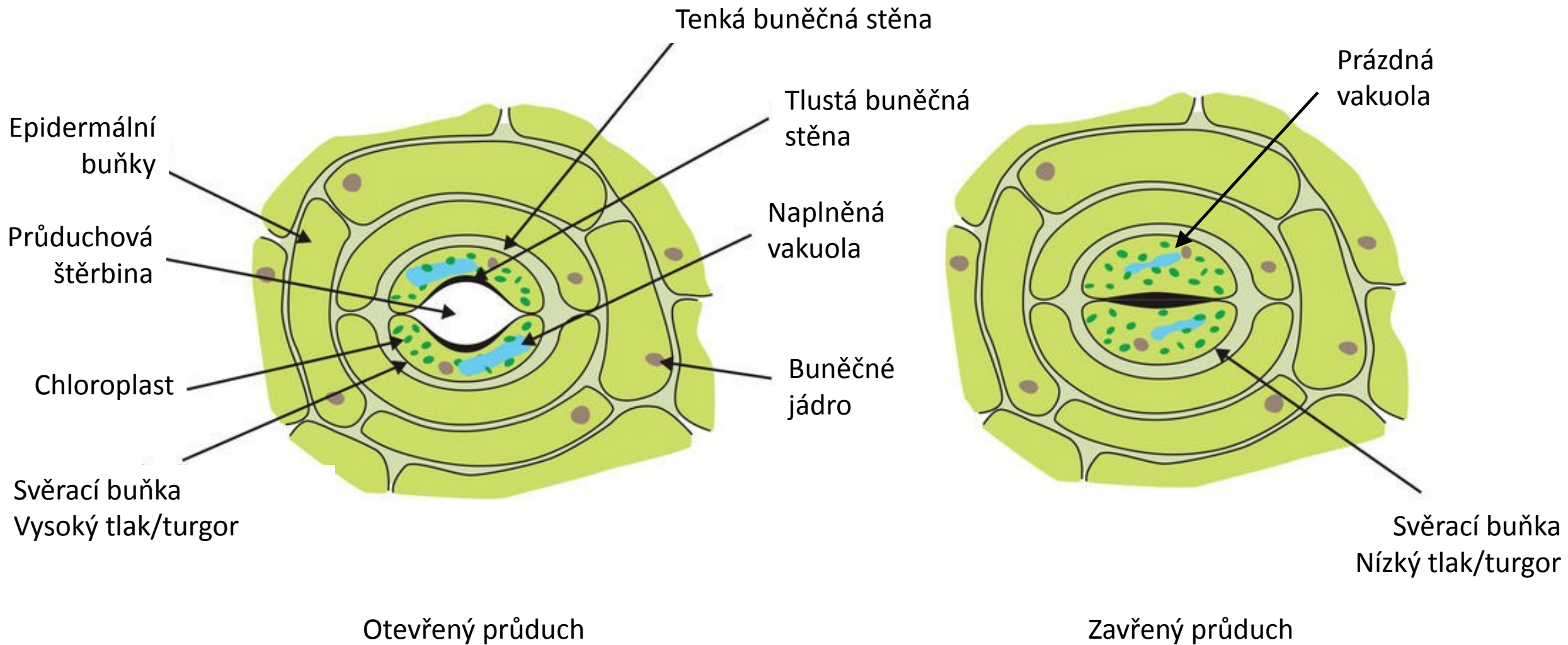
Odlíšné prostředí může generovat variabilitu v hustotě průduchů uvnitř druhu.

Pravděpodobně reakce na pokles obsahu CO<sub>2</sub> v atmosféře. Jedná se tedy snahu o snižování difúzní vzdálenosti

[Sci.Direct: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160908](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160908)

(2023)

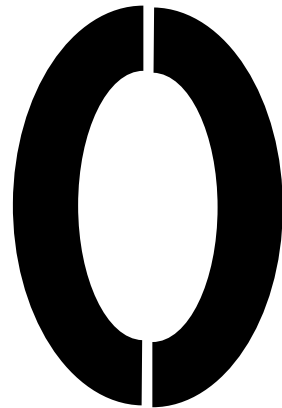
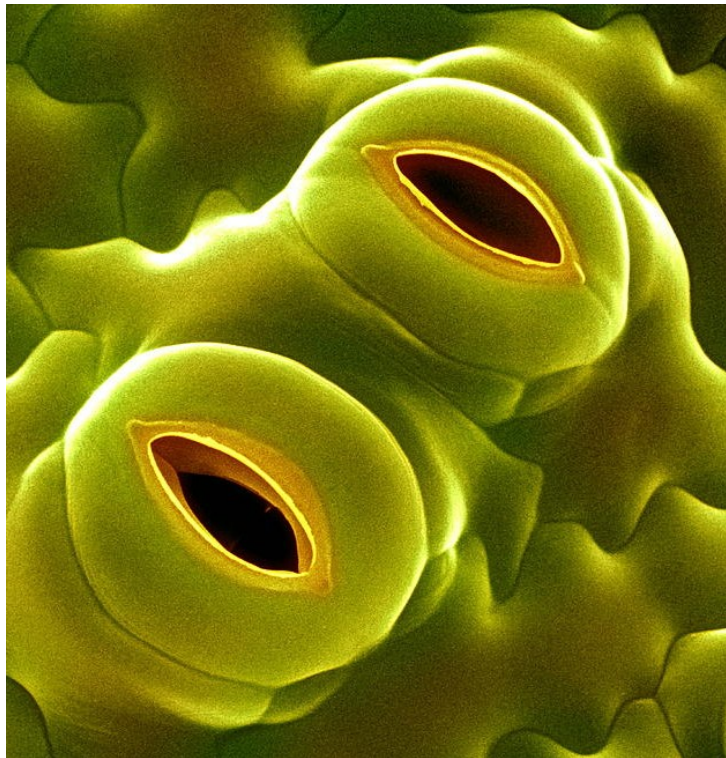
# Anatomie průduchů



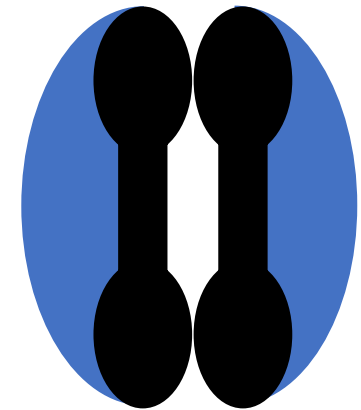


# Typy průduchů – základní dělení dle tvaru

Ledvinovitý (typ Amaryllis)



Piškotovitý (typ Gramineae)



Svěrací buňky  
obklopené vedlejšími

Další typy: Helleborus, Pteridofytní, Gymnospermní

# Průduchy – důležité informace

**Dle polohy průduchů k rovině listu** (zohlednit při přípravě preparátu)

- 1) Faneroporní – v rovině listu, nejčastější typ
- 2) Emerzní – nad úrovní listu (vyčnívají), typické pro vlhkomilné rostliny;
- 3) Submerzní (kryptoporní) – pod úrovní listu (ponořené), typické pro suchomilné rostliny (zamezuje nadměrným ztrátám vody)

**Podle umístění stomat rozlišujeme listy** (ujasnit si, co chci měřit)

- 1) hypostomatické: stomata se nacházejí v abaxiální (spodní) epidermis – nejčastější typ listu
- 2) epistomatické: stomata jsou pouze v adaxiální (horní) epidermis
- 3) amfistomatické: stomata jsou v epidermis abaxiální i adaxiální

**Klasifikace stomat podle počtu a tvaru epidermálních buněk sousedících se stomaty**

# Průduchy – důležité informace

## U některých rostlin průduchy chybí, resp. druhotně vymizely!

- Játrovky, lišejníky, šídlatky (*Isoëtes*), některé druhy hlevíků, některé druhy kapradin (např. čeleď *Salviniaceae*);
- u mechorostů jsou obvykle průduchy přítomné na sporofytu (tzn. na tobolce), výjimečně i na gametofytu;
- chybí u nezelených/parazitických druhů krytosemenných rostlin, jako je hlístník hnízdák (*Neottia nidus-avis*) či hnilák (*Monotropa*);
- až na výjimky je nemají vodních rostlin (vyjma např. leknín, *Nymphaea*).

