

MIKROTECHNIKY

(Úvodní praktikum z botanické mikrotechniky)



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

**OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost - ESF
Vzdělávání středoškolských pedagogů a studentů
středních škol jako nástroj ke zvyšování kvality
výuky přírodovědných předmětů**

úvodní praktikum z botanické mikrotechniky

teoretický úvod

Základní metodou pozorování rostlinných buněk a pletiv je světelná mikroskopie v procházejícím světle (světlo prochází pozorovaným objektem). K pozorování makrostruktur, např. trichomů, papil, sporangií, slouží mikroskopie v dopadajícím světle (stereomikroskop, binokulární lupa). V rostlinné anatomii je nejčastěji využívána **mikroskopie v procházejícím světle ve světlém poli** (další techniky světelné mikroskopie jsou např. mikroskopie v temném poli, m. fázově kontrastní, m. interferenční, m. polarizační, m. fluorescenční aj.). Ke studiu buněk a jejich organel slouží elektronová mikroskopie (transmisní a rastrovací) a konfokální mikroskopie.

mikroskop pro světelnou mikroskopii

Složení mikroskopu:

- mechanická část - stativ, tubus, binokulární hlavice, pracovní stolek;
- optická část - objektiv, okulár;
- osvětlovací část - světelný zdroj s clonou, kondenzor (soustava čoček soustřeďující světlo na pozorovaný objekt), irisová clona.

Zobrazení mikroskopem: objektiv tvoří skutečný (reálný), zvětšený a převrácený obraz objektu v přední ohniskové rovině okuláru. Tento obraz pozorujeme okulárem jako lupou. Výsledný obraz pozorovaný okulárem je neskutečný (virtuální), převrácený a ještě více zvětšený.

důležitá data

—**zvětšení mikroskopu (M)** vypočítáme jako součin zvětšení použitého objektivu (údaj uveden na objektivu) x zvětšení okuláru (údaj uveden na okuláru) x případné zvětšení binokulární hlavice (pokud se podílí na zvětšení je tento údaj na hlavici uveden). V případě, že provádíme fotodokumentaci, je vhodné vyfotografovat při stejném zvětšení mikrometrické měřítko a přiložit je do pravého dolního rohu k mikrofotografii (obr. 17, 18). Moderní mikroskopy pracující s digitálním obrazem zobrazují měřítko automaticky;

—**rozišovací schopnost mikroskopu (d)** je dána vzdáleností dvou blízko sebe ležících bodů, které lze ještě rozlišit jako dva body. Závisí na numerických aperturách objektivu (A_{obj}) a kondenzoru (A_{kon}) (uvedeny na mikroskopu, vyjadřuje rozišovací schopnost objektivu) a vlnové délce použitého světla (λ) - vlnová délka bílého světla je $0,55 \mu\text{m}$. Modré světlo poskytuje objektivu lepší rozišovací schopnost než světlo bílé (má kratší vlnovou délku).

$$d = \frac{\lambda}{A_{obj} + A_{kon}}$$

Objektiv rozlišuje nejlépe, má-li s kondenzorem stejnou hodnotu apertury - aperturu kondenzoru je nutné přizpůsobovat apertuře objektivu. Hranici rozišovací schopnosti světelného mikroskopu je $0,2 \mu\text{m}$ ($1 \mu\text{m} = 0,001\text{mm} = 1000 \text{nm}$). Z praktického hlediska je vhodné vědět, jaké minimální rozměry musí mít předmět, abychom jej při určitém celkovém zvětšení v mikroskopu spolehlivě rozlišili svými očima (minimální rozišivost - d_{min}).

