

BUNĚČNÁ STĚNA

- struktura a role v rostlinné buňce

O buněčné stěně:

Buněčná stěna je nedílnou součástí každé rostlinné buňky a je jednou z charakteristických struktur odlišujících buňku rostlinnou od živočišné. Buněčná stěna udává tvar rostlinné buňky, který úzce souvisí s její funkcí v pletivu. Složení buněčné stěny se liší v závislosti na druhu rostliny i pletiva, nejčastějšími komponenty, které jsou ve stěně vždy přítomné jsou celulóza, hemicelulózy, pektiny (vše polysacharidy) a proteiny (strukturní i enzymy). Na základě vývoje a složení (jak chemického tak struktury) rozeznáváme následující tři základní vrstvy buněčné stěny:

Střední lamela – amorfni vnější vrstva složená hlavně z pektinů, nachází se na rozhraní sousedních buněk mezi jejich primárními stěnami (viz dále).

Primární buněčná stěna – složená hlavně z celulózy. Nachází se u všech rostlinných buněk, je schopna růstu.

Sekundární buněčná stěna – tvoří se na vnitřní straně primární stěny (rozuměj blíž k plazmatické membráně), najdeme ji u buněk, jejichž růst byl ukončen. Sekundární stěna tvoří hlavně mechanickou oporu případně bariéru pro průnik látek. Sekundární buněčná stěna se ukládá ve vrstvách – lamelách (Str. 7). Sekundární stěna je tvořena rovněž celulózovými mikrofibrilami a dalšími polysacharidy, bývá impregnována ligninem, suberinem, kutinem či vosky.

I přesto, že sousední buňky v rostlinném pletivu jsou zdánlivě odděleny buněčnou stěnou, jejich protoplasty jsou vzájemně propojeny a komunikují **plazmodesmaty** (jednotné číslo plazmodezma). Plazmodesmata jsou cytoplazmatické provazce obsahující kanál endoplazmatického retikula, které procházejí ztenčeními v buněčných stěnách sousedních buněk. Plazmodesmata se většinou shlukují do políček. Samotná plazmodesmata jsou pod hranicí rozlišení světelného mikroskopu (přibližně 50 nm). Na příčných řezech jehlicemi ale můžeme pod světelným mikroskopem pozorovat **ztenčiny buněčné stěny**.

Praktická část cvičení, pojednávající o buněčné stěně, je rozdělena do dvou částí. V první části jménem PROTOPLASTY je buněčná stěna demonstrována jako struktura, která udává rostlinné buňce pevnost a tvar. Druhá část jménem PRIMÁRNÍ A SEKUNDÁRNÍ BUNĚČNÁ STĚNA se věnuje struktuře primární a sekundární buněčné stěny a rozdílům v uspořádání buněčné stěny u různých buněk rostlinných pletiv.

PROTOPLASTY

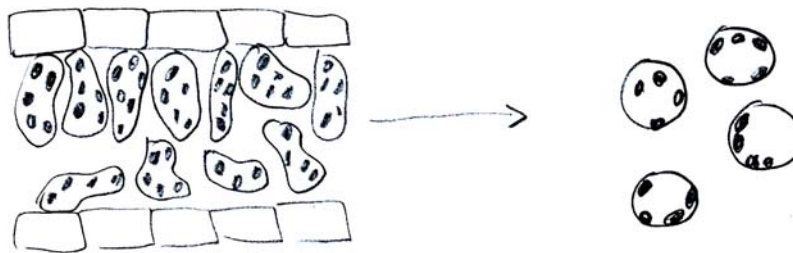


Úvod:

Co jsou protoplasty?

Protoplasty jsou buňky (rostlin, hub nebo bakterií), které byly zbaveny buněčné stěny. Odstranit buněčnou stěnu lze mechanicky, nebo štěpením pomocí enzymů. Příkladem enzymů štěpících složky buněčné stěny jsou celulózy, štěpící celulózu v rostlinných buněčných stěnách, nebo pektinázy, které degradují pektinovou složku buněčných stěn.

Buňky zbavené buněčné stěny zaujímají kulovitý tvar a jsou obaleny pouze membránou. Protože jsou velmi citlivé vůči prostředí, zvláště jeho osmotickým vlastnostem, je třeba protoplastování i následnou kultivaci protoplastů provádět v prostředí s vysokou osmotickou aktivitou, jako např. v roztoku cukru. V čisté vodě by došlo k popraskání protoplastů vlivem plasmoptýzy.



Příčný řez listem – buňky mezofylu s chloroplasty a buňky pokožky.

Uvolněné protoplasty mezofylových buněk.

Protoplasty jsou dále využívány pro mnoho účelů. Například, dva protoplasty lze přinutit k fúzi, přičemž vzniká hybridní buňka s vlastnostmi obou buněk „rodičovských“. Protoplasty lze také transformovat vybranými geny například pomocí elektroporace nebo pomocí infekce geneticky modifikovanou bakterií *Agrobacterium tumefaciens*. Kultivací na vhodném kultivačním médiu lze z jednoho protoplastu opět regenerovat celistvou rostlinu.

Protoplasty lze izolovat z celé řady pletiv, z listů, stonků, kořenů, květů, a dokonce i z pylu. Metoda izolace a kultivační média se liší podle druhu rostliny a pletiva, ze kterého mají být protoplasty izolovány.

K čemu je využíváme na našem praktiku?

Rostlinné buňky mají různé tvary, přičemž tvar rostlinné buňky je udržován pomocí buněčné stěny. Po odstranění buněčné stěny zaujímá rostlinný protoplast kulovitý tvar, a teprve po regeneraci nové buněčné stěny může buňka opět získat nejrůznější tvary. Důležitost buněčné stěny v udržování tvaru buněk bude demonstrována na buňkách mezofylu listu salátu. Studenti budou mít možnost porovnat tvar buněk mezofylu před protoplastováním a po něm.



Technické informace:

Potřeby:

Trvalý preparát příčný řez listem salátu

Čerstvý list salátu

Enzymový koktejl, 1ml (2% driseláza* v 0,7 M mannitolu).