**Průduchy nejsou jen na listech! Lze je nalézt na květech, listenech, úponcích, kořenech hlízách atd.**

# Měření průduchů

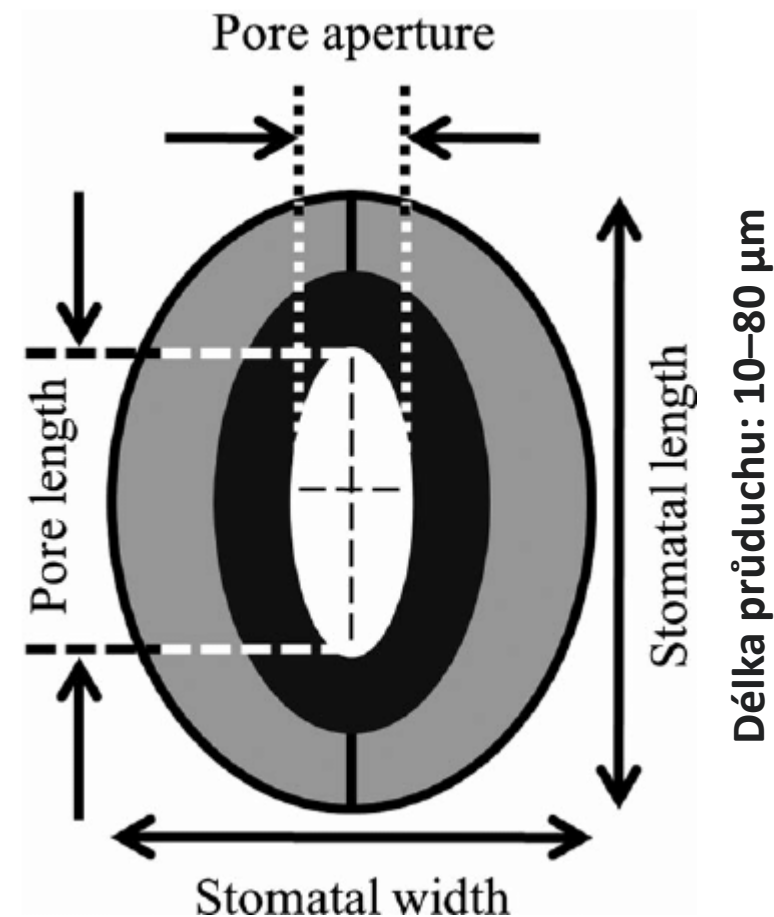
## Bělení listu v SAVU

- 1) Hydratace suchého materiálu
- 2) Vybělení v SAVU
- 3) Přenesení pletiva na podložní sklíčko

## Mikroreliefní metoda (otisky průduchů)

- 1) Zpřístupnění průduchů (oholení apod.)
- 2) Nalakování pokožky listu
- 3) Přelepení průhlednou lepicí páskou
- 4) Stržení lepicí pásky
- 5) Nalepení lepicí pásky s otisky průduchů na podložní sklíčko

Průměrná velikost průduchové štěrbiny: 17,7 x 6,7  $\mu\text{m}$



Délka průduchu: 10–80  $\mu\text{m}$

Průměrný počet průduchů na  $\text{mm}^2$ : 50-484 ks

# Mikroskopické techniky



Pyl

**Palynologie = nauka o pylu, sporách a cystách.**

# Morfologie pylových zrn

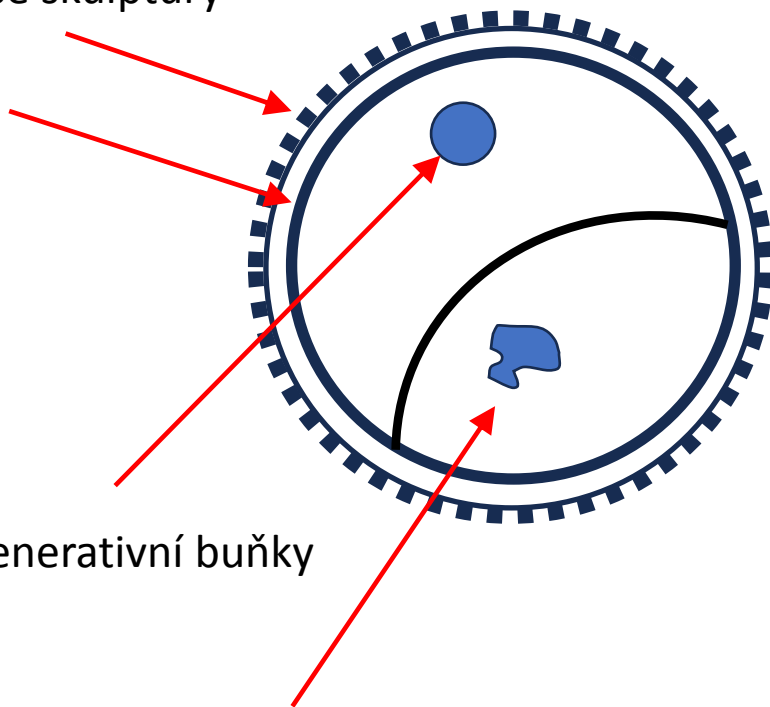
## Stěna pylového zrna (sporoderma)

Exina se skulptury

Intina

Jádro generativní buňky

Jádro vegetativní buňky



**TVAR:** Kulovitý; elipsoidní; nitkovitý (vodní rostliny)

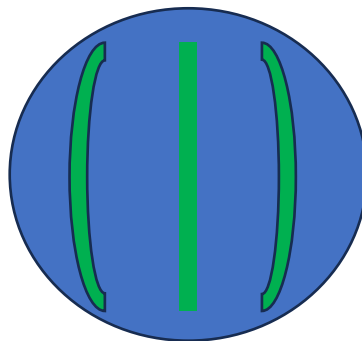
**APERTURY (tremy, otvory)** - ztenčiny v exině jimiž klíčí pylová láčka

Rozlišují se dle:

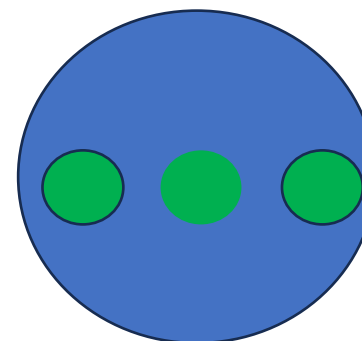
**POČTU:** mono - polyaperturátní

**POLOHY (umístění):** zonoapertury (v určité rovině) – pantoapertury (po celém povrchu)

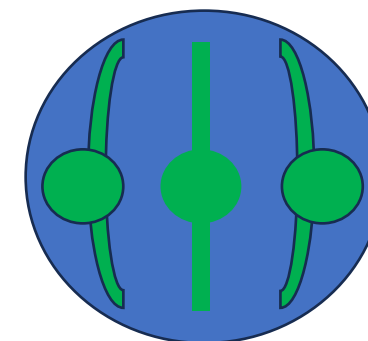
**TYPY:**



kolpátní



porátní



kolporátní

**SKULPTURY POVRCHU:** psilátní, skabrátní, verukátní atd.

# Morfologie pylových zrn

**TVAR:** Kulovitý; elipsoidní; nitkovitý (vodní rostliny)

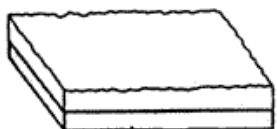
**APERTURY (tremy, otvory)** - ztenčeniny v exině jimiž klíčí pylová láčka

Rozlišují se dle:

