



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Téma 06: Struktura pestíků a prašníků lilie C. Barvení parafinových řezů

Parafinové řezy nalepené na podložních sklech napřed odparafinujeme v xylyenu. Pro účinnější rozpuštění parafinu je vhodné před vložením do xylyenu skla zahřát na ploténce. Podle způsobu barvení se řezy rehydratují do příslušné koncentrace ethanolu nebo až do vody. Po nabarvení se řezy opět odvodňují, převádějí do xylyenu a uzavírají do média nemísitelného s vodou, kterým je buď pryskyřice přírodní (kanadský balzám) nebo syntetická.

Pro přenášení podložních skel s řezy v jednotlivých lázních barvicího procesu se nejlépe osvědčují Hellendalovy skleněné kyvety, které jsou vyšší než podložní sklo a dvě protilehlé vnitřní strany mají opatřeny drážkami, do kterých se jednotlivá skla zasouvají vertikálně. Kyvety naplňujeme uvedenými roztoky tak, aby byla celá skla ponořená.

Materiál: podložní skla s nalepenými parafinovými řezy, Hellendalovy skleněné kyvety, ethanolová řada, 1% alcianová modř v 1% kyselině octové, 0,1% jaderná červeň stálá v 5% roztoku $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ (Kernechtrot, nuclear fast red = **antrachinonové barvivo C.I. No 60760**).

Příprava 0,1% barvicího laku jaderné červeni

1. Připravíme 5% roztok $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ (10 g síranu do 190 ml destilované vody)
2. Rozpustíme barvivo jaderná červeň stálá (0,2 g barviva ve 200 g roztoku síranu)
3. Směs zahříváme na vodní lázni na 80°C , aby se vytvořil hlinitý komplex a po vychladnutí ji filtrujeme.

Doba trvanlivosti barviva je několik měsíců. Lze ji prodloužit opakovaným zahřátím před každým použitím. Před barvením roztok vždy filtrujeme.

Postup barvení parafinových řezů podvojnou metodou: alcianová modř a pravá jaderná červeň (Beneš a Kamínek 1973)

1. Parafin z řezů rozpustíme v xylyenu (alespoň 2 lázně).
2. Sestupnou etanolovou řadou převedeme řezy do destilované vody.
3. Řezy okyselíme v 3% roztoku kyseliny octové po dobu 10 min.
4. Řezy barvíme v 1% alcianové modři v 1% kyselině octové po dobu 10 minut.
5. Řezy krátce opláchneme v 3% kyselině octové a necháme propírat pod tekoucí vodovodní vodou po dobu 10 min.
6. Následně se řezy barví v 0,1% jaderné červeni stálé v 5% roztoku $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ po dobu 5 - 15 minut.

7. Řezy dobře promyjeme v destilované vodě (2 – 3 lázně), odvodníme ve stoupající etanolové řadě a převedeme do xylenu.
8. Očistíme krycí skla a řezy uzavřeme do syntetické pryskyřice Eukitt®.

Hodnocení:

Po zatuhnutí uzavíracího média hodnotíme kvalitu vlastních řezů, způsob a intenzitu vybarvení struktur.

Na obarvených preparátech pak studujeme vývoj prašníků a gyneceí lilie. Pokusíme se zjistit vývojové stadium pylu a vajíčka.

Výsledky dokumentujeme kresbou s popisem a mikrofotografií.

Poznámka:

Jméno „Kernechtrot“ se používají různé firmy pro různá barviva (Miller a Chytil 1966).

Kernechtrot fy Fluka = antrachinonové barvivo C.I. No 60760

Kernechtrot-Herzberg (Nuclear fast red-Herzberg) fy E. Gurr je barvivo podobné neutrální červení, ale struktura není známá

Kernechtrot (Nuclear fast red) fy Dajac = diazo sůl

Kernechtrot (Nuclear fast red) for calcium fy E.Gurr (Michrome No 1022) = struktura není známá

Kernechtrotsaltz B (Nuclear Fast Red B) - diazo sůl C.I. No 37125

Kernechtrotsaltz R (Nuclear Fast Red R) - diazo sůl C.I. No 37130

Pouze antrachinonové barvivo tvoří chelát s hlinitou solí a je vhodné pro tento barvicí postup.

Literatura:

1. Beneš, K., Kamínek, M. (1973): The use of aluminium lake of nuclear fast red in plant material successively with alcian blue. *Biologia Plantarum*, 15 (4): 294 – 297.
2. Green, F.J. 1990. *The Sigma-Aldrich Handbook of Stains, Dyes and Indicators*. Aldrich Chemical Company, Milwaukee.
3. Kiernan, J. (1981): *Histological and histochemical methods: Theory and practise*. 1st Ed. Oxford: Pergamon Press, 344 p.
4. Lillie, R.D. 1977. *H.J. Conn's Biological Stains*, 9th Ed. Williams & Wilkins, Baltimore.
5. Lux, A., Erdelská, O. (1998): *Praktikum z anatomie a embryologie rostlin*. Bratislava : Univerzita Komenského, 135 s.
6. Miller J. a Chytil F. (1966) : *Barviva v mikroskopické technice*, Academia Praha, 376 s.
7. Pazourková, Z. (1982): *Botanická mikrotechnika*. 1. vyd. Praha: Univerzita Karlova, 166 s.
8. Sheenan, D.C., B.B. Hrapchak. *Theory and practice of histotechnology*, 2nd Ed. Battelle Press, Columbus. pp. 172-173.

<http://kfrserver.natur.cuni.cz/cz/edu/mikro/prep/tprep.htm>