21% sacharóza, 1ml

eppendorfka

plastová Petriho miska

žiletka

pinzeta

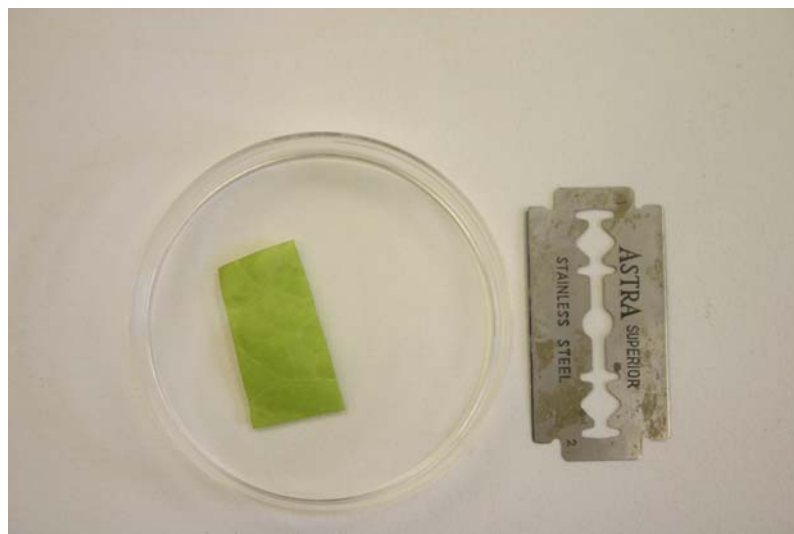
pipeta

košíček z tkaniny s 10 μm otvory

buničitá vata

krycí a podložní mikroskopická skla

* Driseláza je enzymová směs izolovaná z hub. Obsahuje polysacharidové exo- a endohydrolázy, jako například celulózu, pektinázu, beta-xylanázu atp.

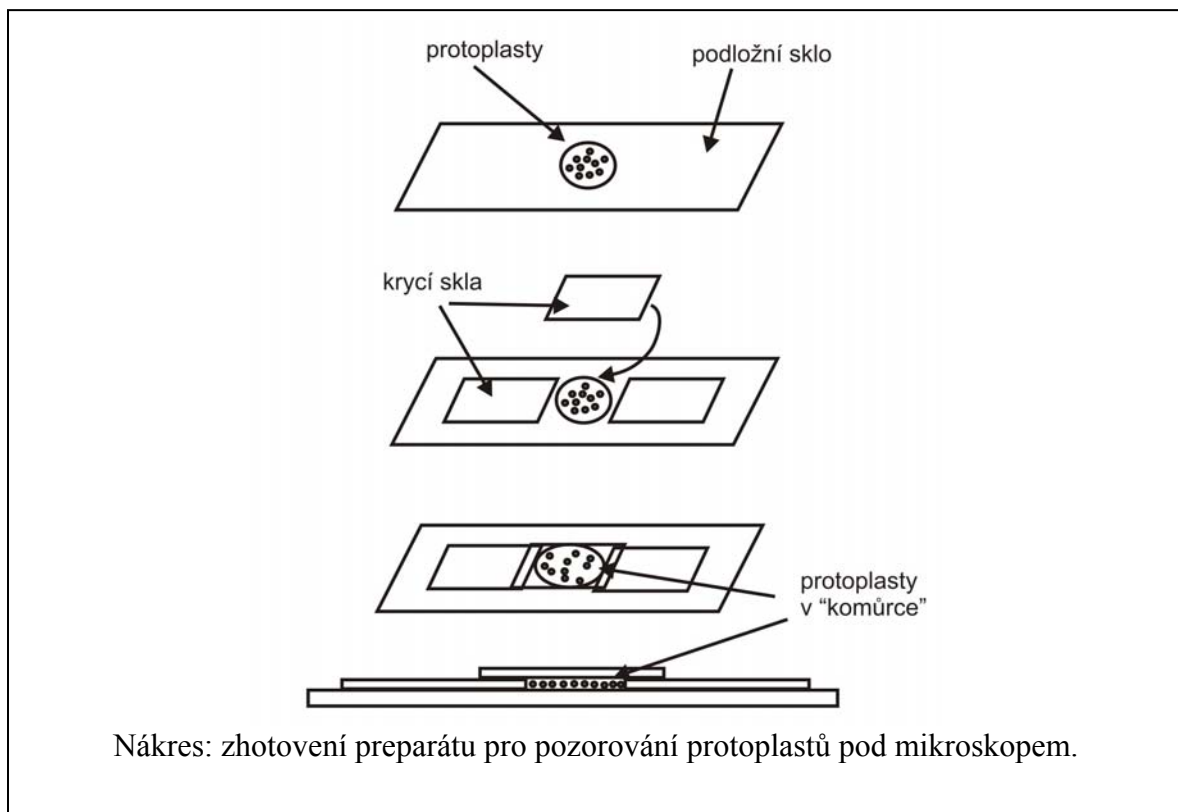




Experiment 1: příprava protoplastů

Začněte s tímto experimentem, protože příprava protoplastů zahrnuje 40-minutovou inkubaci, během které můžete provádět další experimenty.

1. Nařežte na plastové misce kousek listu salátu (cca 1cm²) na přibližně 1-2 mm čtverečky.
2. Přeneste nařezaný list ihned do eppendorfky s 1ml enzymového koktejlu.
3. Inkubujte při mírném třepání v teplotě 28°C 40 minut.
4. Po 40 minutách odpipetujte opatrně roztok z eppendorfky (nenabírejte do pipety celistvé kousky pletiva) a přeneste tekutinu do košíčku s 10 µm otvory v tkanině.
5. OPATRŇE a POMALU odsajte část média z košíčku tak, aby v něm stále zbývalo trochu tekutiny. Otvory ve dně košíčku jsou příliš malé na to, aby dnem protoplasty prošly, proto zůstávají protoplasty v tekutině v košíčku.
6. Připipetujte do košíčku opatrně 1 ml 21% sacharózy a opět většinu tekutiny opatrně odsajte.
7. Zbytek tekutiny s protoplasty z košíčku naberte do pipety (cca 200 µl) a přeneste do čisté eppendorfky.
8. Pozorujte protoplasty po mikroskopem. Protoplasty jsou velice křehké, proto krycí sklo vždy podložte dalšími dvěma krycími skly. Vznikne tak komůrka, ve které protoplasty nejsou rozmačkány krycím sklem, a kde můžete protoplasty dobře pozorovat pod mikroskopem (viz nákres).