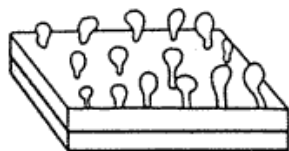
**POČTU:** mono - polyaperturátní

**POLOHY (umístění):** zonoapertury (v určité rovině) – pantoapertury (po celém povrchu)

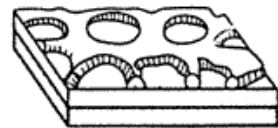
**TYPY:** kolpátní, porátní, kolporátní



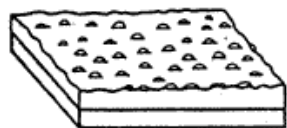
psilate



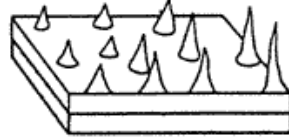
clavate



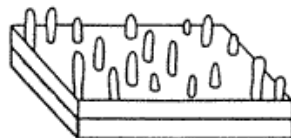
reticulate



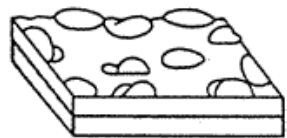
scabrate



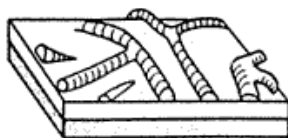
echinate



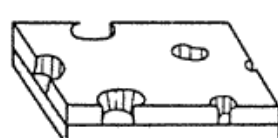
baculate



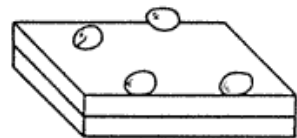
verrucate



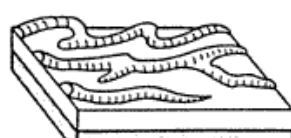
rugulate



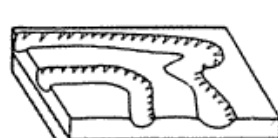
foveolate



gemmate



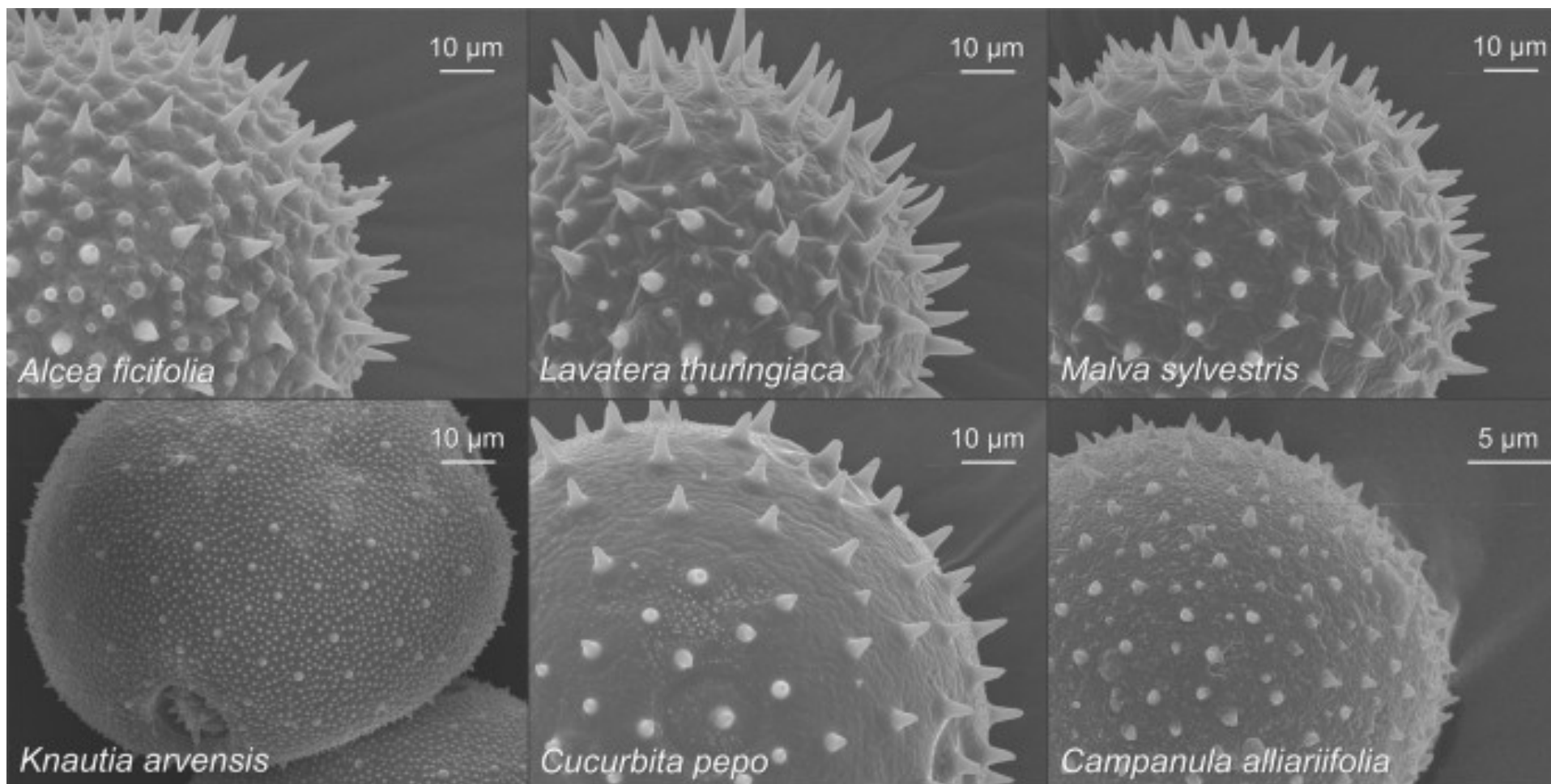
striate



frustillate

**SKULPTURY POVRCHU:** psilátní, skabrátní, verukátní atd.

# Morfologie pylových zrn

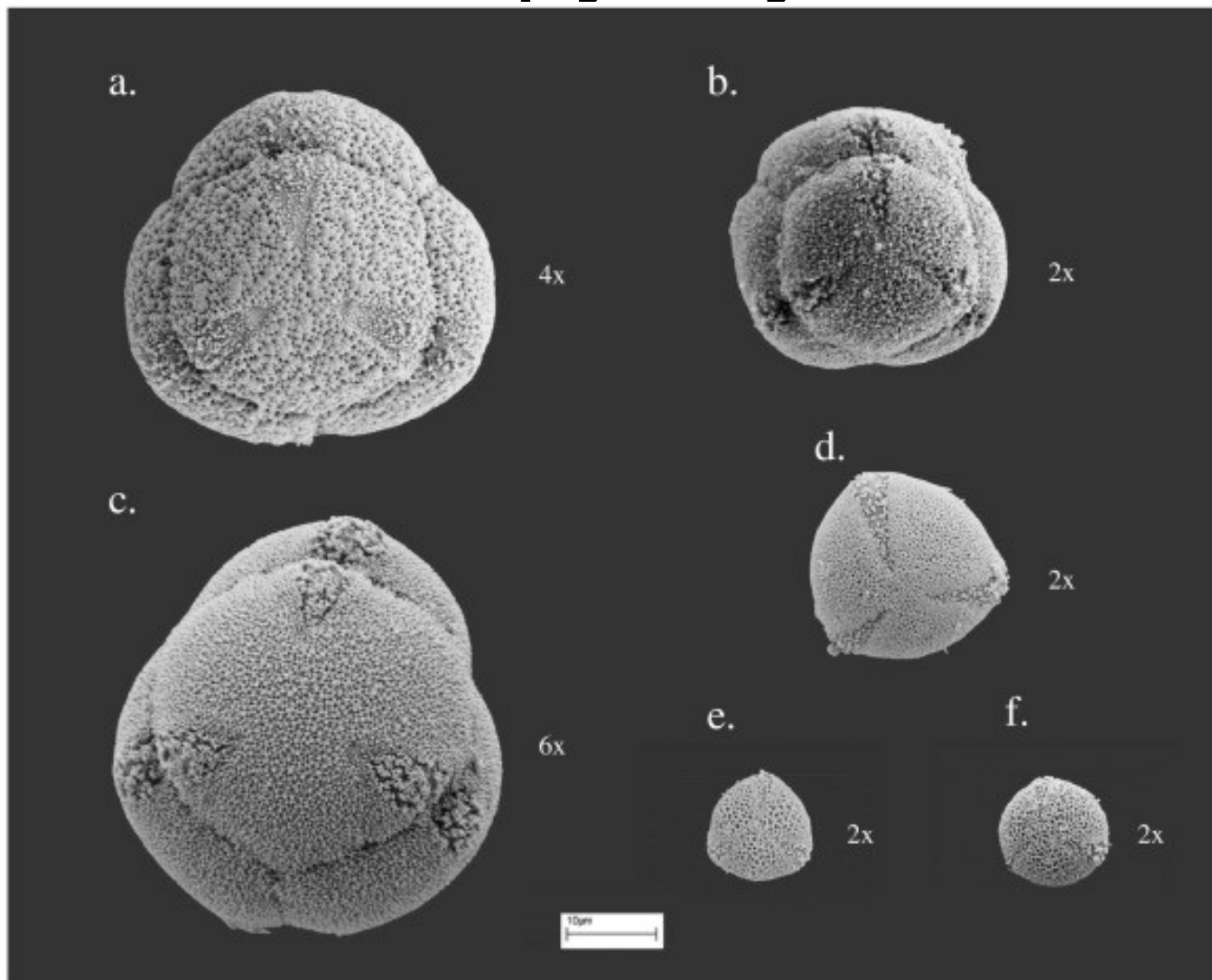


U entomogamních rostlin charakteristický tvar a výrazné povrchové útvary (skulptury), které by měli umožnit efektivní přenos pylu, ale současně zabránit sběru pylu opylovačům (tzv. „pylové dilema“ mezi rostlinou a opylovači).

U anemogamních rostlin obvykle povrch pylových zrn hladký, nelepivý a velmi často opatřený vzdušnými vaky.



# Velikost pylových zrn



**Velikost pylových zrn:** 5 - 250 µm (pomněnka/tykev)

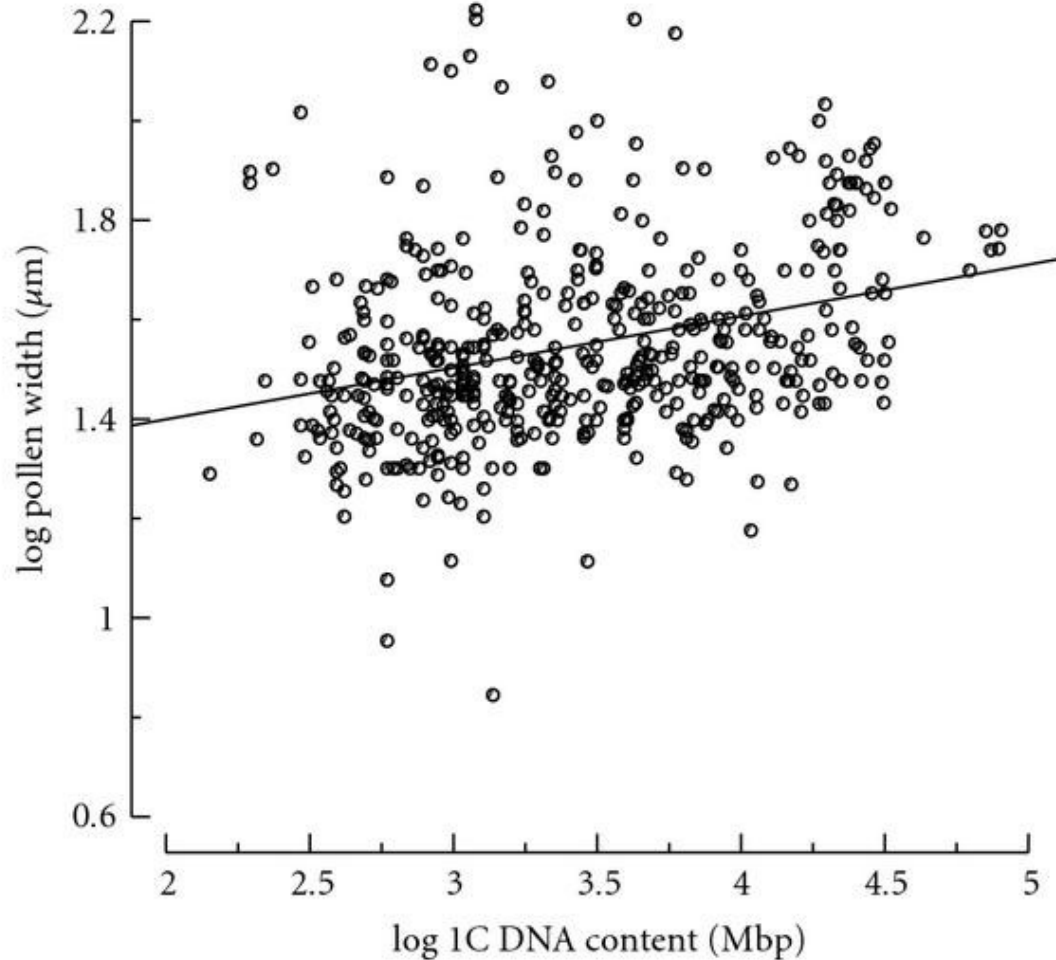
Udává se, že **velikost pylových zrn** koreluje se stupněm **ploidie**.

