Rostlinná embryologie 2022

**Barvení preparátů – ruční a parafínové řezy**

**Barviva**:

*Toluidinová modř* (1 % roztok v destilované vodě – 1 g/100 ml)

*Safranin O* (0.5% (w/v) roztok v 50% ethanol – 0,5 g/100ml)

*Safranin O* ve vodě (1% (w/v) – 1 g/100 ml)

*Safranin/Fast Green* – safranin (1 g/l ve vodě), Fast Green (0.1 g v 100 ml 96% ethanolu)

*Safranin+alciánová* modř

 Safranin: 0.35g safraninu v 35 ml 50% EtOH

Alcian Blue: 0.65g Alcian Blue (alciánová modř) v 65 ml destilované vody,

Oba roztoky nechat míchat magnetickou míchačkou cca. 1 hodinu, pak slít dohromady, promíchat a zfiltrovat. Označit lahvičku: safranin + alciánová modř, datum výroby.

*Floroglucinol HCl* (2% floroglucinol v 96% ethanolu – 0,2 g/10 ml; 25% HCl – může být i menší koncentrace; roztoky nemÍchat dohromady )

*Lugolův roztok* (5% (w/v) I2 10% (w/v) KI smíchané v destilované vodě)

**Materiál:**

Parafínové řezy z předešlé hodiny (odparafinované), řezy z kryotomu

Šáchor, stonek (na ruční řezy)

Pryšec (kvůli latexu se škrobovými zrny), stonek voděnky (škrobová zrna v chloroplastech)

**Postupy barvení:**

**Toluidinová modř**

1. Žiletkou vytvoříme tenké řezy a ihned je umístíme do kapky vody.
2. Odsajeme pipetou nebo filtračním papírem vodu a ihned zakápneme několika kapkami barvičky. Necháme působit 1-2 minuty.
3. Odsajeme barvičku filtračním papírem a ihned zakápneme *vodovodní* vodou. Odsajeme vodu se zbytkem barvičky a opakujeme zakápnutí a odsátí vody ještě jednou nebo do té doby, dokud se voda barví modře.
4. Nakonec zakápneme vodou/50% glycerolem, přikryjeme krycím sklem a pozorujeme.

**Safranin O**

1. Žiletkou vytvoříme tenké řezy a ihned je umístíme do kapky vody.
2. Odsajeme pipetou nebo filtračním papírem vodu a ihned zakápneme několika kapkami barvičky. Necháme působit 10 minut.
3. Odsajeme barvičku filtračním papírem a ihned zakápneme destilovanou vodou. Odsajeme vodu se zbytkem barvičky a opakujeme zakápnutí a odsátí vody ještě jednou nebo do té doby, dokud se voda barví červeně (vypláchnutí přebytku safraninu).
4. Nakonec zakápneme vodou/50 % glycerolem, přikryjeme krycím sklem a pozorujeme.

**Safranin/Fast Green – sukcesivní**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | **Roztok** | **Čas\*** |
| 1 | 50% ethanol | 5 min |
| 2 | 1 g/l safranin (vodný roztok) | 10 min |
| 3 | 50% ethanol | 2x5 min |
| 4 | 75% ethanol | 5 min |
| 5 | Fast Green (0,1% v 96% ethanolu) | 4 min |
| 6 | 96% ethanol  | 5 min\*\* |
| 7 | 100% ethanol (E) | 5 min |
| 8 | E:X 1:1 | 5 min |
| 9 | Xylén (X) | 5 min |
| 10 | Montování do Eukittu |  |

\*časy barvení jsou orientační, záleží na druhu preparátu, nutno vyzkoušet (preparační mikroskop pro kontrolu)

\*\*v tomto bodě stačí opláchnout 96% ethanolem a pak zakápnout 50% glycerolem, přikrýt krycím sklíčkem a pozorovat

**Safranin+alciánová modř – simultánní**

Pokud řezy v ethanolu, tak rehydratovat ve vodě po dobu 5 min. Ruční řezy rovnou barvit.

5 min………směs safranin+alciánová modř (viz Barviva)

2x………….opláchnout v destilované vodě

Pozorovat nebo trvalý preparát:

2 min……....50% EtOH

2 min……....75% EtOH

2 min……....96% EtOH

1x………….opláchnout v 100% EtOH

1x………….opláchnout v 100% xylenu

Namontovat na sklíčko do Eukittu.

**Lugolův roztok**

1. Vytvořte preparát ve vodě a přikryjte krycím sklíčkem.
2. Vedle krycího sklíčka dejte kapku LR
3. Na okraj protější strany krycího sklíčka přiložte filtrační papír – odsátím vody se pod sklíčko vsune LR z kapky vedle sklíčka.
4. Pozorujte pod mikroskopem

**Floroglucinol HCl**

1. Připravte ruční řez do kapky vody.
2. Odsajte filtračním papírem vodu a zakápněte směsí floroglucinol HCl (Wiesnerův roztok).
3. Po 2 minutách odsajte barvičku (při pozorování v barvičce by mohly kyselé výpary poškodit mikroskop) a zakápnětě vodou/50% glycerolem.
4. Ihned pozorujte, barvení postupně mizí (není stálé).