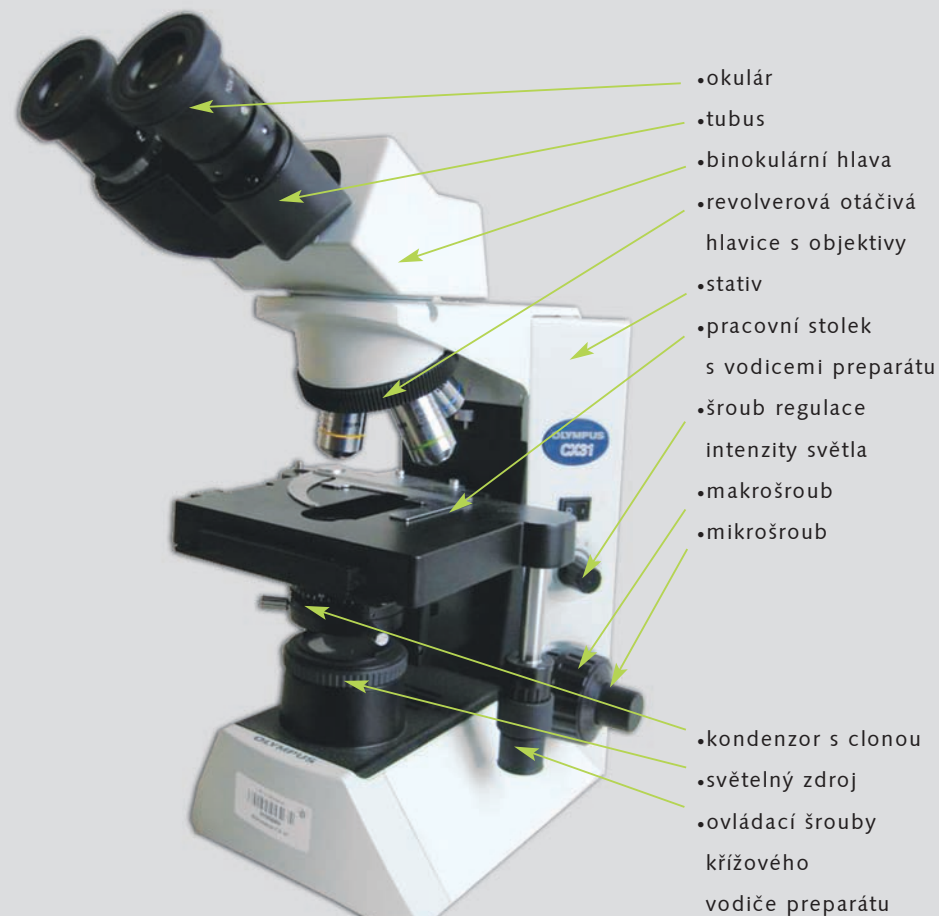
$$d_{min} = \frac{327}{M} \quad [\mu\text{m}]$$

M - celkové zvětšení mikroskopu

$327 \mu\text{m}$ (= $0,327 \text{mm}$) - vzdálenost dvou bodů, které je průměrně unavené lidské oko schopno rozlišit jako dva body ze vzdálenosti 250mm ;

1

obr. 1 Mikroskop OLYMPUS CX 31



— **hranice užitečného (prospěšného) zvětšení** je 500 - 1000 násobek A_{obj}
Pokud je celkové zvětšení menší než 500 A_{obj} nevyužíváme plně rozlišovací schopnosti objektivu, pokud je větší než 1000 A_{obj} jedná se o zvětšení prázdné, které nepřináší další informace o pozorovaném objektu. V případě většího rozdílu mezi celkovým a užitečným zvětšením může dojít ke ztrátě obrysové ostrosti pozorovaných struktur. Uvedené nedostatky korigujeme vhodnou volbou okuláru.