**Neplatí obecně**, některé práce to vyvracejí a jako možné **důvody** udávají:

- 1) vyšší ploidie menší pylová zrna, která by se mohla snáze zapojit do reprodukce;
- 2) pylová zrna polyploidů mohou být pod selektivním tlakem, aby byla kompatibilní s velikostí blizny jejich rodičovských rostlin;
- 3) velikost pylu nekoreluje s ploidií, ale s C-value hodnotou

Velikost pylových zrn různých druhů rodu *Streptocarpus* (v 2x charakteristická velikost pro jednotlivé sekce)

# Velikost pylových zrn



Velikost pylových zrn: 5 - 250 μm (pomněnka/tykev)

Udává se, že velikost pylových zrn koreluje se stupněm ploidie.

Neplatí obecně, některé práce to vyvracejí a jako možné důvody udávají:

- 1) vyšší ploidie menší pylová zrna, která by se mohla snáze zapojit do reprodukce;
- 2) pylová zrna polyploidů mohou být pod selektivním tlakem, aby byla kompatibilní s velikostí blizny jejich rodičovských rostlin;
- 3) **velikost pylu nekoreluje s ploidii, ale s C-value hodnotou**

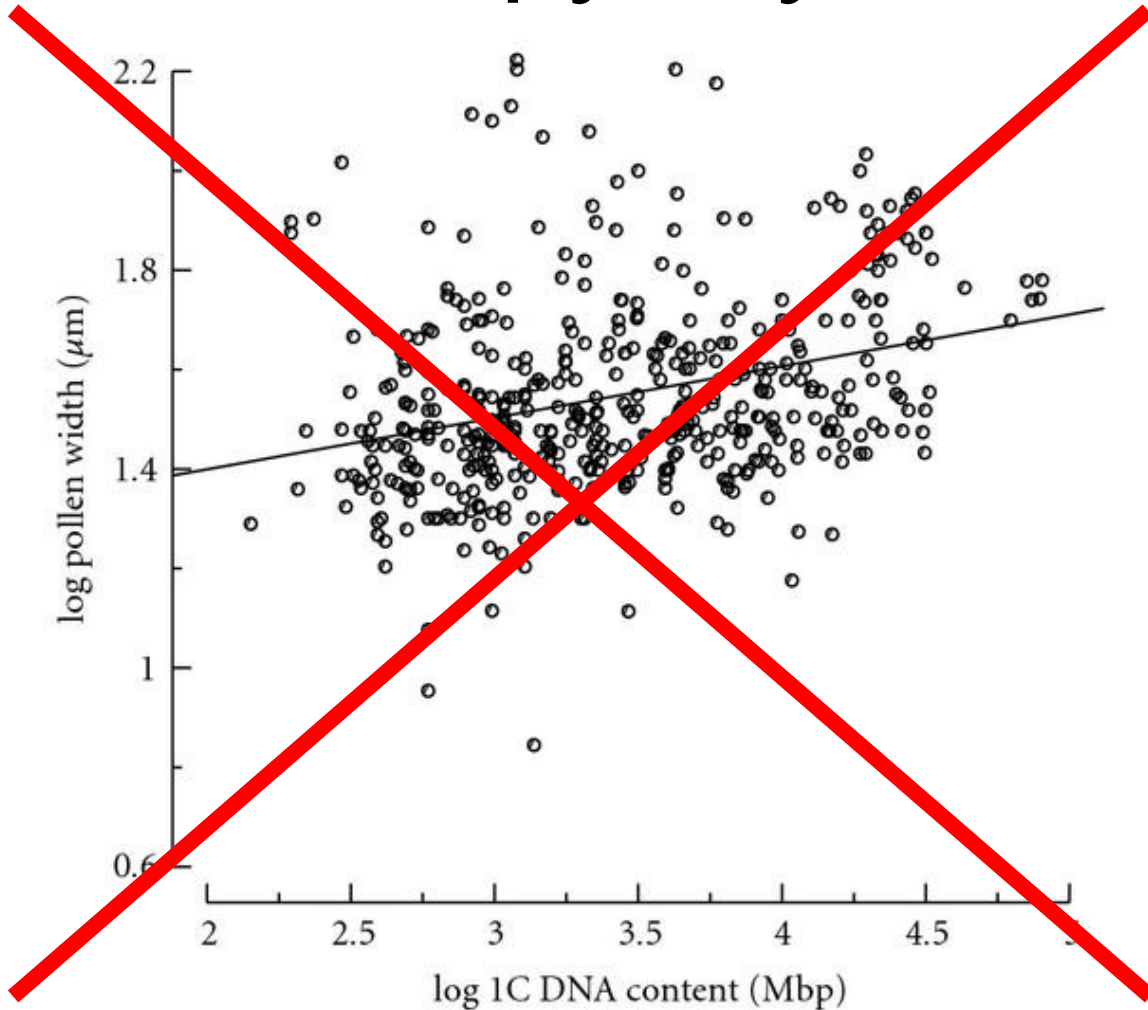
# Velikost pylových zrn

Velikost pylových zrn: 5 - 250  $\mu\text{m}$  (pomněnka/tykev)

Udává se, že velikost pylových zrn koreluje se stupněm ploidie.

Neplatí obecně, některé práce to vyvracejí a jako možné důvody udávají:

- 1) vyšší ploidie menší pylová zrna, která by se mohla snáze zapojit do reprodukce;
- 2) pylová zrna polyploidů mohou být pod selektivním tlakem, aby byla kompatibilní s velikostí blizny jejich rodičovských rostlin;
- 3) **velikost pylu nekoreluje s ploidii, ale s C-value hodnotou**



Regresní analýza využívající fylogeneticky nezávislých kontrastů nepodpořila tento korelovaný vztah

# Pylová viabilita

**Při mezidruhové hybridizaci vznikají jedinci, kteří mají sníženou viabilitu pylu.**

**Pylovou viabilitu lze testovat:**

**1) klíčení pylu a růstu pylové láčky** (klíčení pylových zrn na živném médiu): *in vitro*, *in vivo*

**2) Barvení pylu:** má za cíl vizualizovat specifické sloučeniny, obsahy nebo buněčné kompartmenty související s životaschopností pylu (acetokarmín, tetrazolium, fluorescein diacetátem (FDA), apod.)

**Alexandrovo barvení:** barví cytoplazmu červeně, zatímco buněčné stěny jsou zbarveny zeleně. Červená barva signalizuje životaschopné pylové zrno; zelená barva indikuje abortované pylové zrno (chybí cytoplazma a proto je viditelná zelená buněčná stěna)

**3) Průtoková cytometrie:** např.: impedanční průtoková cytometrie, která měří elektrické vlastnosti jednotlivých buněk

**4) Analýza finálního souboru semen po opylení**

# Alexandrovo barvení - protokol

## Postup

- 1) Nakapat několik kapek Alexanderovy barvicí směsi na podložní sklo.
- 2) Do kapky barviva vypreparovat pylová zrna a překrýt krycím sklem.
- 3) Zarámovat sklo bezbarvým lakem.
- 4) Po několika minutách vyhodnotit zbarvení pylových zrn

