



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Jméno:

Datum:

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.

Materiál: květy tabáku (*Nicotina glauca* L.), tradeskancie (*Tradescantia pallida* (Rose) D.R.Hunt, syn. *Setcreasea purpurea* Rose), fuchsie (*Fuchsia magellanica*), pupalky missourské (*Oenothera missouriensis* SIMS.), rudbekie (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) apod.

suchý pyl dýně (*Cucurbita pepo* L.), lilie (*Lilium* hybr.), borovice (*Pinus sylvestris* L.), apod.

médium pro klíčení pylových zrn (Brewbaker *et* Kwack 1964): 100 ml

10% sacharosa	10 g
H ₃ BO ₃	10 mg
Ca(NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O	30 mg
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	20 mg
KNO ₃	10 mg

médium pro klíčení pylových zrn (Boavida *et* McCormick 2007): 100 ml

10% sacharosa	10 g	
H ₃ BO ₃	10 mg	(1,6 mM)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	73,5 mg	(5 mM)
MgSO ₄ ·7H ₂ O	24,6 mg	(1 mM)
KCl	37,2 mg	(5 mM)
1.5% low-melting agarose	1,5 g	pH 7,5

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	(0,5 ml 1% vodného rozt)
ledová kys. octová	1 - 4 ml	

A. 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 1 : 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	
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 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:

Zjistíme poměr vyvinutých a abortovaných pylových zrn.

Poznámka 2: Histologické barvení pylových zrn může vitalitu pylu nadhodnocovat, přesnější bývají histochemické metody detekující aktivitu proteinů, např. hydrolytických enzymů (pro esterázy je substrátem fluorescein diacetát, FDA) nebo oxidačně-redukčních enzymů (pro dehydrogenázy je substrátem trifenyltetrazolium chlorid, TTC, který váže vodík uvolněný dehydrogenázami za tvorby červeného reakčního produktu formazanu).

B. Testování klíčivosti pylu *in vitro*

I. Postup:

1. Na podložní sklo nanese kapku média (Brewbaker and Kwack 1964), do které naprášíme testovaná 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.

II. Postup:

1. Vytvořit rámeček pomocí PAP pera.
2. Rozehřáté inkubační médium s agarosou nebo agarem (Boavida *et* McCormick 2007) napipetovat na podložní sklo, na jedno sklo mělo by stačit 500 – 750 μ l.
3. Nechat zatuhnout médium v polštářek.
4. Naprášit pyl na povrch média (nebo vytřepat pyl z otevřených květů do média bez agarosy v 1 ml mikrozkuřavce, po krátké jemné centrifugaci nebo sedimentaci, odpipetování pylového peletu a přenesení na polštářek - "výsev" pylu je tak mnohem rovnoměrnější a celková klíčivost se více blíží skutečnosti - při nepravidelném chomáčovitým výsevu více klíčí zrna ve skupinách než samostatně).
5. Vložení skla do vlhké komůrky (uzavíratelná plastová nebo skleněná krabička vypodložená mokřým filtračním papírem) na špejle, aby voda nevzlínala na polštářek.
6. Inkubace v termostatu na 25°, **kultivace ve tmě, ON**.

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.
- Boavida, L.C. and McCormick, S. (2007): Temperature as a determinant factor for increased and reproducible *in vitro* pollen germination in *Arabidopsis thaliana*. - *Plant J.* 52: 570-582.
- 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
- Williams J. H. (2012): The evolution of pollen germination timing in flowering plants: *Austrobaileya scandens* (*Austrobaileyaceae*). - *AoB PLANTS* 2012: pls010; doi:10.1093/aobpla/pls010, available online at www.aobplants.oxfordjournals.org