



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Pokus 302. (říjen 2011)

Struktura pestíků lilie

Botanická mikrotechnika – histologická technika parafinových řezů

Materiál: řezaná květenství rostliny – asijský hybrid

foto květů:



Odběr vzorků semeníků:

302. 8. segmenty semeníku z pestíku, jehož **blizna byla opylená** pylem z květu jiné rostliny (odběr 4 dny po opylení)
302. 9. segmenty semeníku z pestíku, jehož **blizna nebyla neopylená**
302. 10. segmenty semeníku z pestíku, jehož **blizna byla opylená** pylem stejného květu (idiogamie) (odběr 15 hodin po opylení)
302. 11. segmenty semeníku z pestíku, **jehož blizna byla opylená** pylem stejného květu (idiogamie) (odběr 15 hodin po opylení)
302. 12. segmenty semeníku z pestíku staršího květu, jehož **blizna nebyla ručně opylená**
302. 13. segmenty semeníku z pestíku staršího květu, jehož **blizna nebyla ručně opylená**

FIXACE: (Navašinoва chróm – octovo - formaldehydová směs)

od 9.11.2011 12.30 hod. do 10.11.2011 11.00 = doba fixace **22,5 hod**

OPLACH FIXÁŽE: praní v tekoucí vodě:

od 10.11.2011 11.00 do 11.11.2011 13.30 = celková doba **26,5 hod**

DEHYDRATAČE – butanolová řada

11.11.2011 – 15.12.2011 (Ing. J. Rotkovská)

19.12.2011 začátek prosycování parafínem (**Paraplast Plus®**, teplota tání 56°C)

postupná výměna směsi parafínu s butanolem za čistý parafín a zhotovení bločků:

vylítí tekutého parafínu s objekty do papírové krabičky, orientace objektů zahřátou jehlou, vychlazení ve studené vodní lázni. Po dostatečném utužení parafínu vyjímáme bločky z vody a po jejich usušení je vyjmeme z papírové krabičky a uložíme do obalu, aby byly chráněny před prachem.

Výsledek: Získáme tak bločky parafínu, ve kterých jsou v řadách orientovány jednotlivé objekty.

Mikrotom Reichert, podložní skla potažená tenkou lepící vrstvou chromové želatiny, žiletka, štětce, tužka s diamantovým hrotem, nahřívací ploténka.

Příprava chromové želatiny (Pappas 1971)

100 ml destilované vody

0,5 g želatiny

0,05 g síranu chromito-draselného

1. V odlitém malém množství vody rozpustit kamenec (bude se přidávat až do rozpuštěné želatiny).
2. Želatinu nechat nejdříve nabobtnat, pak mírně nahřát na vodní lázni (nesmí vařit) a rozpustit
3. Rozpuštěnou želatinu smíchat s roztokem kamence.
4. Po vychladnutí filtrovat přes filtrační papír Whatman1.
5. Vychladlým roztokem protáhnout **dokonale odmaštěná** podložní skla, vytvoří se rovnoměrný tenký povlak želatiny. Při nedokonalém odmaštění podložních skel nedochází k adhezi želatiny na povrch skel.
6. Skla se vysušit ve svislé poloze a uložit na bezprašném místě. Mohou se i nějakou dobu skladovat (pro delší skladování je vhodnější uchování v ledničce).

Poznámka:

Roztok chromové želatiny je možno skladovat při 5°C 48 hodin.

Později již není vhodné směs používat.

Postup krájení parafínových řezů:

1. Parafínový blok s orientovanými segmenty vzorků rozdělíme naříznutím žiletkou a rozlomením napřed na pruhy s jednou řadou vzorků a následně oddělíme stejným způsobem parafínový bloček s jedním objektem.
2. Pomocí zahřátého skalpelu přitavíme parafínový bloček na dřevěný špalíček, který upevníme do svěráku Neapolské svorky sáňkového mikrotomu Reichert vybaveného

držákem mikrotomových čepelí. V případě potřeby mažeme sánky mikrotomu parafínovým olejem, aby byl pohyb bloku s nožem hladký.

3. Žiletkou seřízneme (trimujeme) parafínový bloček do tvaru komolé pyramidy tak, aby vrstva parafínu kolem objektu byla přiměřená a hrany souběžné s ostřím nože mikrotomu byly rovnoběžné (parafínová páska pak bude rovná).
4. Nastavíme pozici Neapolské svorky tak, abychom získali příčné řezy objektem.
5. Nastavíme požadovanou tloušťku řezů a vhodný sklon nože.
6. Opakovaným pohybem sáněk mikrotomu s držákem mikrotomových čepelí krájíme jednotlivé řezy požadované tloušťky, které se spojují v tzv. pásku.
7. Pásku přenášíme pomocí navlhčených štětců (pozor na ostří nože mikrotomu) na tmavou podložku, kde je krájíme podle velikosti plánovaného krycího skla. Musíme počítat s tím, že páska se po nažehlení vyrovná a prodlouží. Při přenosu pásky sledujeme pořadí řezů, klademe je na sklo zleva doprava. Spodní strana řezů je lesklá.
8. Segmenty parafínové pásky přenášíme na vodní hladinu na podložním skle potaženém chromovou želatinou.
9. Na vyhřáté ploténce se voda zahřeje a parafínová páska se vyrovná. Po usušení vody jsou řezy pevně přilepené na podložním skle a je možné s nimi manipulovat v kyvetách při procesu barvení řezů. Nakrájené a vysušené řezy je možné před barvením skladovat i delší dobu v suchém a bezprašném místě.
10. Před barvením jsou řezy odparafínovány ve 100% xylénu (2x: 1 hodina + přes noc). Poté jsou řezy hydratovány v sestupné ethanolové řadě (buď až do vody nebo do koncentrace ethanolu, která odpovídá koncentraci roztoku rozpuštěné barvičky).

Literatura:

1. Kiernan, J. (1981): Histological and histochemical methods: Theory and practise. 1.Ed. Oxford: Pergamon Press, 344 s.
2. Lux, A., Erdelská, O. (1998): Praktikum z anatomie a embryologie rostlin. Bratislava : Univerzita Komenského, 135 s. ISBN 80-223-1229-0.
3. Pazourková, Z. (1982): Botanická mikrotechnika. 1. vyd. Praha: Univerzita Karlova, 166 s.
4. Pappas, P.W. (1971): The use of chrome alum-gelatin (subbing) solution as a general adhesive for paraffin sections. Stain Technol., 46: 121-124.

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