

# Rychlá cytologická metoda

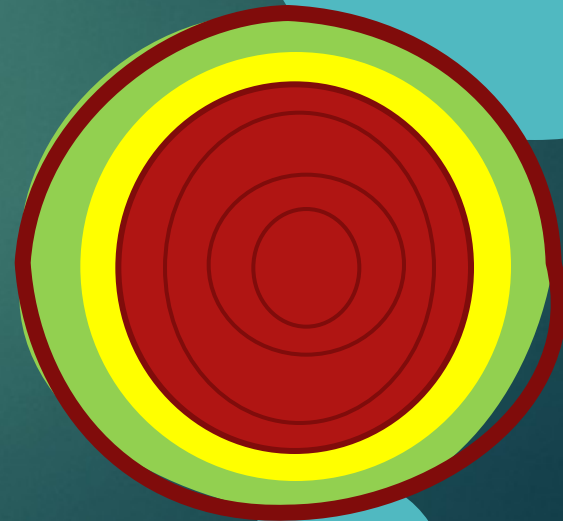
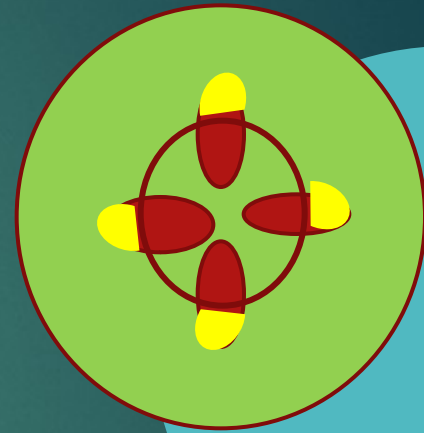
ROZTLAKOVÉ PREPARÁTY

MATERIÁL: KOŘENOVÉ ŠPIČKY ROSTLIN

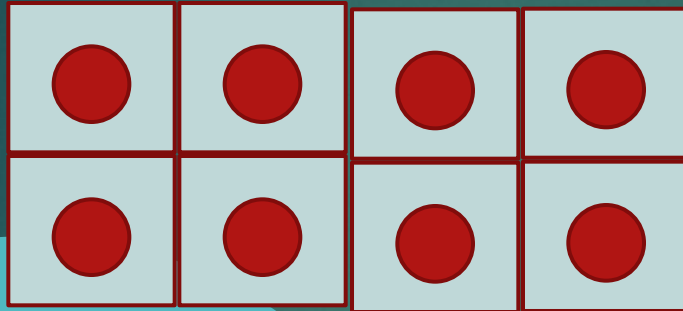
# Cíle

- ▶ připravit roztakový preparát kořínku cibule
- ▶ obarvit preparát jaderným barvivem
- ▶ posoudit kvalitu připraveného preparátu z hlediska usnadnění/ztížení pozorování fází mitózy
- ▶ rozeznat v preparátu jednotlivé fáze mitózy

# Primární a sekundární meristémy



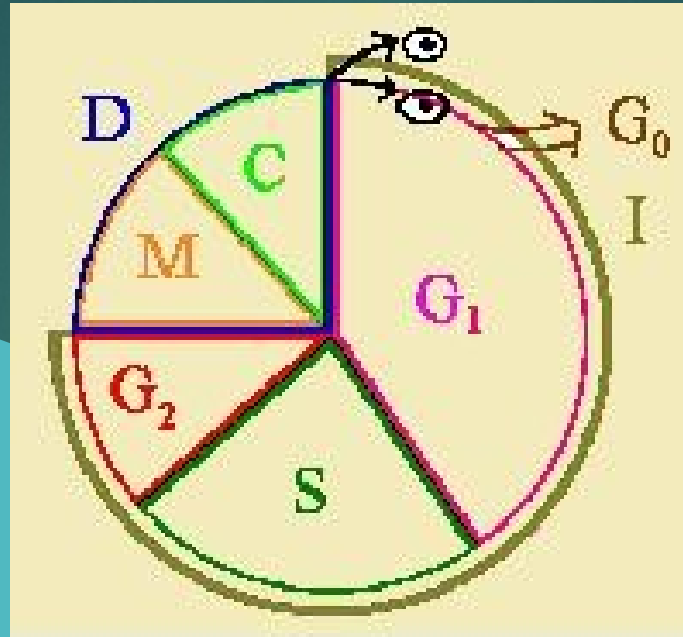
# Charakteristika meristematických buněk



- ▶ malé, izodiametrální buňky
- ▶ tenká buněčná stěna
- ▶ velké jádro (jádro-plasmový poměr)
- ▶ velká hustota protoplastu - malé vakuoly

# Buněčný cyklus

[mujweb.cz/Veda/biologie/b.%20cyklus.htm](http://mujweb.cz/Veda/biologie/b.%20cyklus.htm)



**I (interfáze):** doba, kdy se buňka připravuje na dělení, tj. G<sub>1</sub>, S a G<sub>2</sub> fáze

**G<sub>0</sub> fáze:** buňka se nedělí, je součástí pletiva

**G<sub>1</sub> fáze** (z ang. gap = mezera): na buňce není pozorovatelné co se v ní děje, probíhá syntéza RNA a bílkovin