— **hloubku ostrosti** měníme kondenzorem a popř. i cloněním.

příklad

Pozorujeme preparát objektivem zvětšujícím 40x ($A_{obj} = 0,65$), okulárem zvětšujícím 10x. Vypočtete celkové zvětšení (M), rozlišovací schopnost (d), minimální rozlišivost (d_{min}) a stanovte hranice užitečného zvětšení.

$$M = 10 \times 40 = 400x$$

$$d = 0,55 / 0,65 + 0,65 = 0,43 \mu\text{m} \text{ (při daném nastavení rozlišíme body vzdálené } 0,43 \mu\text{m)}$$

$$d_{min} = 327 / 400 = 0,82 \mu\text{m} \text{ (při daném nastavení rozlišíme objekty velké } 0,82 \mu\text{m)}$$

$$\text{hranice užitečného zvětšení} = 500 \times 0,65 \text{ až } 1000 \times 0,65 = \text{zvětšení } 325x \text{ až } 650x$$

pomůcky pro mikroskopování

- krabíčka na mikroskopickou soupravu;
- podložní a krycí sklíčka;
- preparační jehla, pinzeta, jemný štěteček na přenášení pozorovaných objektů (např. tenkých řezů), skalpel a nůžky k hrubší přípravě rostlinného materiálu, žiletka ke zhotovení jemných tenkých řezů, válečky bezové duše (získáme z odumřelých větví bezu černého);
- hodinová sklíčka k barvení preparátů, Petriho misky na vodu, popř. glycerol, skleněná tyčinka, kapátko, pipetka;
- sepraný plátěný hadřík, filtrační papír;
- bezbarvý lak na nehty ke zhotovení otiskových preparátů, izolepa;
- nelinkované papíry formátu A4, středně tvrdé tužky, guma, propisky, nesmazatelné fixy k popisu podložních sklíček aj.

preparáty

Preparáty, tj. vhodně upravené části rostlin k mikroskopickému pozorování, mohou být dočasné (přechodné) nebo trvalé. Přechodné preparáty obsahující živý, nefixovaný objekt, se označují jako nativní. Trvalé preparáty bývají většinou kvalitnější (zalití objektu do parafínu či jiného média umožňuje zhotovení tenkých řezů speciálními přístroji, tzv. mikrotomy), výhodou je také jejich trvanlivost (kvalitní preparát vydrží desítky let). Příprava trvalých preparátů je však časově náročná a vyžaduje speciální přístrojové vybavení.

postup zhotovení preparátu

Zhotovení jednoduchého dočasného preparátu:

Odběr materiálu → (fixace a konzervace materiálu) → příprava objektu k mikroskopování - např. zhotovení řezů → (barvení) → uzavření objektu mezi podložní a krycí sklíčko ve vodě nebo glycerolu.

Odběr materiálu:

malé kousky pletiv přeneseme do skleněných nebo polyetylenových lahviček s fixací nebo přímo připravíme k mikroskopování. Pečlivě popíšeme.

Fixace (šetrné usmrcení buněk) a konzervace materiálu:

k fixaci použijeme 70% roztok etanolu, k následné konzervaci glycerol-etanol (3 díly 70% etanolu : 1 díl glycerolu). Toto konzervační médium změkčuje materiál (výhodné při řezání tvrdších objektů, např. dřeva nebo sklerenchymatických pletiv) a nemusí se vypírat. Fixaci je třeba provést rychle a minimalizovat tak vznik artefaktů.

Způsoby přípravy objektů k mikroskopování:

- objekt neupravujeme a pozorujeme in toto (lístek mechu, pylové zrno aj.);
- výřez pletiva (např. pozorování buněk suknice cibule);
- vytlačení, popř. roztlačení pletiva (dužnatá pletiva, chromozomy);
- zhotovení tenkých řezů v ruce pomocí bezové duše (obr. 2, 3) - malý kousek pletiva upevníme do podélně rozkrojené bezové duše, provedeme první srovnávací řez a potom několik co nejtenčích řezů (řežeme jedním tahem zešikma), řezy přeneseme štětečkem do kapky vody, popř. glycerolu, na pod-



ložní sklíčko nebo na hodinové sklíčko k barvení. Zhotovení tenkých řezů vyžaduje určitou zručnost, je tedy nutný trénink a praxe.