Experiment 2: pozorování tvarů buněk listu salátu

1. Pozorujte pod mikroskopem trvalý preparát příčného řezu listem salátu. Nakreslete typ a tvar buněk, které vidíte.
2. Pomocí pinzety stáhněte kousek pokožky čerstvého listu salátu. Umístěte ihned do kapky destilované vody na podložním sklíčku a přikryjte krycím sklem. Pozorujte pod mikroskopem a nakreslete typ a tvar buněk, které vidíte.

Experiment pro zájemce: co se stane s protoplasty, pokud je místo v osmoticky vyrovnaném médiu budete kultivovat ve vodě?

1. Kápněte na podložní sklo roztok s protoplasty a přikryjte krycím sklem, které je podloženo dalšími dvěma krycími skly.
2. Pipetou pomalu z jedné strany preparátu přikapávejte vodu, a na druhé straně odsávejte médium kouskem buničité vaty. Tímto způsobem dojde k výměně média na preparátu za vodu.
3. Najděte v mikroskopu protoplasty a sledujte plazmoptýzu (praskání) protoplastu vlivem nadměrného příjmu vody.

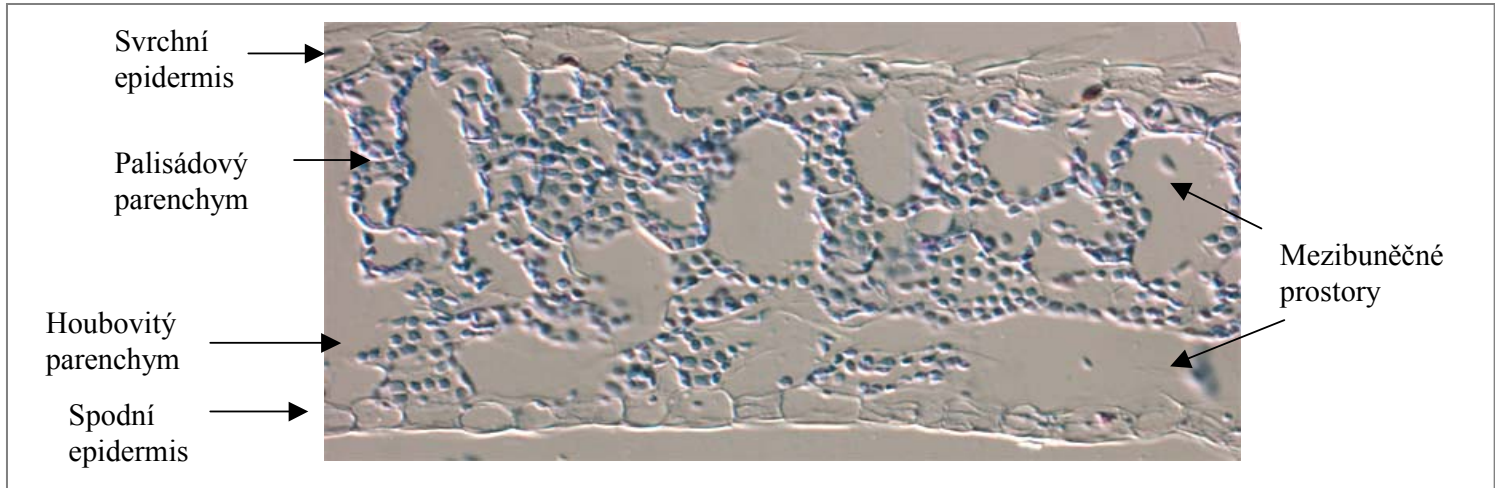


Úkol:

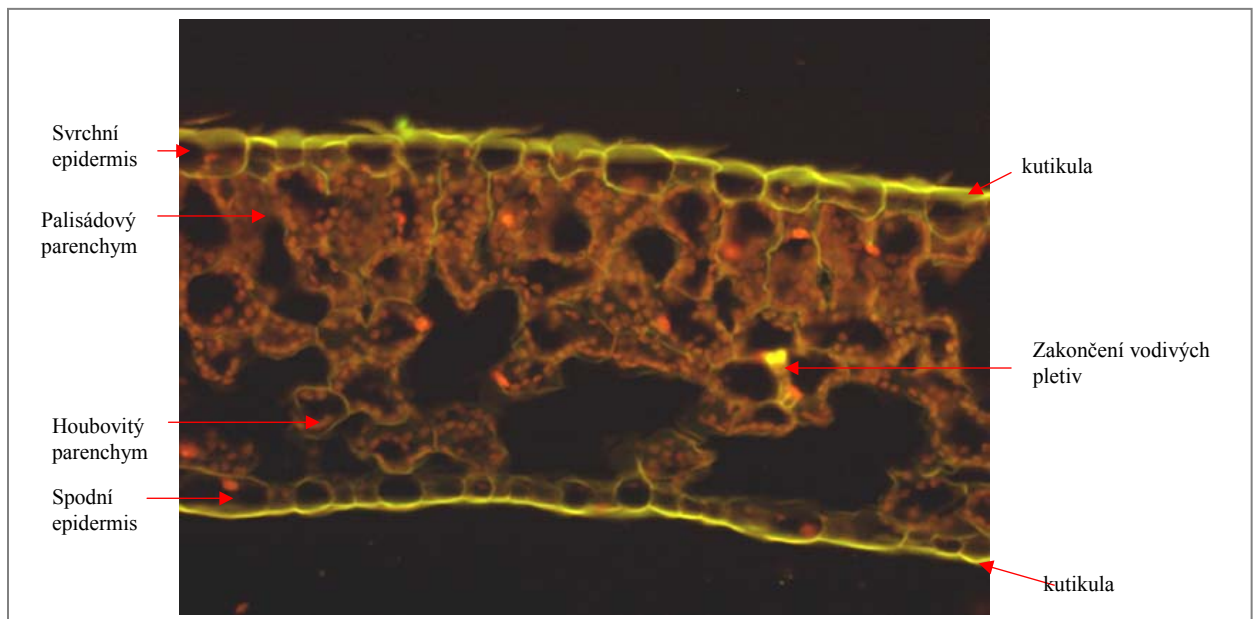
1. Připravte protoplasty z čerstvého listu salátu.
2. Pozorujte pod mikroskopem buňky mezofylu z příčného řezu listem salátu, buňky pokožky listu salátu, a protoplasty. Popište rozdíly ve tvaru buněk. Popište rozdíly ve tvaru mezofylových buněk před a po protoplastování. Vysvětlete.
3. (Jen pokud bylo prováděno) Vysvětlete, co se stalo s protoplasty, pokud bylo kultivační médium vyměněno za čistou vodu.

