



## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

### Téma 05: 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.

Materiál: pylová zrna tabáku křídlatého (*Nicotina alata* Link et Otto), fuchsie (*Fuchsia magellanica* Lam.), kany indické (*Canna indica* L.), chrysanthémy (*Chrysanthemum* hybr.), bramboříku (*Cyclamen persicum* MILL.), poděňka (*Tradescantia pallida* (Rose) D.R.Hunt, syn *Setcreasea purpurea* Boom).

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

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

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

95% ethanol	10 ml	
malachitová zeleň	10 mg	(1)
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	

#### A. Testování klíčivosti pylu *in vitro*

##### Postup:

1. Na podložní sklo nanese 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 (Alexander 1969). 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	10 mg	
destilovaná voda	50 ml	
glycerol	25 ml	
kyselý fuchsin	50 mg	(5 ml 1% vodného roztoku)
oranž G	5 mg	(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 pupat 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:

Srovnáme barvení pylu oběma metodami a zjistíme poměr vyvinutých a abortovaných 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