Řezy objekty mohou být příčné (transverzální) nebo podélné (longitudinální). Longitudinální řezy mohou být radiální (vedené přibližně středovou osou orgánu) nebo tangenciální (vedené mimo středovou osu orgánu);

—zhotovení otiskových preparátů pomocí laku na nehty (mikroreliefová metoda) - metoda vhodná k pozorování buněk epidermis a stomat listů. Na plochu listové čepele (přibližně 1 x 1,5 cm) nanese tenkou vrstvu bezbarvého laku na nehty, necháme zaschnout, stáhneme pomocí bezbarvé izolepy a přilepíme na podložní sklíčko. Pozorujeme při silnějším zaclonění. Příprava otiskových preparátů je rychlá a jednoduchá, preparáty bývají přehledné, především u listů s tenkou kutikulou na povrchu epidermis. Otiskové preparáty však neumožňují, na rozdíl od nativních preparátů zhotovených stažením malého kousku epidermis, pozorovat vnitřní struktury buněk, např. jádro, cytoplazmu, chloroplasty.

Barvení: slouží ke zvýraznění pozorovaných struktur. Pozorovaný objekt barvíme na hodinovém sklíčku, popř. přímo na podložním sklíčku. Pro základní biologické praktikum jsou vhodná následující barvení:

—barvení **Lugolovým roztokem** (Jodjodkalium - roztok 1g jodidu draselného KI + 0,2 g jódu v 50 ml destilované vody) - cytoplazmu barví hnědě, škrob tmavě fialově;

—barvení **floroglucinolem** (roztok 1 g floroglucinolu v 70% etanolu) - barví intenzivně červeně lignifikované buněčné stěny, výborné činidlo k barvení dřeva. Barevná reakce je urychlena v kyselém prostředí - k barvenému objektu přikápneme kapku 10 - 20% kyseliny chlorovodíkové HCl;

—barvení **safraninem** (růžový roztok safraninu na hodinovém sklíčku) barví červeně sklerifikované a lignifikované buněčné stěny, při vyšší koncentraci i celulosní buněčné stěny a buněčné organely;

—barvení **chlórzinkjódem** (roztok 20 g chloridu zinečnatého ZnCl₂ + 7 g jodidu draselného KI + 1,5 g jódu v 10 ml destilované vody) - barví celulosu a škrob fialově, zdřevnatělé buněčné stěny žlutohnědě.

Uzavření objektu mezi podložní a krycí sklíčko ve vodě nebo glycerolu: krycí sklíčko položíme na hranu a zvolna sklápíme - omezíme tak přítomnost nežádoucích bublin. Voda nebo glycerin se nesmí dostat na svrchní plochu krycího sklíčka. Glycerinové preparáty vydrží i několik měsíců až let. Vodní preparáty pouze několik minut.

zásady a postup při mikroskopování

—při mikroskopování dbáme na čistotu podložních a krycích sklíček (čistíme etanolem nebo saponátem) a čistotu mikroskopu (čelní čočky objektivu lze čistit benzínem, nikdy etanolem), mikroskop chráníme před prachem;

—zvolíme vhodný okulár a nastavíme nejméně zvětšující objektiv;

—pomocí kondenzoru a clony nastavíme vhodné osvětlení;

—preparát upevníme do svorek křížového vodiče a pozorovaný objekt umístíme nad střed horní kondenzorové čočky;