Příklady pozorování a vysvětlivky:

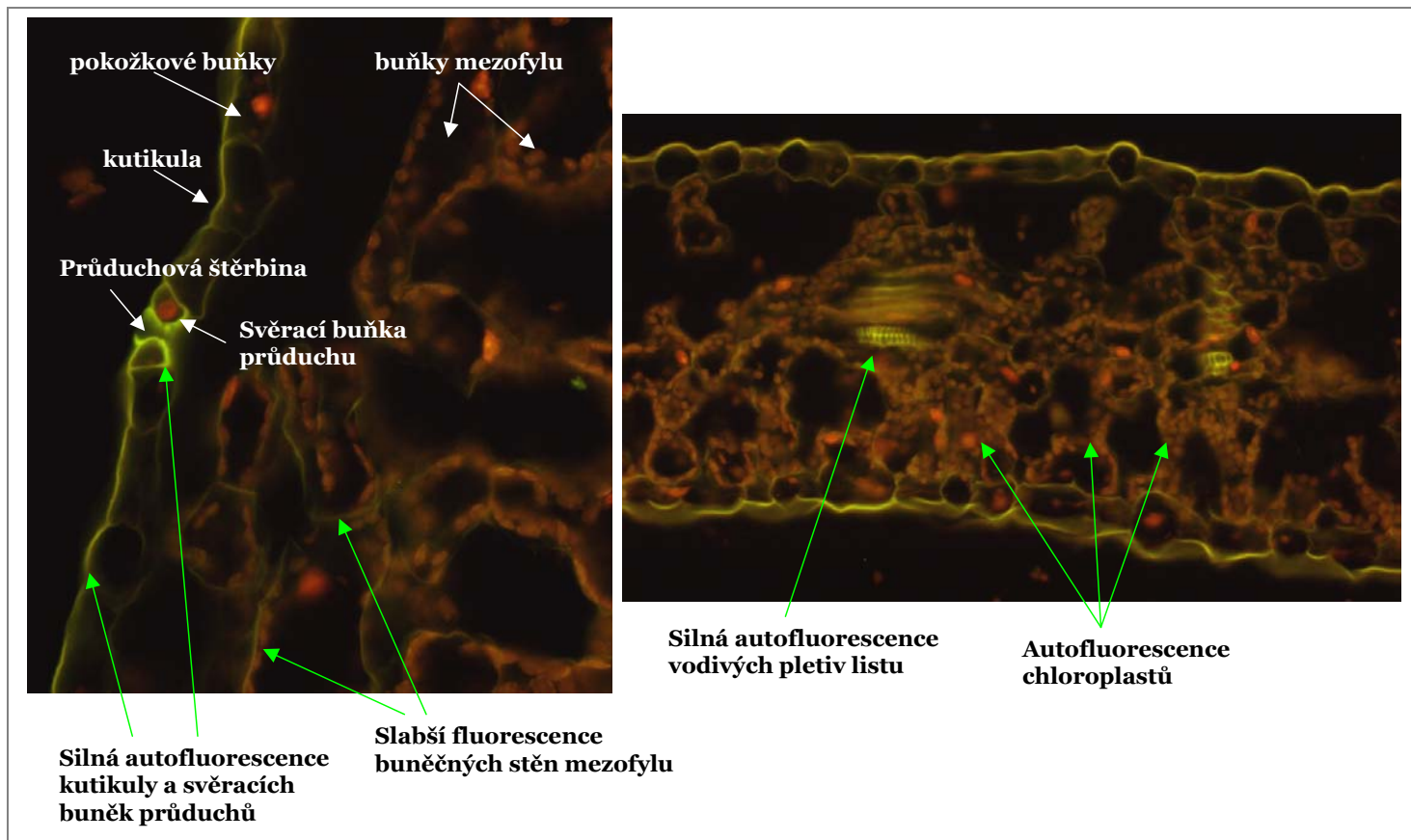
**Příčný řez listem salátu, *Lactuca sativa*
(DIC)**