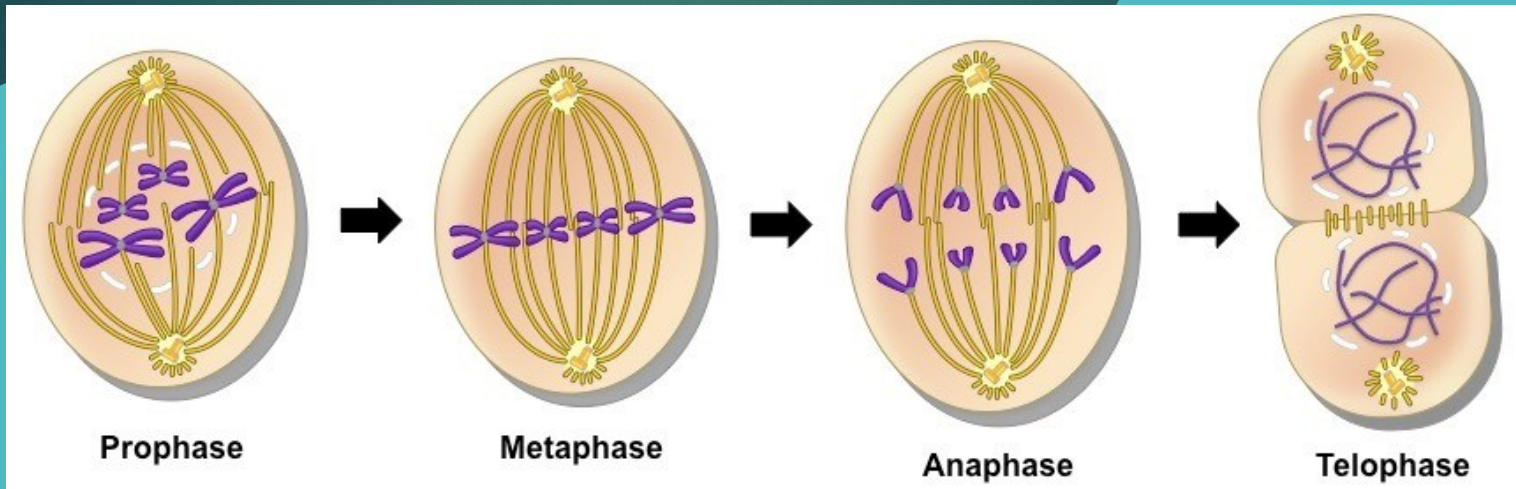
**S (syntetická) fáze:** syntéza DNA

**G<sub>2</sub> fáze:** syntéza bílkovin pro vznik a dělení jádra (histony a mikrotubuly)

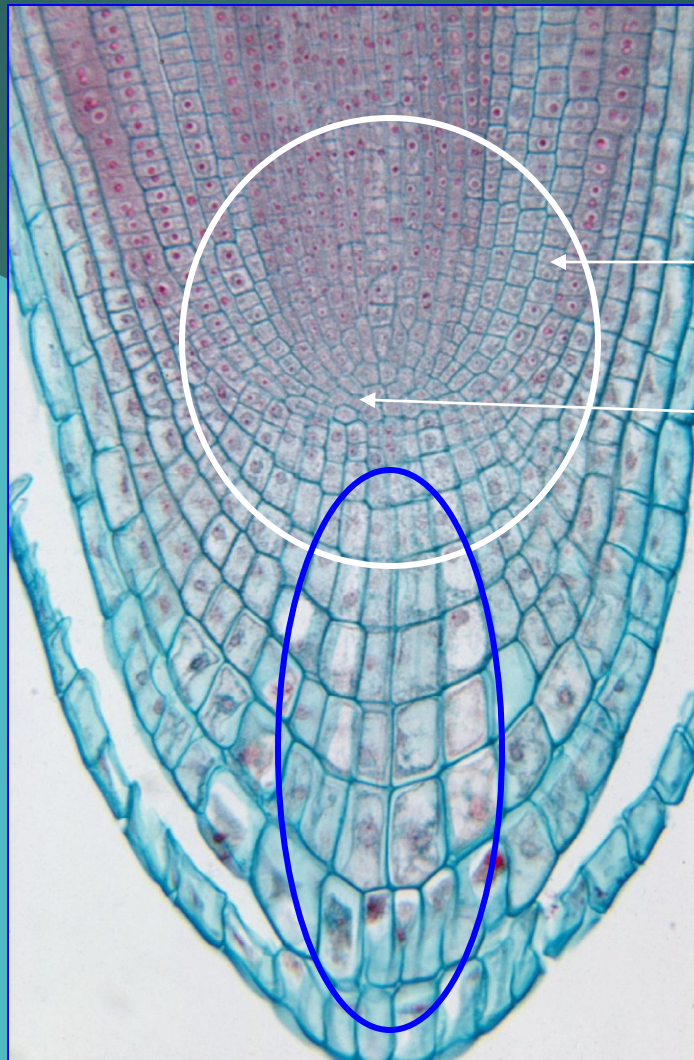
**M fáze (mitóza):** nepřímé dělení jádra