—makrometrickým šroubem přiblížíme čelní čočku objektivu na minimální

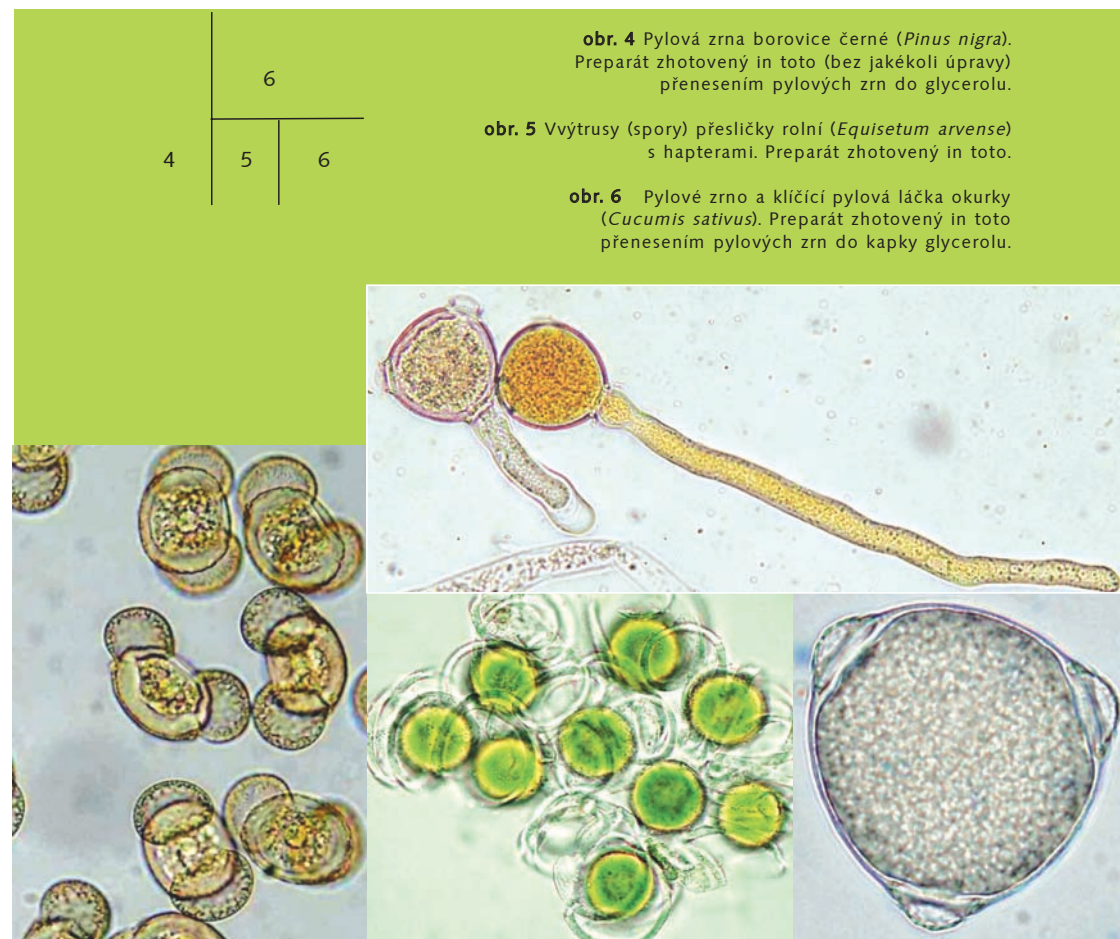
vzdálenost k preparátu (sledujeme ze strany), upravíme aperturu kondenzoru tak, aby souhlasila s aperturou objektivu, makrometrickým šroubem nahrubo zaostříme, doostříme mikrošroubem, upravíme clonou osvětlení. Meandrovitým posouváním preparátu vybereme vhodné místo k pozorování a umístíme je do středu zorného pole;

—nastavíme rozestup okulárů, pootočením zaostřovacího kroužku okuláru vyrovnáme případnou oční vadu, takže pozorovaný objekt vidíme oběma očima stejně;

—nastavíme silněji zvětšující objektiv, upravíme aperturu kondenzoru, doostříme a upravíme osvětlení;

—potřebujeme-li největší zvětšení a nejlepší rozlišení používáme imerzní objektiv - na krycí sklíčko kápneme imerzní olej a v něm ponoříme čelní čočku imerzního objektivu. Imerzní olej má stejný index lomu jako sklo - do imerzního objektivu tak vstupuje větší část světelného kužele;

—o pozorování vedeme pracovní protokol, pozorované struktury dokumentujeme kresbou, popř. mikrofotografií.



