



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

TENTO PROJEKT JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKÝM SOCIÁLNÍM FONDEM
A STÁTNÍM ROZPOČTEM ČESKÉ REPUBLIKY

Téma 03: Pozorování jaderného dělení meristematických buněk Cajal – Brožkova metoda podvojného barvení roztlakových preparátů

Pozorování jaderného dělení a karyologická studia se provádějí nejčastěji na roztlakových preparátech kořenových meristémů. K barvení buněk těchto preparátů je možno použít rozmanitá barviva, jako acetokarmín, laktopropionový orcein, azureosinát (Giemsa) nebo bazický fuchsin. Cajal-Brožkova metoda používá pro barvení chromatinu bazický fuchsin a pro dobarvení cytoplasmu pikroindigokarmín. Výsledkem jsou cyklámenově fialové jaderné struktury a modrošedá cytoplazma. Pro pozorování jednotlivých chromozomů je nutné poškození mikrotubulů achromatického vřeténka. Úkolem cvičení je připravit roztlakové preparáty kořenových meristémů a porovnat struktury buněk po 3 hodinovém předpůsobení mitotickým jedem 8–hydroxichinolin.

Materiál: narašené cibule lilie (*Lilium* hybr.), cibule kuchyňské (*Allium cepa* L.) a česneku (*Allium christophii* TRAUTV., 0,2 M 8–hydroxichinolin, Carnoyova fixáž, macerační směs konc. HCl: ethanol 1:1.

Vzorky: 1. lilie, 2. cibule, 3. česnek – kořeny vložené do 0,2M roztoku 8–hydroxichinolinu po dobu 3 hodiny
4. lilie, 5. cibule, 6. česnek – kontroly nakličované pouze ve vodě

Postup:

1. **Předpůsobení kořenů:** vložení narašených kořenů do 0,2M roztoku 8–hydroxichinolinu po dobu 3 hod. při laboratorní teplotě, kontrolní kořeny zůstávají ve vodě.
2. **Fixace:** odebrané segmenty kořenů fixujeme 1 hod. v Carnoyově fixáži, složení Carnoyovy fixáže: 70% ethanol 60ml, chloroform 30ml, led. kys. octová 10ml.
3. **Oplachování** v 70% etanolu: 2 x 15 minut
4. **Macerace:** ponoření kořinek na několik minut do směsi HCl : ethanol 1:1, vhodnou dobu nutno otestovat pro každý materiál.
5. **Roztlačení** kořenové špičky na podložním skle s chromovou želatinou pomocí navhčeného celofánu.
6. Po zaschnutí sejmutí celofánu
7. **Barvení** jaderných struktur v nasyceném vodném roztoku **bazického fuchsinu** po dobu 15 minut.
8. **Oplach** destilovanou vodou

9. **Dobarvení cytoplazmy** pikroindigokarmínem po dobu 1 - 15 minut. (100 ml nasyceného roztoku indigokarmínu + 50 ml nasyceného roztoku kyseliny pikrové).
10. **Oplach** v 70% etanolu.
11. **Rychlé odvodnění:** 75%, 96%, 100%, 100% etanol **po 2 minutách v každé lázni**
12. **Převádění do xylenu** ve směsích: 100% EtOH : xylen = 2:1, 1:1, 1:2, xylen, po 2 minutách.
13. Uzavření do syntetické pryskyřice Eukitt®

Hodnocení:

Po zatuhnutí pryskyřice hodnotíme kvalitu roztlaku, zachování struktury buněk, vybarvení jednotlivých struktur a účinnost předpůsobení kořenů mitotickým jedem.

Pokud je možné, spočítáme chromozomy u jednotlivých taxonů.

Provedeme fotografickou dokumentaci preparátů.

Literatura:

Hrubý K.(1933): Double Staining by the Cajal-Brožek Method. – Science 77:352 –353.