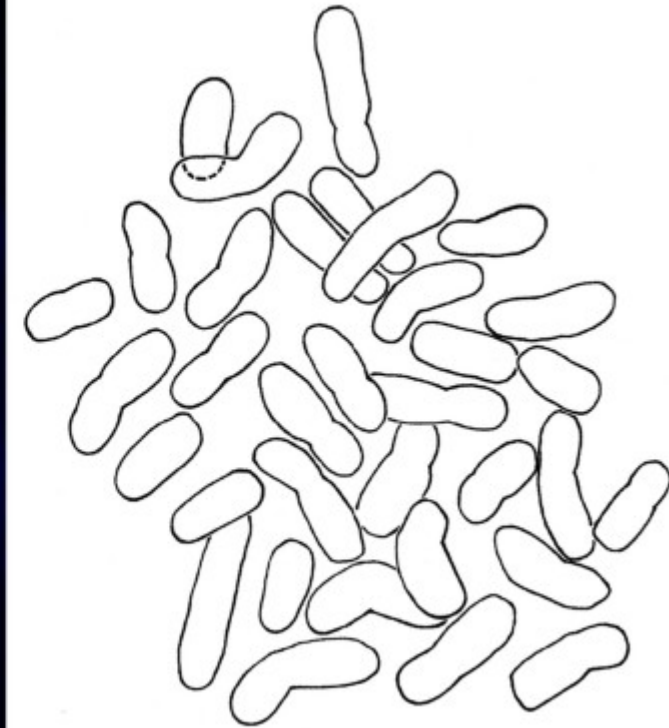
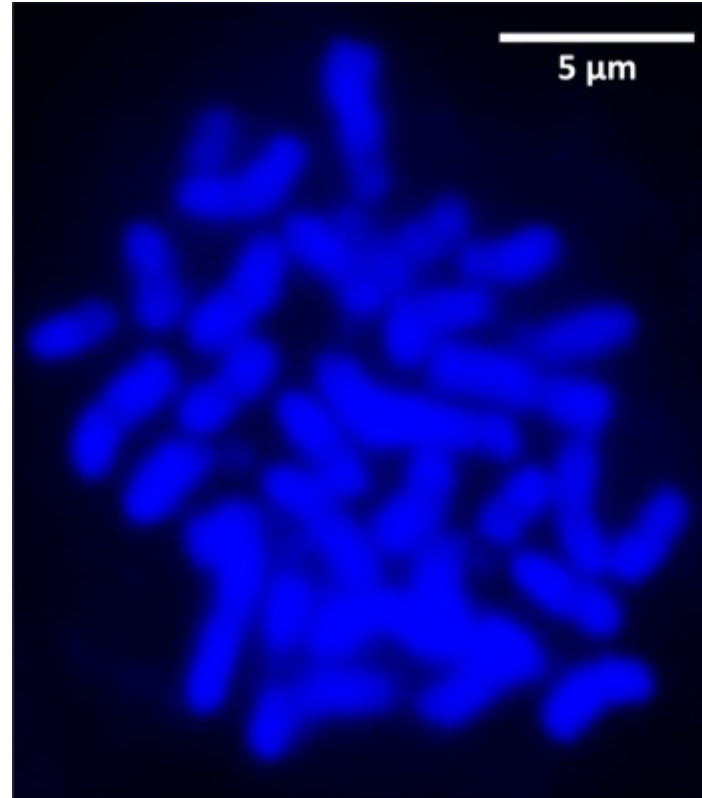
## Složení Alexandrova barviva (Alexander 1969)

Na 100ml roztoku:

- 10 ml 95% ethanol
- 10 mg malachitové zeleně
- 50 ml destilované vody
- 25 ml glycerol
- 5 g fenolu
- 5 g chloral hydrátu
- 50 mg kyselého fuchsinu
- 0,5 ml 1% oranže G v destilované vodě
- 1-4 ml ledové kyseliny octové

# Mikroskopické techniky

## Chromozomy



Karyologie = nauka o struktuře a funkci buněčného jádra

# Změny ve velikosti buněčného jádra

**Rozdíly mezi druhy vs. rozdíly uvnitř druhu**

**Variabilitu ve velikosti genomu způsobují změny:**

- 1) Počtu chromozomů – polyploidie, aneuploidie.
- 2) Ve velikosti chromozomů (repetice, transpozony, vystřihování DNA, atd.)
- 3) B chromozomy
- 4) Pohlavní chromozomy

**Procesy beze změn velikosti genomu**

- 1) rozpady a fúze chromozomů (především u taxonů s holocentrickými chromozomy)

# Změny ve velikosti buněčného jádra

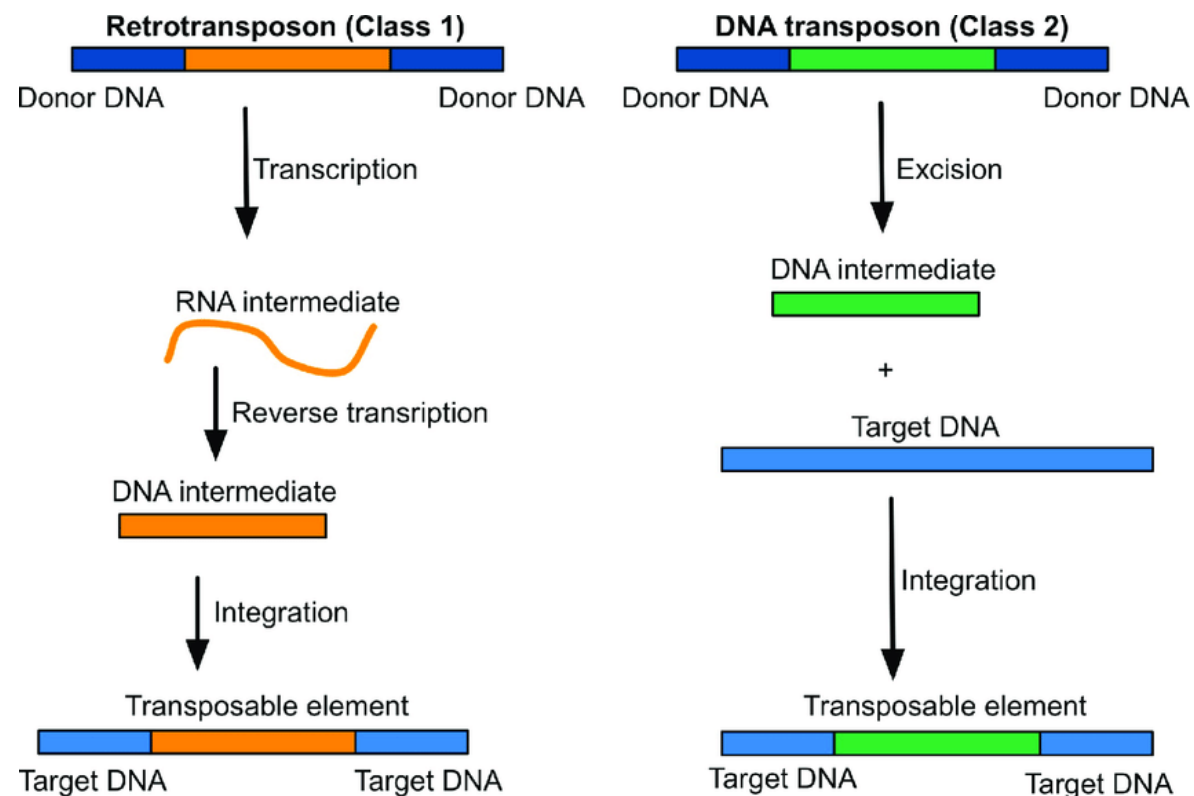
Rozdíly mezi druhy vs. rozdíly uvnitř druhu

Variabilitu ve velikosti genomu způsobují změny:

- 1) Počtu chromozomů – polyploidie, aneuploidie.
- 2) **Ve velikosti chromozomů (repetice, transpozony, vystřihování DNA, atd.)**
- 3) B chromozomy
- 4) Pohlavní chromozomy

Procesy beze změn velikosti genomu

- 1) rozpady a fúze chromozomů (především u taxonů s holocentrickými chromozomy)





# Změny ve velikosti buněčného jádra

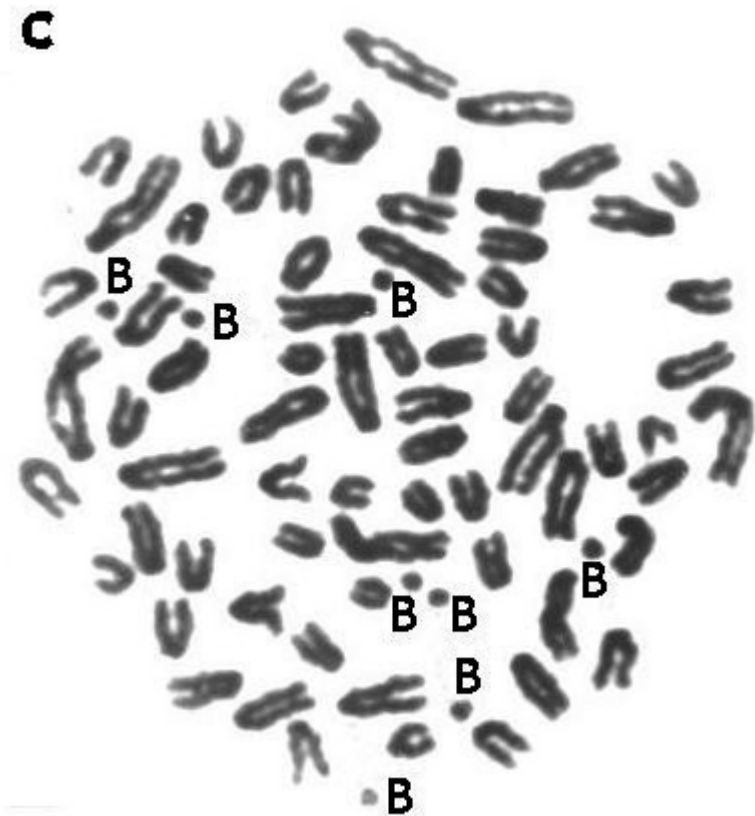
## Rozdíly mezi druhy vs. rozdíly uvnitř druhu