Pracovní protokoly pořizujeme na nelinkovaný papír formátu A4 a zakládáme do složky. Protokol obsahuje záhlaví (jméno studenta, ročník, studijní obor, datum, číslo a téma cvičení), číslované úkoly (číslo a název úkolu, rostlinný materiál, potřeby, postup, pozorování včetně nákresu, vyhodnocení, závěr).

Zhotovení grafické dokumentace kresbou vyžaduje cvik. Kreslíme tužkou, pokud možno jedním tahem bez stínování, šrafování omezujeme na nejnужnější případy, vybíráme pouze podstatné struktury, dbáme na proporcionalitu a názornost, obrázky zhotovujeme přiměřeně velké. Popisujeme propiskou nebo tenkou fixou;

- po ukončení mikroskopování nastavíme nejméně zvětšující objektiv;
- všechny činnosti související s mikroskopováním vyžadují praxi a cvik!

měření a počítání struktur

Měření délky stomat: k měření délky stomat použijeme okulárový mikrometr - skleněná kruhovitá destička s měřítkem, která se vkládá do okuláru (měřítkem dolů). Měřením okulárovým mikrometrem dostáváme velikost objektu v dílcích okulárového měřítka - při různých zvětšeních, tj. při použití různých objektivů, naměříme různou velikost objektu (různý počet dílků).

Ke zjištění skutečné velikosti objektu (délky stomat) musíme vypočítat mikrometrický koeficient, který udává, kolika mikrometrům odpovídá jeden dílek okulárového měřítka při daném zvětšení. Použijeme objektivový mikrometr - podložní sklíčko s měřítkem 1 mm rozděleným na 100 dílků (1 dílek = 0,01 mm = 10 μm). Měřítka okulárového mikroskopu umístíme tak, aby bylo rovnoběžné s měřítkem objektivového mikrometru (obr 7).

Vyhledáme překrývající se rysky v levé a pravé části zorného pole. V tomto úseku spočítáme dílky okulárového a objektivového měřítka a vypočteme mikrometrický koeficient (k):

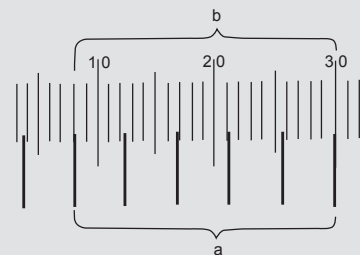
$$k = \frac{\text{počet dílků objektivového mikrometru} \times 10}{\text{počet dílků okulárového mikrometru}}$$

Skutečnou velikost měřeného objektu (délku stomat) při daném zvětšení vypočteme tak, že naměřený počet dílků okulárovým mikrometrem vynásobíme mikrometrickým koeficientem.

Podobným způsobem měříme další délkové rozměry, např. průměr cév, velikost pylových zrn aj.

Měření hustoty stomat: k měření hustoty stomat využijeme preparáty připravené pro měření délky stomat. Do okuláru vložíme kruhovou destičku s vyrytým čtvercem (mřížka, obr. 8). Tento čtverec překryje náhodně část preparátu. Ve čtverci spočítáme stomata, stomata na obvodu zasahující mimo čtverec počítáme pouze na dvou stranách. Objektivovým mikrometrem změříme stranu čtverce, vypočítáme plochu (μm²) a trojčlenkou přepočteme počet stomat na 1 mm².