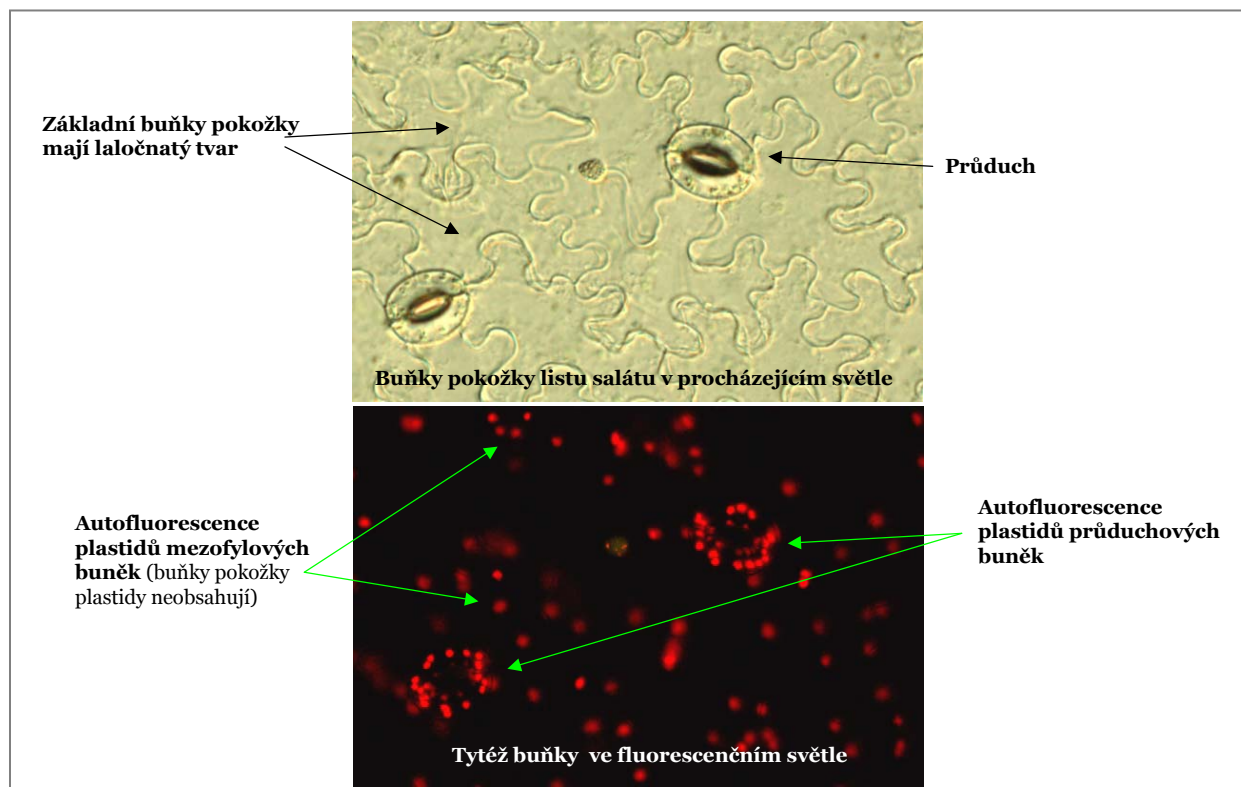
**Příčný řez listem salátu, *Lactuca sativa*
(fluorescence)**



Příčný řez listem salátu , *Lactuca sativa*
(fluorescence)



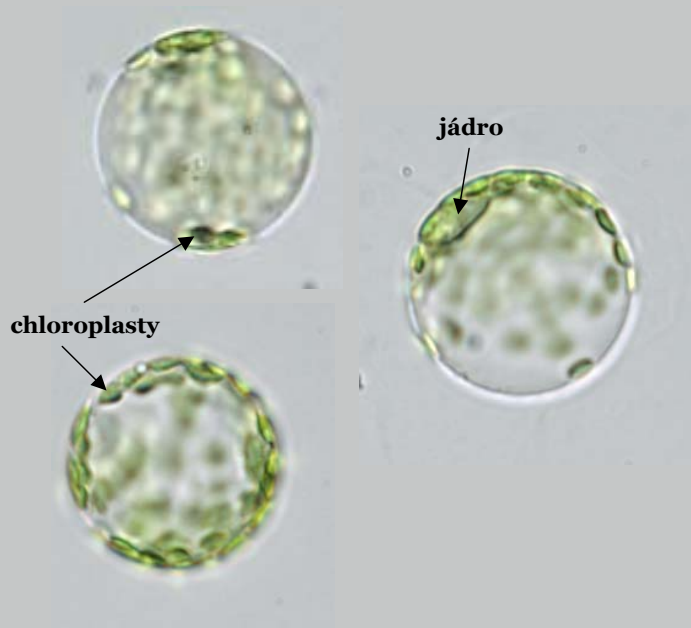
List salátu – pokožka čerstvého listu salátu
-tvar pokožkových buněk a průduchů, autofluorescence plastidů



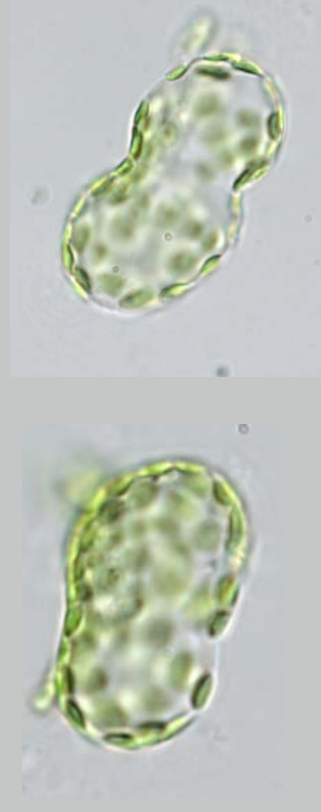
Protoplasty izolované z listu salátu

Protoplasty: po odstranění buněčné stěny zaujmají buňky kulatý tvar.

Protože nemají pevnou buněčnou stěnu, která by je chránila před osmotickými silami, je nutné protoplasty kultivovat v hypertonickém roztoku. V hypotonickém roztoku (např. vodě) by popraskaly.



Sféroplasty: buněčná stěna nebyla u těchto buněk dostatečně odstraněna. Následkem toho se buňky sice uvolnily z mezofylového pletiva, buněčná stěna však stále určuje tvar buněk.



PRIMÁRNÍ A SEKUNDÁRNÍ BUNĚČNÁ STĚNA



Úvod:

O vnitřní struktuře jehlice smrku a borovice:

Povrch jehlice kryje jednovrstevná pokožka. Pokožkové buňky mají sekundární buněčnou stěnu - výrazná je hlavně u borovice. Na povrchu pokožkových buněk je kutikula – vrstva kutinu a vosků, která má ochrannou funkci (viz obrázek v sekci „Doplňující informace“). Na některých příčných řezech jehlicemi lze pozorovat průduchy – stomata. Jsou tvořeny dvěma svěracími buňkami a pod nimi v mezofylu se nachází rozlehlý mezibuněčný prostor, tzv. podprůduchová dutina.

Pod pokožkou se nachází vrstva hypodermis – slouží jako mechanická opora jehlice. Hypodermis je výrazná hlavně u smrku, kde lze pozorovat vrstevnatost sekundární buněčné stěny (viz obrázek v sekci „Příklady pozorování a vysvětlivky“). V některých oblastech hypodermis smrku jsou znatelné ztenčeniny buněčné stěny nad políčky plazmodesmat.