### Variabilitu ve velikosti genomu způsobují změny:

- 1) Počtu chromozomů – polyploidie, aneuploidie.
- 2) Ve velikosti chromozomů (repetice, transpozony, vystřihování DNA, atd.)
- 3) **B chromozomy**
- 4) Pohlavní chromozomy

### Procesy bez změny velikosti genomu

- 1) rozpady a fúze chromozomů (především u taxonů s holocentrickými chromozomy)



# Změny ve velikosti buněčného jádra

## Rozdíly mezi druhy vs. rozdíly uvnitř druhu

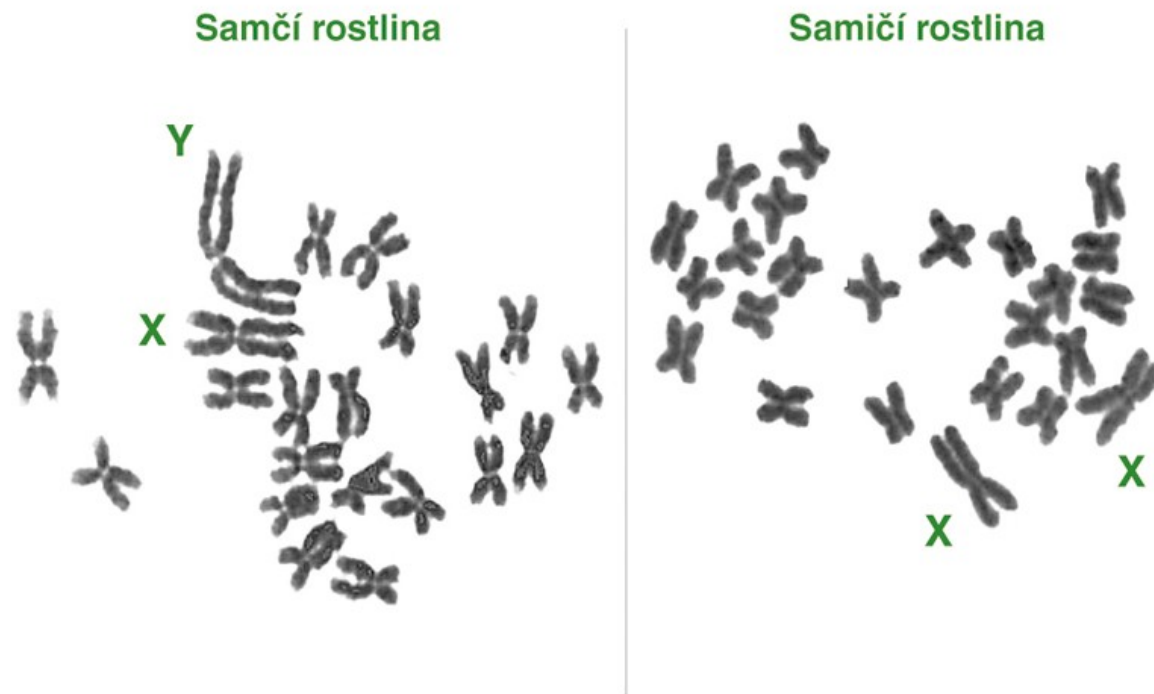
### Variabilitu ve velikosti genomu způsobují změny:

- 1) Počtu chromozomů – polyploidie, aneuploidie.
- 2) Ve velikosti chromozomů (repetice, transpozony, vystřihování DNA, atd.)
- 3) B chromozomy
- 4) **Pohlavní chromozomy**

### Procesy bez změny velikosti genomu

- 1) rozpady a fúze chromozomů (především u taxonů s holocentrickými chromozomy)

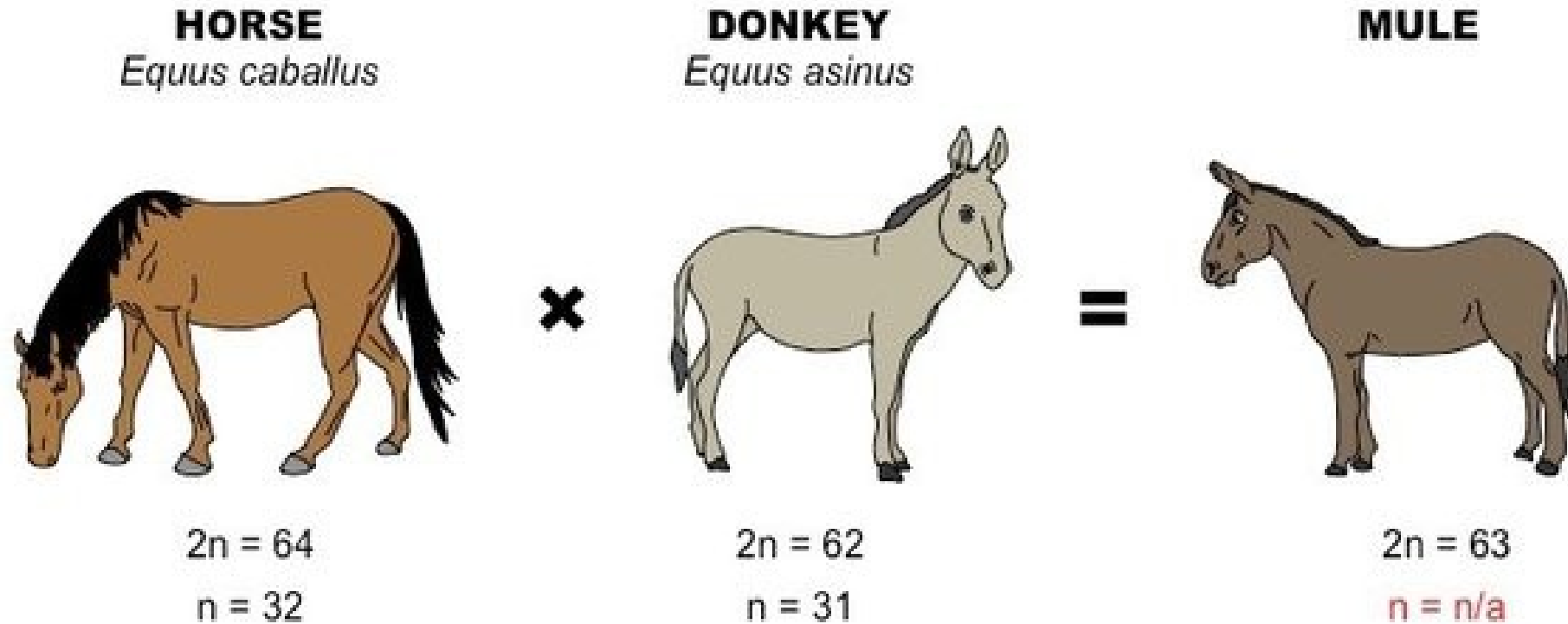
Silenka široolistá (*Silene latifolia*)



Hobza (2017): Živa.

