



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Téma 04: Studium stavby zárodečného vaku metodou projasňování

Pro rychlé hodnocení vývoje zárodečného vaku se v rostlinné embryologii často používají místo klasických histologických postupů příprav řezových preparátů různé varianty projasňovacích metod, při kterých se prosvětlí obsah buněk a následně je možné prohlížet vajíčka nebo mladá semena pomocí optických řezů. Součástí projasňovacích médií je často chloralhydrát, fenol a kyselina mléčná (Hoyerovo médium, Herr 1971, Braune *et al.* 1982, Lux *et al.* 2005).

Materiál: květenství kokošky pastuší tobolky (*Capsella bursa-pastoris* L.)

Carnoyova fixáž

Hoyerovo projasňovací a uzavírací médium

destilovaná voda	25 ml
arabská guma	15 g
chloralhydrát	100 g
glycerol	8 ml

Projasňovací a uzavírací médium (Lux *et al.* 2005)
nasyčený roztok chloralhydrátu v kyselině mléčné

A. Pozorování stavby zárodečného vaku kokošky po projasnění chloralhydrátem a kyselinou mléčnou podle autorů Lux *et al.* (2005)

Postup:

1. Fixace vrcholů květenství kokošky pastuší tobolky v Carnoyově fixáži 30 minut až několik hodin.
2. Krátký oplach materiálu v 50% ethanolu.
3. Projasňování v nasyceném roztoku chloralhydrátu v kyselině mléčné v nádobce při laboratorní teplotě.
4. Preparace vajíček v kapce projasňovacího média na podložním skle.
5. Uzavření krycím sklem a pozorování v mikroskopu v procházejícím světle nebo v Nomarského diferenciálním interferenčním kontrastu.

Výsledek:

Projasněná vajíčka a mladá semena jsou průhledná a je možné prohlížet tzv. optické řezy.

B. Pozorování stavby zárodečného vaku kokošky po projasnění v Hoyerově směsi

Příprava Hoyerovy směsi:

1. rozpustit arabskou gumu v destilované vodě (24 hod)
2. ve směsi rozpustit chloralhydrát (24 hod)
3. přidat glycerol a promíchat
4. pokud je směs příliš hustá, přidat destilovanou vodu

Postup :

1. Fixovaný materiál převést v sestupné etanolové řadě do destilované vody.
2. Projasnit postupně v Hoyerově médiu v několika krocích
 - a) Hoyerovo médium : voda 1 : 3 30 minut
 - b) Hoyerovo médium : voda 2 : 2 30 minut
 - c) Hoyerovo médium : voda 3 : 1 30 minut
 - d) Hoyerovo médium čisté
3. Uzavřít vajíčka nebo mladá semena krycím sklem a pozorovat ve fázovém kontrastu nebo interferenčním mikroskopu.

Výsledek:

Zaostřováním na roviny optických řezů lze sledovat různá vývojová stadia zárodečného vaku a integumentů ve vajíčkách různého stáří, eventuálně rané vývojové fáze endospermu po oplození.

Hodnocení:

Srovnáme a vyhodnotíme výsledky obou postupů projasňování.

Poznámka:

Chloralhydrát a fenol jsou látky na seznamu nebezpečných chemických látek a vyžadují speciální zacházení i likvidaci odpadu podle bezpečnostních pravidel.

Literatura:

1. Braune W., Leman, A., Taubert H. Pflanzenanatomisches Praktikum II. 2. vyd. Jena: VEB Gustav Fischer Verlag, 1982. 426 s. ISBN 261 700-36-82.
2. Herr, J. M., Jr. (1971): A New Clearing-Squash Technique for the Study of Ovule Development in Angiosperms. – Amer. J. Bot. 58/ 8 : 785-790.
3. Lux A., Morita S., Abe J. et Ito K. (2005): An Improved Method for Clearing and Staining Free-hand Sections and Whole-mount Samples. – Ann. Bot. 96: 989 – 996.