Většinu objemu jehlice vyplňuje fotosyntetické pletivo tvořené tenkostěnnými laločnatými buňkami – mezofyl. Mezofylové buňky mají pouze stěnu primární (Detail mezofylové buňky, v sekci „Příklady pozorování a vysvětlivky“).

Pro jehlice jsou charakteristické pryskyřičné kanálky – u smrku bývají vidět na příčném řezu 1-2, u borovice 6-10 po obvodu mezofylu. U buněk ohraničujících pryskyřičný kanál borovice lze dobře pozorovat vrstevnatost sekundární buněčné stěny. V některých buňkách ohraničujících pryskyřičný kanál borovice jsou znatelné ztenčeniny buněčné stěny nad políčky plazmodesmat.

Středem jehlice prochází střední válec ohraničený endodermis. Ve středním válci se nachází u smrku jeden, u borovice dva cévní svazky. Cévní svazky se skládají z xylémové a floémové části, slouží pro transport vody, minerálních látek (xylém) a asimilátů (floém).

O autofluorescenci rostlinných pletiv

Některé látky přirozeně obsažené v rostlinných pletivech jsou po ozáření schopny **fluorescence** – tj. emise záření o delší vlnové délce než byla vlnová délka excitačního záření. Jednou z takových látek je pigment chlorofyl obsažený v chloroplastech zelených pletiv rostlin. Po ozáření modrým nebo UV zářením vydává chlorofyl fluorescenci v červené oblasti elektromagnetického spektra. Lignin a další fenolické látky vázané v buněčné stěně jsou také schopny autofluorescence – po ozáření UV zářením produkují fluorescenci v modrozelené oblasti spektra. Díky těmto vlastnostem rostlinných pletiv je možné některé struktury pozorovat pod fluorescenčním mikroskopem bez dodatečného barvení řezů (obrázkové plato „Doplňující informace“).

Co budete zkoumat v tomto praktiku:

Na příčných řezech jehlicemi smrku nebo borovice budete pozorovat rozdíly v tloušťce primární a sekundární buněčné stěny v různých pletivech jehlice. V buňkách hypodermis si všimnete vrstevnatého ukládání lamel sekundární buněčné stěny a ztenčenin nad políčky plazmodesmat, které propojují sousední buňky. Struktura jehlice smrku a borovice je v některých detailech odlišná a i specifika sekundární buněčné stěny lze lépe pozorovat v jiných specializovaných buňkách u jednotlivých druhů, viz tabulka.

Sledovaná struktura	Lokalizace u smrku	Lokalizace u borovice
Primární buněčná stěna	Mezofyl	Mezofyl
Vrstevnatost sekundární buněčné stěny	hypodermis	buňky ohraničující pryskyřičný kanál
Ztenčeniny buněčné stěny nad políčky plazmodesmat	hypodermis	pokožkové buňky, buňky ohraničující pryskyřičný kanál



Technické informace:

Potřeby:

Bezová duše

Žiletka

Podložní a krycí sklo

Voda

Kapátko

Štětce

Preparační jehla

Hodinové sklo nebo malá petriho miska

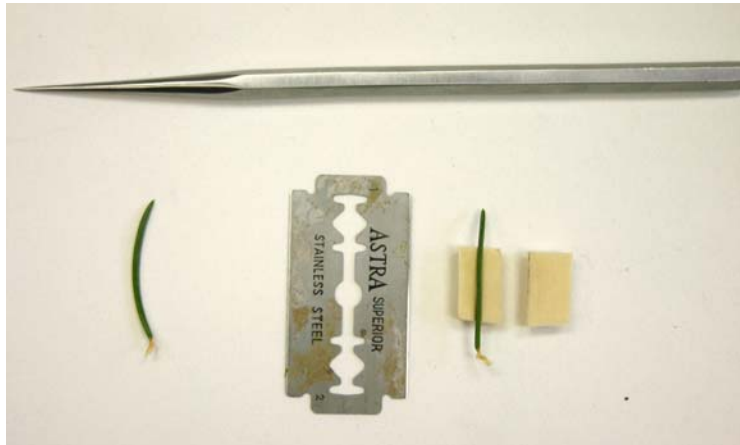
Jehlice smrku nebo borovice





Experiment:

1. Na hodinové sklo nebo malou petriho misku nakapejte vodu. Sem budete odkládat řezy, nesmí vyschnout – jehlice obsahují cca 50% vody, ztráty vody mohou narušit strukturu buněk!
2. Špalík bezové duše (cca 1,5 cm dlouhý) rozřízněte podélně napůl a preparační jehlou udělejte uprostřed vzniklé řezné plochy podélnou drážku. Bezová duše slouží jako opora při přípravě ručních řezů.



3. Do drážky v bezové duši vložte jehlici tak, aby přibližně její 1/3 přečnívala. Uzavřete jehlici mezi dvě půlky špalíku bezové duše.
4. Bezovou duši s jehlicí uchopte mezi palec a ukazovák. Při řezání ved'te řez „jedním tahem“, nikoliv pilováním, abyste co nejméně narušili vnitřní strukturu jehlice. Snažte se připravit co nejtenčí řezy jehlicí.
5. Hotové řezy ihned odkládejte do vody. Připravte si aspoň 5 řezů, ne všechny se perfektně podaří.
6. Hotové řezy umístěte do kapky vody na podložním skle a přikryjte krycím sklem.
7. Pozorujte v mikroskopu primární a sekundární buněčnou stěnu, ztenčeniny v buněčné stěně nad políčky s plazmodesmaty a vrstevnatost sekundární buněčné stěny.