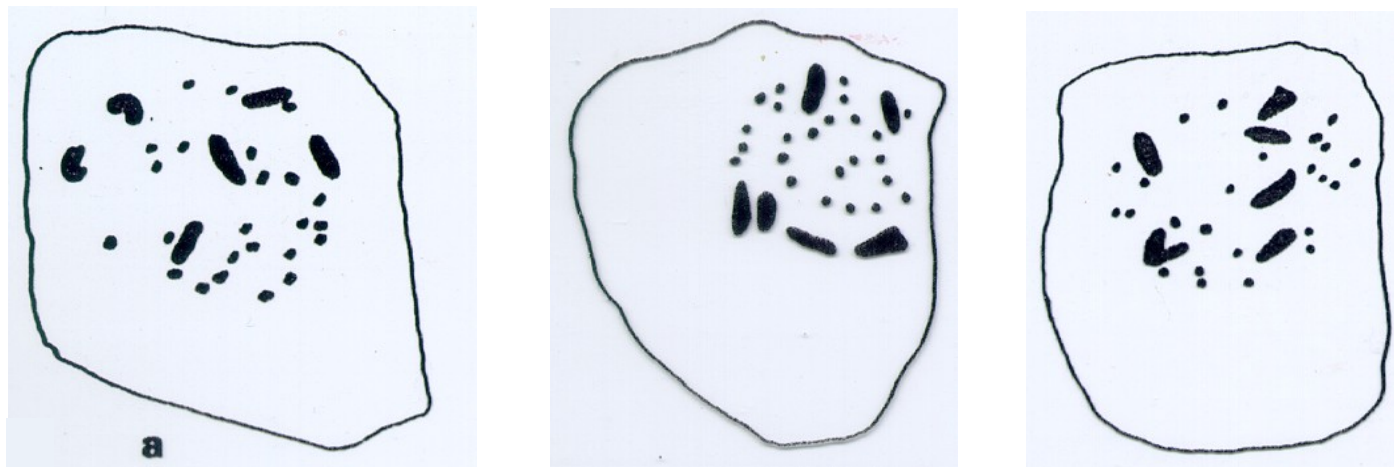
# Využití k řešení našeho problému

## Počty chromozomů



# Využití k řešení našeho problému

## Velikost chromozomů



Karyotyp *L. xheddae*: 6 AL + 24 CL

*Luzula campestris*  
subsp. *campestris*

$2n = 12$ , large

x

*Luzula sudetica*

$2n = 48$ , small



*Luzula xheddae*

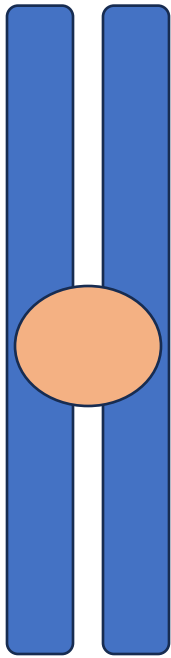
$2n = 30 = 6l + 24s$

# Využití k řešení našeho problému

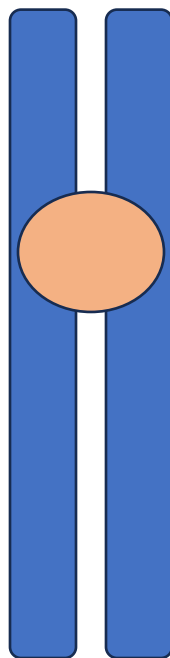
## Typy chromozomů dle centromery

MONOCENTRICKÉ

HOLOCENTRICKÉ



metacentrický



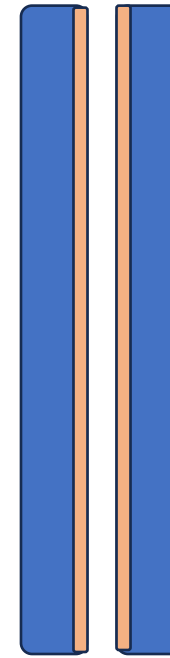
submetacentrický



akrocentrický

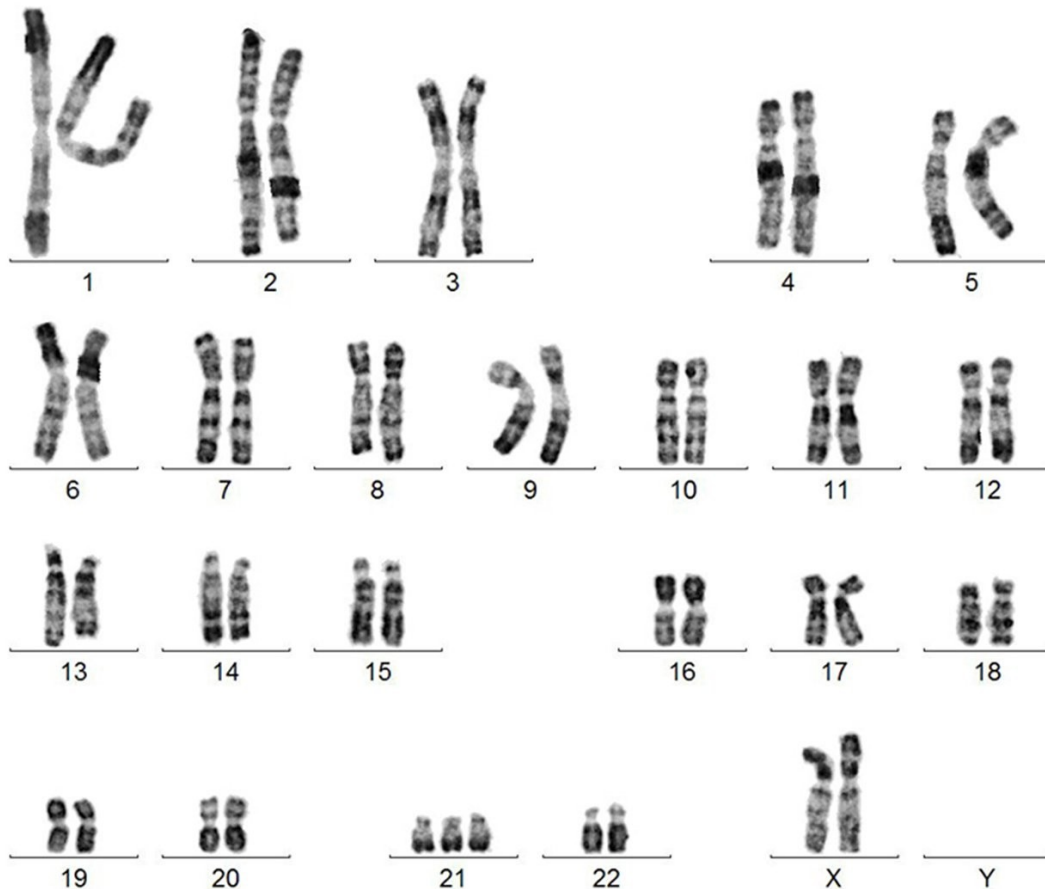


telomerický



# Využití k řešení našeho problému

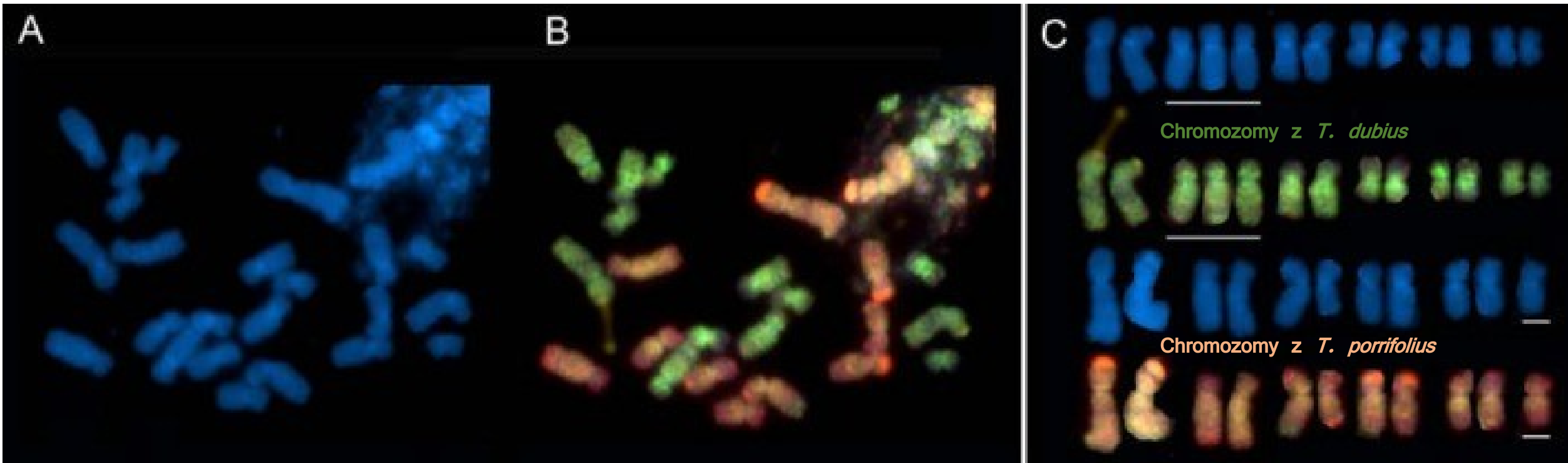
## Barvení chromozomů: G-banding (dle



Zvýrazňují se  
oblasti bohaté na  
adenin s  
thyminem

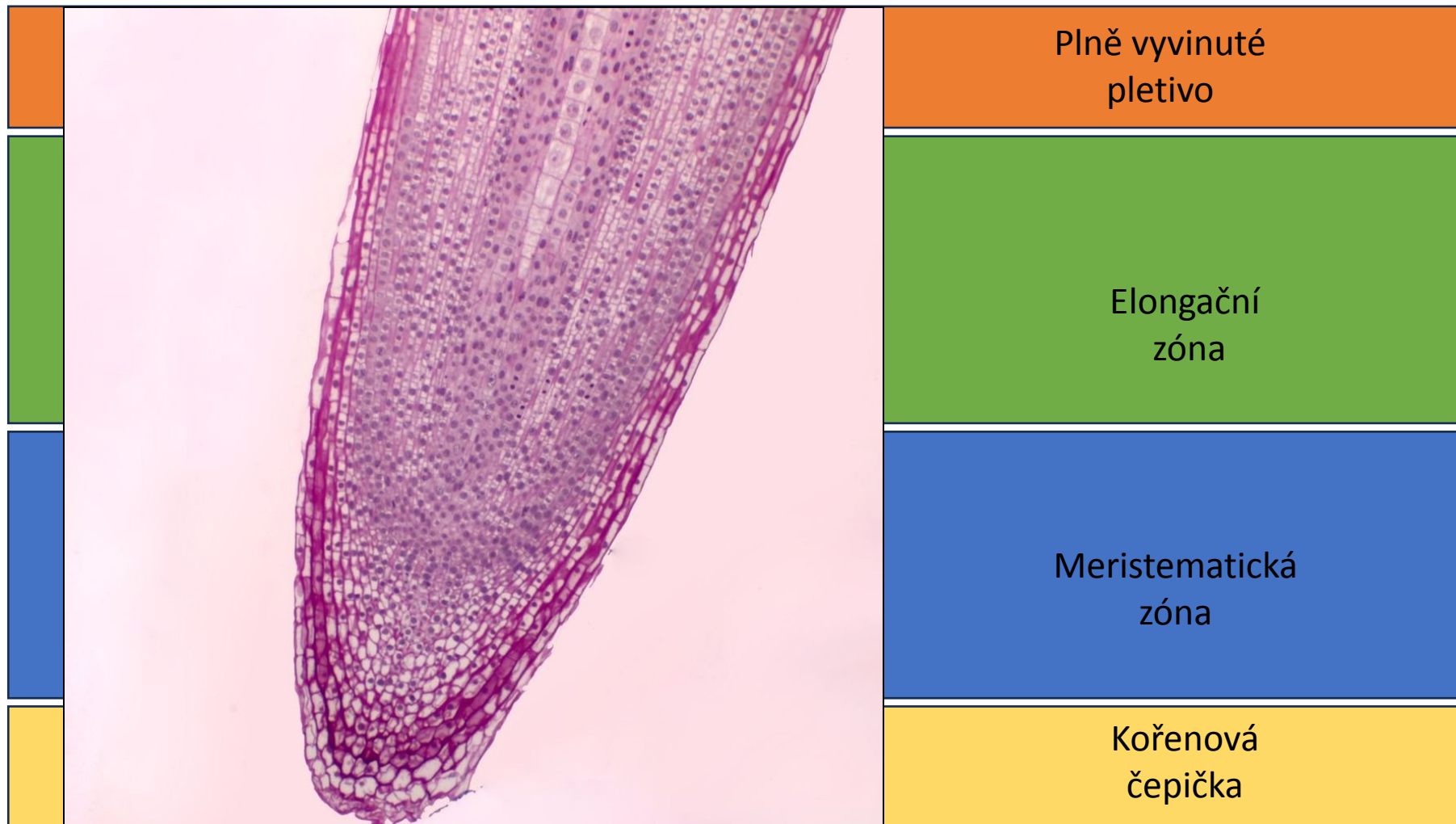
# Využití k řešení našeho problému

Barvení chromozomů – GISH (Genomic in situ hybridization)



Chromozomy *Tragopogon mirus*  $2n = 4x = 24 -1 +1$

# Anatomie kořene



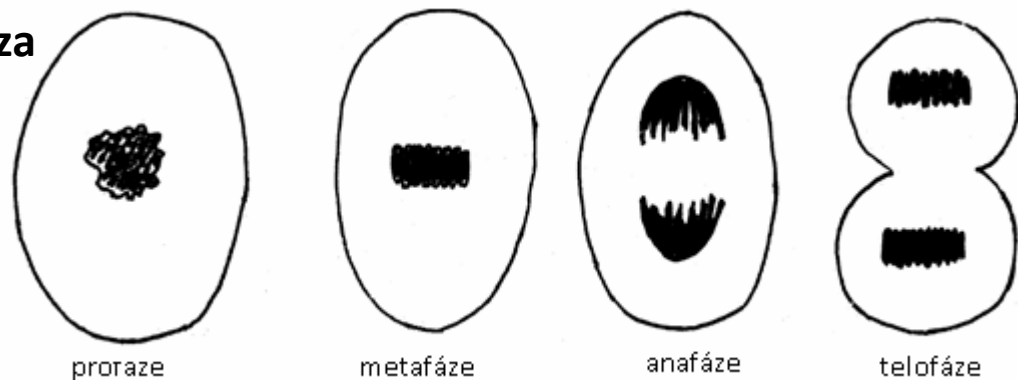


# Synchronizace buněčného cyklu

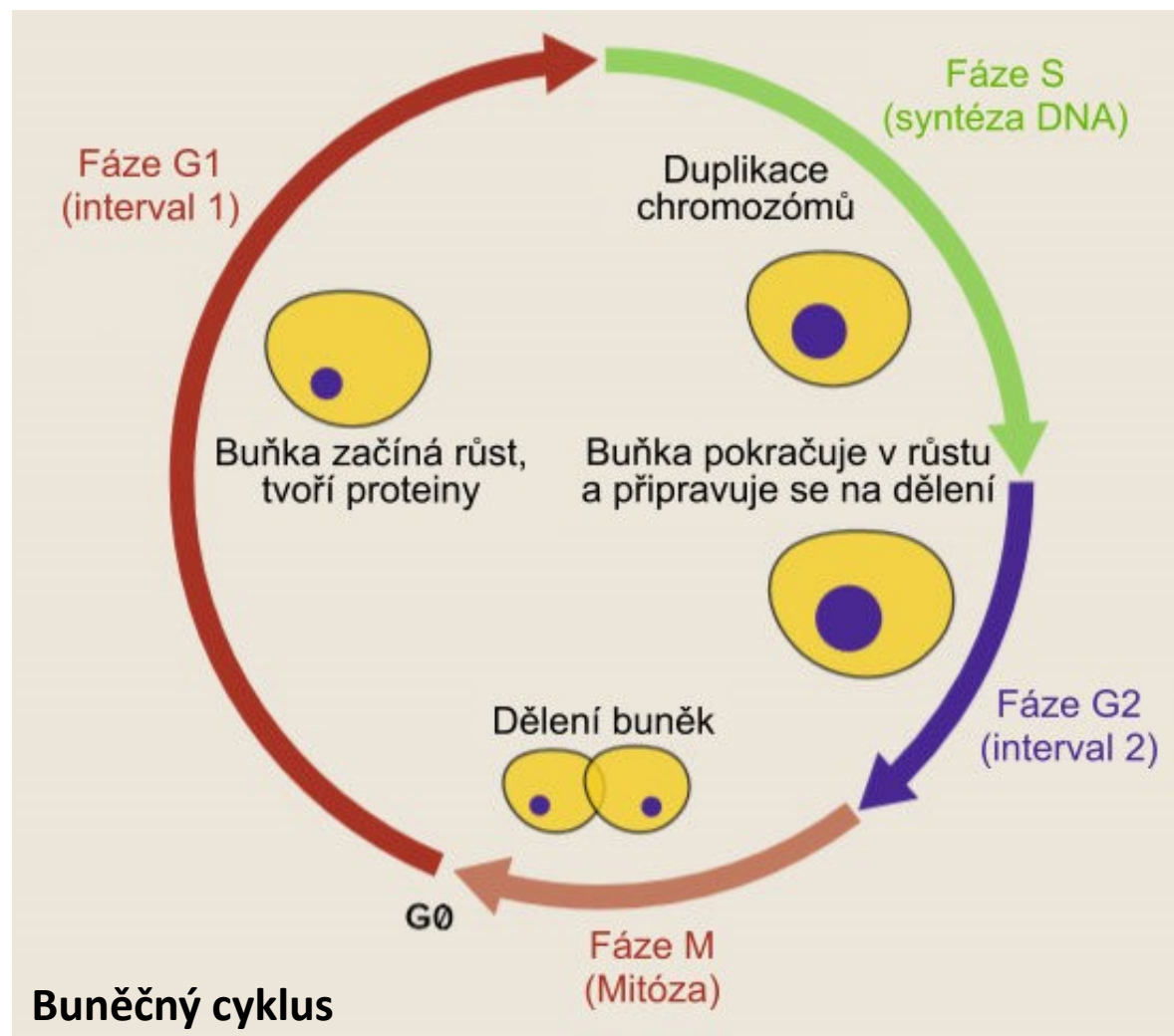
