



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 cytoplasmy pikroindigokarmín. Výsledkem jsou cyklámenově fialové jaderné struktury a modrošedá cytoplazma. Pro pozorování jednotlivých chromozomů je nutné poškození mikrotubulů achromatického vřetenka. Úkolem cvičení je připravit roztlakové preparáty kořenových meristémů a porovnat struktury buněk po 3 hodinovém předpůsobení mitotickým jedem 8-hydroxichinolin.

Materiál: narašené cibule kuchyňské (*Allium cepa* L.), kořeny a kalusy z kultury *in vitro*, 0,2 M 8-hydroxichinolin, Carnoyova fixáž, macerační směs konc. HCl: ethanol 1:1.

- Vzorky:
1. cibule – kořeny vložené do 0,2M roztoku 8-hydroxichinolinu přes noc
 2. kalus zběhovce (*Ajuga reptans* L.) - vložený do 0,2M roztoku 8-hydroxichinolinu
 3. kalus mrkve (*Daucus carota* L.) - vložený do 0,2M roztoku 8-hydroxichinolinu
 4. hledík (*Antirrhinum majus* L.) - kořeny vložené do 0,2M roztoku 8-hydroxichinolinu přes noc
 5. rajče (*Solanum lycopersicum* L.) - kořeny vložené do 0,2M roztoku 8-hydroxichinolinu přes noc
 6. cibule – kontrola – kořeny nakličované pouze ve vodě
 7. kalus zběhovce (*Ajuga reptans* L.) – kontrola
 8. kalus mrkve (*Daucus carota* L.) - kontrola
 9. hledík (*Antirrhinum majus* L.) - kontrola
 10. rajče (*Solanum lycopersicum* L.) - kontrola

Postup:

1. **Předpůsobení vzorků:** vložení narašených kořenů nebo částí kalusu do 0,2M roztoku 8-hydroxichinolinu přes noc při laboratorní teplotě, kontrolní kořeny zůstávají ve vodě.
2. **Fixace:** odebrané vzorky fixujeme 1 hod. v Carnoyově fixáži, složení Carnoyovy fixáže: 70% etanol 60ml, chloroform 30ml, led. kys. octová 10ml.
3. **Oplachování** v 70% etanolu: 2 x 15 minut
4. **Macerace:** ponoření kořínků na několik minut do směsi HCl : etanol 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 roztoku, zachování struktury buněk, vybarvení jednotlivých struktur a účinnost předpůsobení buněk mitotickým jedem.

Pokud je možné, spočítáme chromozomy u jednotlivých taxonů.

Po zaschnutí uzavíracího média provedeme fotografickou dokumentaci preparátů.

Literatura:

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