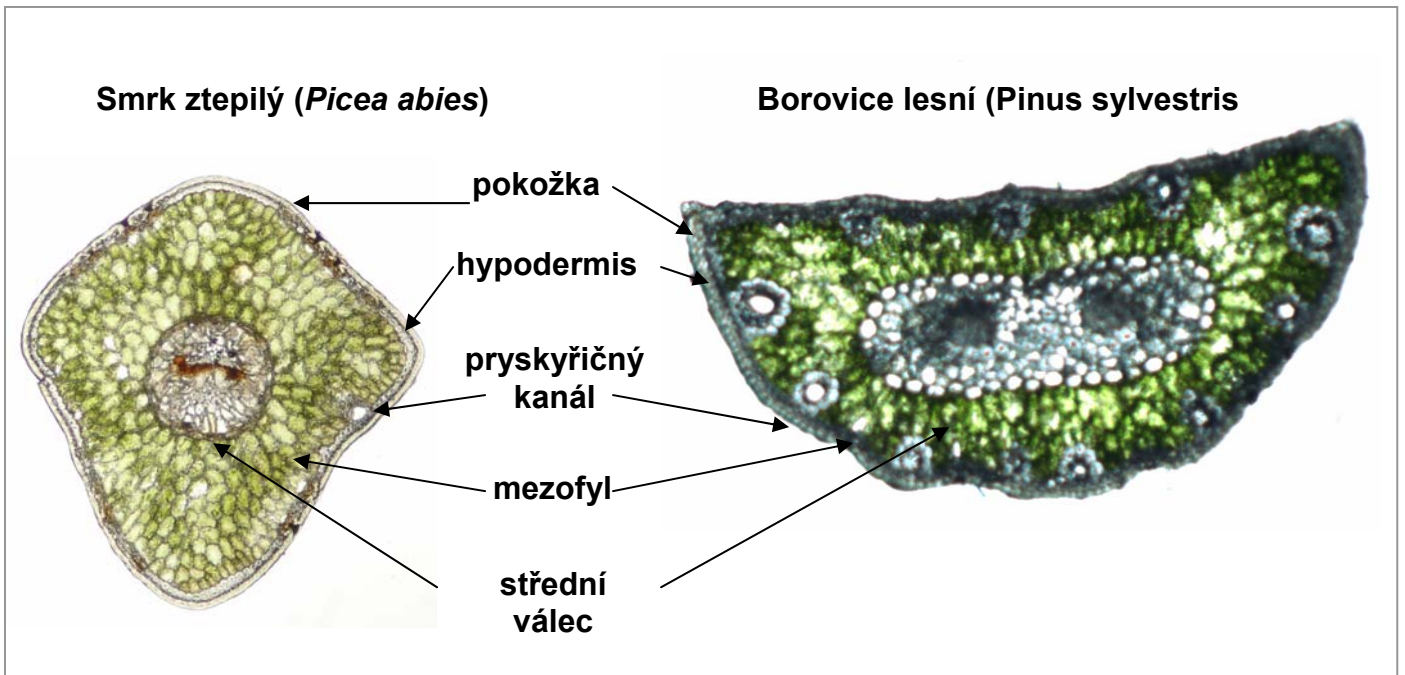


Úkol:

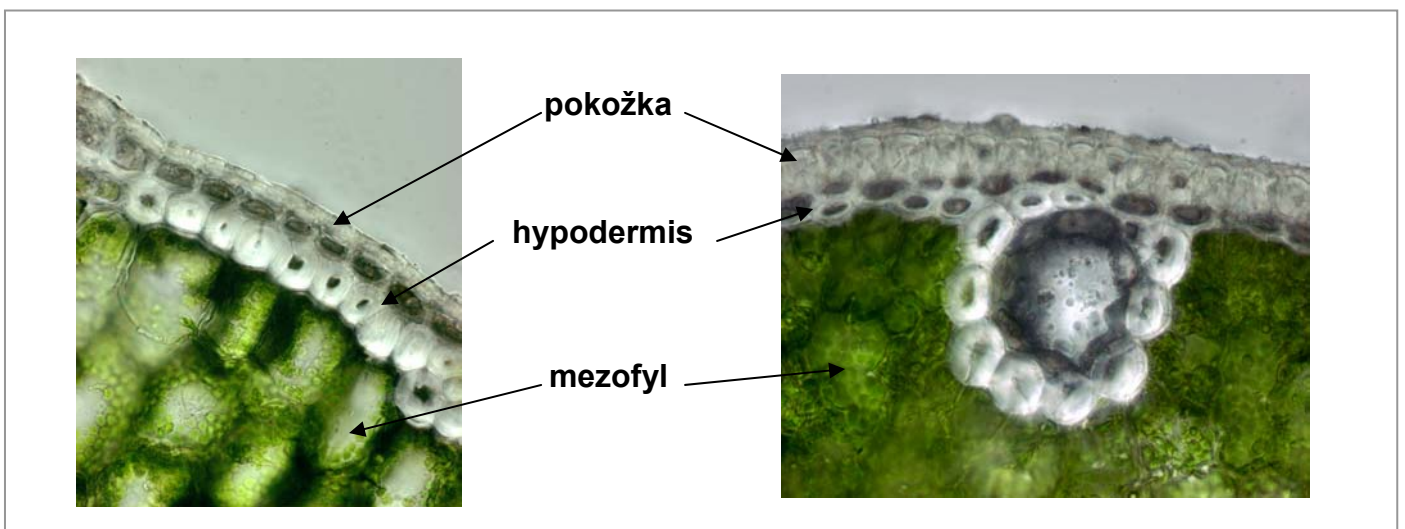
1. Vytvořte preparát z jehlice smrku nebo borovice.
2. Zakreslete buňky pokožky, hypodermis a mezofylu, případně buňky ohraničující pryskyřičný kanál.
3. Popište, kde se jedná o primární a sekundární buněčnou stěnu, vysvětlete podle čeho tak soudíte.
4. Jaký tvar by měl protoplast připravený z mezofylové buňky smrku a borovice?