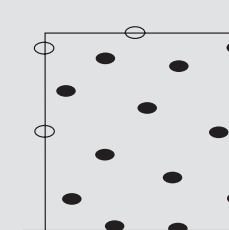
obr. 7 Stanovení mikrometrického koeficientu. V tomto případě 5 (počet dílků objektivového mikrometru) x 10 / 22 (počet dílků okulárového mikrometru) = 2,46. Skutečnou délku objektu získáme tak, že naměřený počet dílků okulárovým mikrometrem vynásobíme 2,46.



7

8

obr. 8 Rastr k počítání struktur. Hraniční zásahy počítáme pouze na dvou stranách (v tomto případě 12 zásahů).



9

10

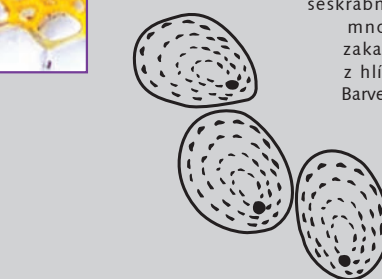
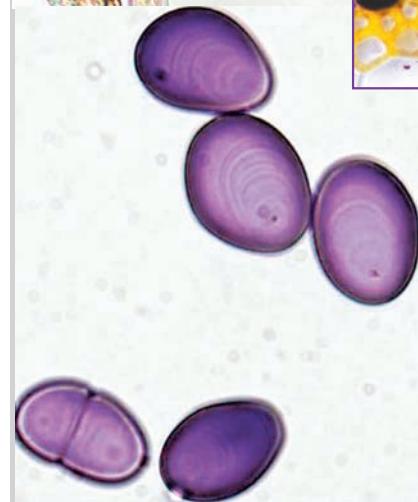
obr. 9 Sporangium (výtrusnice) kapradě samce (*Dryopteris filix-mas*). Preparát zhotovený in toto opatrným odříznutím sporangia od listu a přenesením do glycerolu.

11

11

obr. 10 Příčný řez periferní částí řapíku se žlaznatým trichomem pelargónie páskaté (*Pelargonium zonale*). Řez zhotovený v ruce pomocí bezové duše, preparát barvený chlórzinkjódem. Sklerifikované buněčné stěny zbarveny žlutohnědě, amyloplasty tmavě fialové.

obr. 11 Amyloplasty bramborové hlízy (*Solanum tuberosum*). Preparát zhotovený seškrábnutím malého množství mléčně zakalené tekutiny z hlízy bramboru. Barveno Lugolovým roztokem - amyloplasty obsahující škrob se barví fialově.



Mikrofotografie a jednoduchý náčrt.

základní použitá literatura

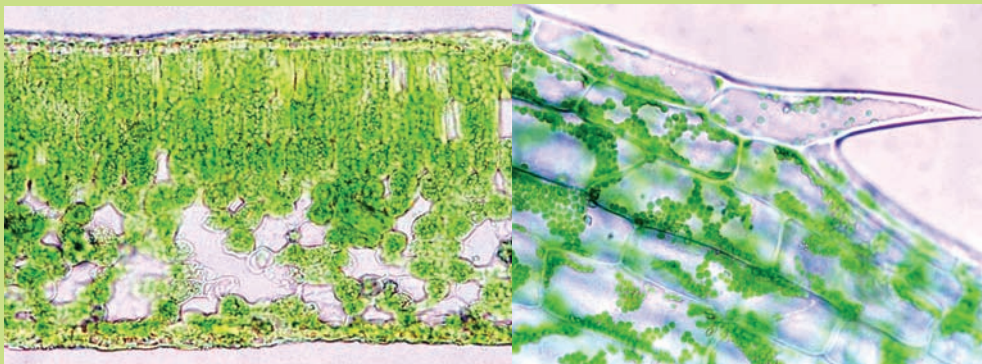
- BRAUNE W., LEMAN A. et TAUBERT H. (1967): Pflanzenanatomisches Praktikum. - VEB Gustav Fischer - Verlag, Jena.
- HEJTMÁNEK M. (1985): Úvod do světelné mikroskopie. - Univerzita Palackého, Olomouc.
- JURČÁK J. (1998): Základní praktikum z botanické mikrotechniky a rostlinné anatomie. - Univerzita Palackého, Olomouc.
- NOVÁČEK F. (1982): Praktikum z rostlinné organologie s přehledem zástupců rostlinné říše. - Univerzita Palackého, Olomouc.
- NOVÁČEK F. (1982): Praktikum z rostlinné cytologie a histologie se základy mikroskopické techniky. - Univerzita Palackého, Olomouc.
- PAZOUREK J. (1975): Pracujeme s mikroskopem. - SNTL, Praha.
- PAZOUREK J. (1963): Studium listové epidermis mikroreliefovou metodou. - Preslia, Praha, 35: 210 - 216.
- PAZOUREK J. et VOTRUBOVÁ O. (1997): Atlas of Plant Anatomy. - Peres Publishers, Praha.
- PAZOURKOVÁ Z. (1986): Botanická mikrotechnika. - Univerzita Karlova, Praha.
- STŘIHAVKOVÁ H. (1978): Praktikum z botaniky. - SPN, Praha.
- VINTER V. (2008): Rostliny pod mikroskopem (Základy anatomie cévnatých rostlin). - Univerzita Palackého, Olomouc.
- VOTRUBOVÁ O. (2001): Anatomie rostlin. - Univerzita Karlova, Karolinum, Praha.