Meristematické buňky jsou vystaveny podmínkám, které jim zabrání v plynulém průchodu buněčným cyklem. Dojde tak k nahromadění buněk v určité fázi buněčného cyklu.

Cytostatika: ledová voda, kolchicin, hydroxymočovina, atd.

## Mitóza



**MITOTICKÝ INDEX:** podíl počtu buněk ve stádiu mitózy k celkovému počtu buněk.



# Rychlá roztlaková metoda

## FIXACE

- 1) Vložit kořenové špičky do fixační směsi (96% etanol : ledová kyselina octová, poměr 3:1); nechat působit ON při 6°C.
- 2) Přendat koř. špičky do 70% etanolu (dlouhodobé skladování).

## MACERACE

- 1) Přenést koř. špičky do maceračního roztoku (96% alkoholu: koncentrované HCl, poměr 1:1); inkubovat 1-2 minuty při RT.
- 2) Vyprat koř. špičky v destilované vodě; 1-2 minuty.
- 3) Přemístit koř. špičku na podložní sklíčko do kapky vody.
- 4) Odříznout část koř. špičky s dělivými meristémy, zbytek kořene odstranit.

## BARVENÍ

- 1) Odsát přebytek vody z krycího skla a přidat kapku barviva (laktopropionorcein)
- 2) Překrýt koř. špičku krycím sklíčkem a rozmáchnout špičkou reparační jehly.
- 3) pozorován imerzním objektivem se zvětšením 100x.

**Fixace** způsobuje rychlé usmrcení objektu při zachování neporušené struktury chromozomů

**Macerace** rozruší pektinovou střední lamelu. Rozvolněné buňky se tlakem rozprostřou do plochy.

**Barvení** zviditelní chromozomy