Příklady pozorování a vysvětlivky:

Anatomická stavba jehlice, celkový pohled na příčný řez

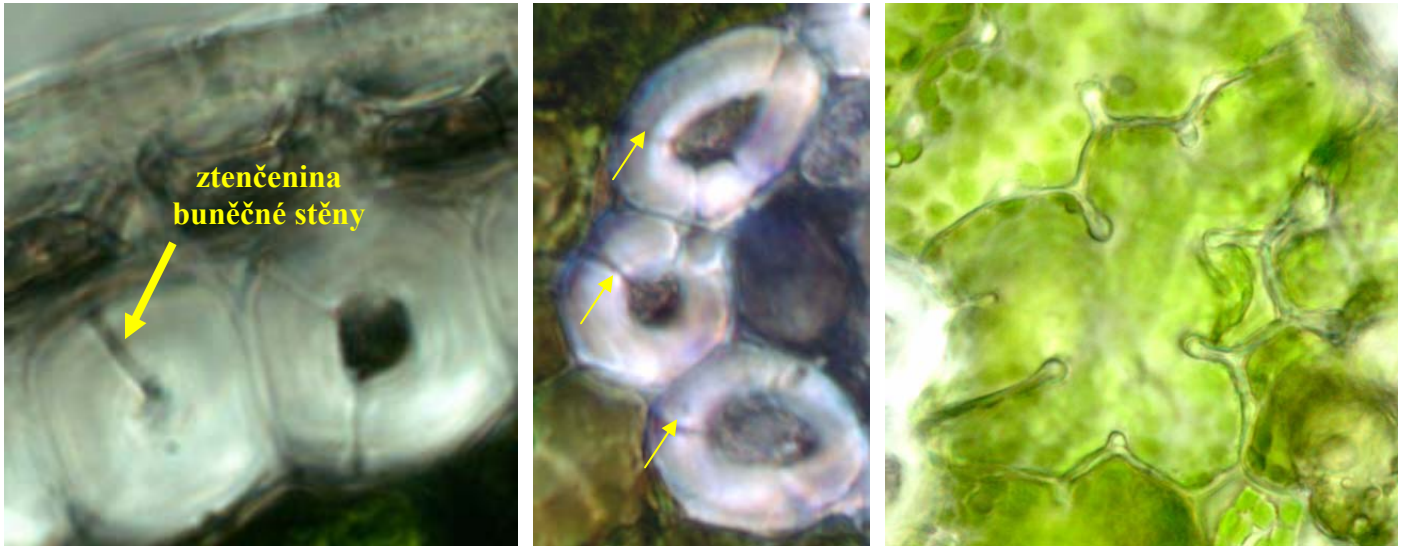


Anatomická stavba jehlice, detail krycích pletiv a mezofylu

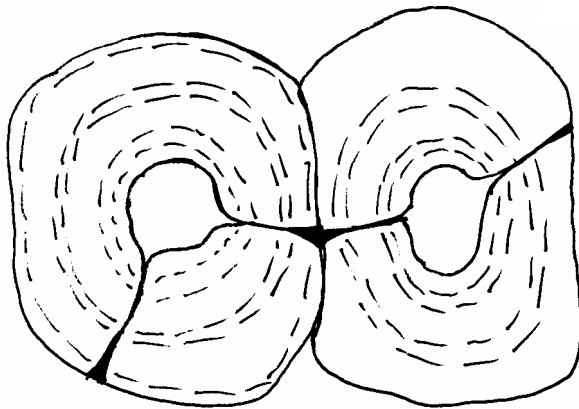


Příklady pozorování a vysvětlivky:

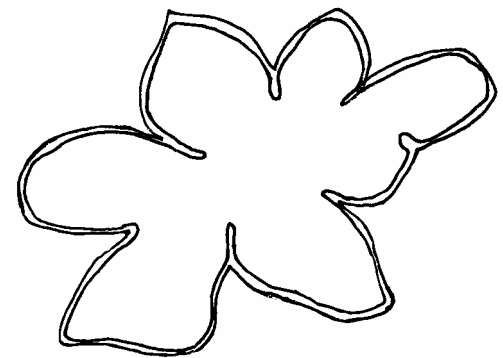
Detail sekundární buněčné stěny v hypodermis smrku a buněk ohraničujících pryskyřičný kanál borovice, mezofylová buňka borovice



**Příklady
nákresů**

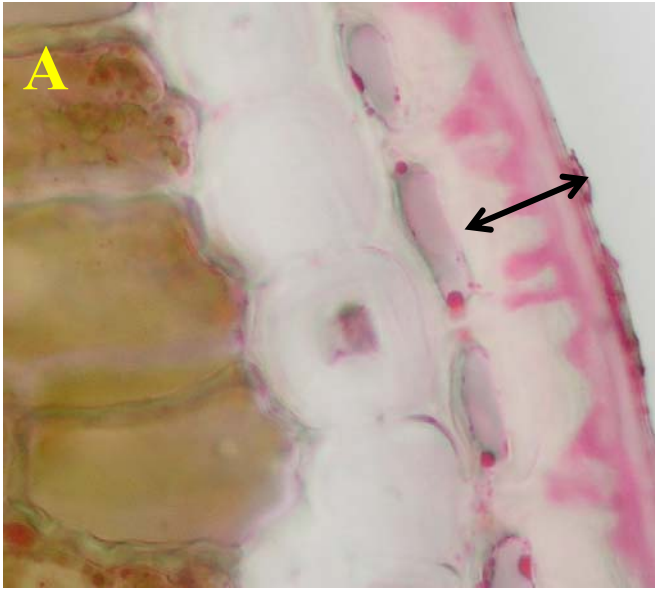


Buňky hypodermis smrku s vrstvením sekundární buněčné stěny a ztenčeninami nad políčky s plazmodesmaty.



Tenkostěnná mezofylová buňka borovice.

Doplňující informace:



A) Pokožkové buňky smrku se ztlustlými sekundárními buněčnými stěnami a kutikulou na vnější straně této stěny- vrstva je označena šipkou. Lipidické složky kutikuly jsou obarveny růžově lipofilním barvivem Sudan.

Průduchy v pokožce B) borovice, C) smrku. Žluté šipky ukazují na svěrací buňky.

* Podprůduchová dutina

Autofluorescence rostlinných pletiv vyvolaná UV zářením: červeně chlorofyl v mezofyly, modře lignin a fenolické látky vázané v buněčných stěnách. D) Příčný řez jehlicí smrku E) detail středního válce jehlice s vodivými pletivy, Xy – xylém, Flo – floém, En - endodermis