obr. 12 Příčný řez listem břečťanu popínavého (*Hedera helix*). Řez zhotovený v ruce pomocí bezové duše, nebarvený preparát.

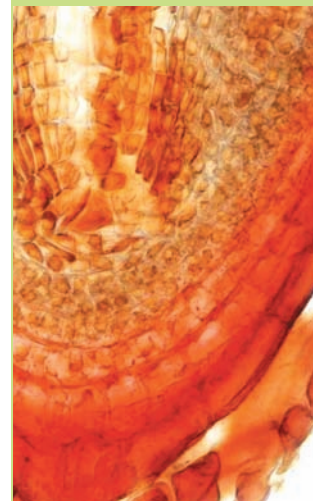
12

13

obr. 13 Lístek vodního moru kanadského (*Eloдея canadensis*) - mikrofotografie. Preparát připravený vyříznutím části lístku a přenesením do glycerolu.



14	
15	16
17	18



obr. 14 Podélný řez kořenovou špičkou kapradě samce (*Dryopteris filix-mas*). Řez zhotovený v ruce pomocí bezové duše, barvení safraninem.

obr. 15 Střední válec s leptocentrickými (lýkostřednými) cévními svazky v oddenku konvalinky vonné (*Convallaria majalis*). Příčný řez zhotovený v ruce pomocí bezové duše, preparát barvený flogloglucinolem s HCl a Lugolovým roztokem. Lignifikované buněčné stěny endodermis a trachejí zbarveny červeně, amyloplasty v parenchymatických buňkách tmavě fialové.

obr. 16 Příčný řez stonkem plavuně vidlačky (*Lycopodium clavatum*). Řez zhotovený v ruce pomocí bezové duše, barvení flogloglucinolem s přikápnutím HCl. Lignifikované buněčné stěny tracheid a sklerenchymu se barví intenzivně červeně.

obr. 17 Otiskový preparát epidermis spodní strany listu kapradě samce (*Dryopteris filix-mas*). V epidermis patrná stomata obklopená sousední podkovovitou buňkou. Preparát zhotoven mikroreliefovou metodou pomocí laku na nehty. Vložené měřítko umožňuje odhadnout přibližnou velikost stomat

obr. 18 Otiskový preparát epidermis spodní strany listu podeňky (*Tradescantia virginiana*). V epidermis patrná stomata obklopená pravidelně čtyřmi sousedními buňkami. Preparát zhotoven mikroreliefovou metodou pomocí laku na nehty.

