



## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

### Téma 04: Životaschopnost (vitalita) pylu a metody její detekce

Životaschopnost pylu je jedním z hlavních faktorů, které rozhodují o úspěšnosti oplození. Byla popsána řada metod, které testují životaschopnost pylu **přímo** = klíčení pylu *in vitro* na umělých médiích nebo **nepřímo** = barvením pylových zrn. Důležitými faktory klíčivosti pylu je kromě složení média teplota, pH, relativní vlhkost vzduchu, zralost pylu i hustota suspenze.

Histologické barvení pylových zrn může vitalitu pylu nadhodnocovat, přesnější bývají histochemické metody detekující aktivitu hydrolytických enzymů (esterázy – substrát fluorescein diacetát FDA) nebo oxidačně-redukčních enzymů (dehydrogenázy – substrát trifenylnitroimidazolium chlorid TTC, který váže vodík uvolněný dehydrogenázami za tvorby červeného reakčního produktu formazanu).

Materiál: pylová zrna lilie (*Lilium* hybr.), brambořiku (*Cyclamen persicum* MILL.), fuchsie (*Fuchsia magellanica* Lam.) apod.

**Brewbaker – Kwackovo médium** pro klíčení pylových zrn (Brewbaker *et* Kwack 1964):

100 ml 10% sacharosy	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10mg
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	30mg
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	20mg
KNO <sub>3</sub>	10mg

**Alexandrova barvicí směs** pro diferenciální barvení pylu (Alexander 1969)

95% ethanol	10 ml
malachitová zeleň	10 mg
destilovaná voda	50 ml
glycerol	25 ml
fenol	5 g
chloralhydrát	5 g
kyselý fuchsin	50 mg
oranž G	5 mg
ledová kys. octová	1 - 4 ml

#### **Fluorescein diacetát**

2 mg ve 100ml acetonu

## A. Testování klíčivosti pylu *in vitro*

### Postup:

1. Na podložní sklo nanese se kapku Brewbaker – Kwackova média, do které naprášíme pylová zrna.
2. Inkubaci provádíme ve vlhké komůrce metodou stojící nebo visící kapky.
3. Po 30 min. intervalech kontrolujeme četnost klíčících pylových zrn a délku pylových láček.

### Hodnocení:

Vyhodnotíme rychlost klíčení pylu a četnost klíčících pylových zrn u předložených vzorků.

## B. Diferenciální barvení pylu

### Postup I.:

1. Na podložní sklo nakápneme několik kapek Alexanderovy barvicí směsi.
2. Do kapky barviva naprášíme pylová zrna a přikryjeme krycím sklem.
3. Po několika minutách vyhodnotíme zbarvení pylových zrn.

**Poznámka:** Vzhledem k tomu, že chloralhydrát a fenol jsou na seznamu nebezpečných chemických látek a vyžadují speciální bezpečnostní zacházení i likvidaci odpadu, testovali Peterson *et. al.* (2010) použití barvicí směsi s vynecháním těchto látek a zjistili, že výsledky jsou víceméně srovnatelné s původní metodou Alexandra. Ke zlepšení penetrace barviva autoři navrhuji použití Carnoyovy fixáže a zahřátí preparátu při barvení.

### **Upravená barvicí směs bez toxických látek (Peterson *et al.* 2010)**

95% ethanol	10 ml
malachitová zeleň	
destilovaná voda	50 ml
glycerol	25 ml
kyselý fuchsin	
oranž G	0,5 ml 1% vodného roztoku
ledová kys. octová	4 ml
+ destilovaná voda	4,5 ml = celkový objem směsi 100 ml

### Postup II.: (Peterson *et al.* 2010):

1. Fixace poutat nebo izolovaných prašníků v Carnoyově fixační směsi alespoň 2 hod. Ve fixáži je možno skladovat materiál až 12 měsíců.
2. Umístění prašníku na podložní sklo a odsátí fixáže.
3. Přidání 2 – 4 kapek barvicí směsi.
4. Zahřátí skla protažením nad plamenem kahanu téměř k varu – zlepšuje se penetrace barviva dovnitř pylových zrn.

5. Přikrytí krycím sklem a jeho jemné přitlačení zajistí srovnání pylových zrn do jedné roviny.

Výsledek:

Dobře vyvinutá pylová zrna jsou zbarvena červeně, abortovaná pylová zrna jsou zelená.

Hodnocení:

Zjistíme poměr vyvinutých a abortovaných pylových zrn.

### **C. Hodnocení vitality pylu nebo buněčné suspenze detekcí aktivity esteráz**

Postup:

1. Na podložní sklo kápneme kapku roztoku fluorescein diacetátu v acetonu a necháme uschnout.
2. Přikápneme kapku pylové suspenze v médiu Brewbaker *et* Kwack (1964).
3. Přikryjeme krycím sklem a po 15 minutách pozorujeme ve fluorescenčním mikroskopu v modrém světle.

Výsledek: Životoschopná pylová zrna s aktivními esterázami vykazují žluto-zelenou fluorescenci.

Hodnocení: Srovnáním obrazu v procházejícím světle a ve fluorescenci vyhodnotíme poměr životoschopných pylových zrn.

### **Literatura:**

- Alexander M. P. (1969): Differential staining of aborted and nonaborted pollen. - *Stain Technol.*, 44: 117-22.
- Brewbaker J. L. and Kwack B. H. (1964): The Calcium Ion and Substances Influencing Pollen Growth. In: "Pollen Physiology and Fertilization", Linskens, H. F. (Ed.). North Holland, Amsterdam, pp. 143–151.
- Peterson R., Slovin J.P., Chen Ch. (2010): A simplified method for differential staining of aborted and non-aborted pollen grains. - *International J. Plant Biol.* 2010; 1:e13 doi:10.4081/pb.2010.e13