**C fáze (cytokineze):** dělení celé buňky

# Mitóza



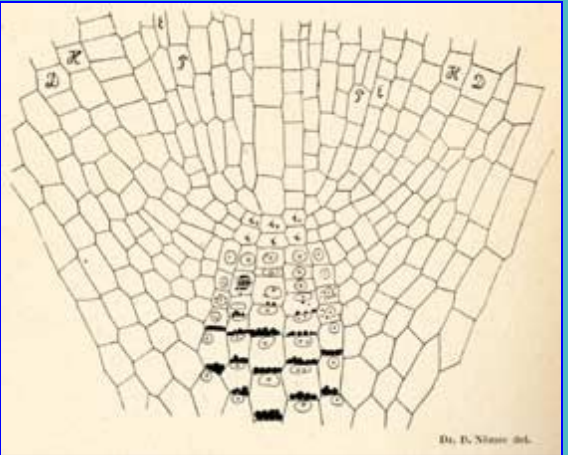
# Kořenový apikální meristém *Linum*



vlastní meristém

klidové centrum

kořenová čepička



kolumela = střední sloupek kořenové čepičky

# Barviva - zvýšení kontrastu

## ▶ přírodní

**karmín** - červec nopálový

**orcein** - lišejníky (*Lecanora*, *Rocella*)

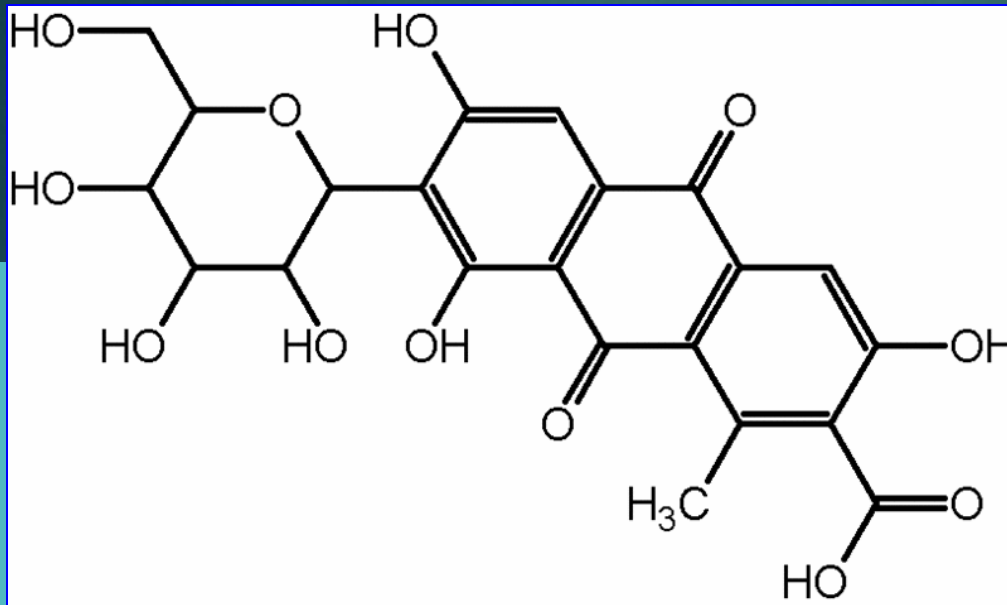
**hematoxylin** - dřevo kampešky (*Haematoxylon campechianum*)

**brasilin** - dřevo druhů rodu *Caesalpinia* (*Caesalpinia sappan*, *C. brasiliensis*)

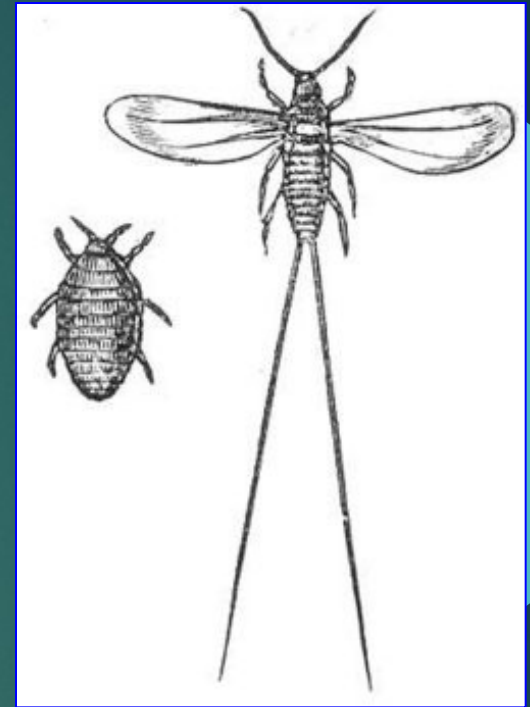
## ▶ syntetická



# Karmín



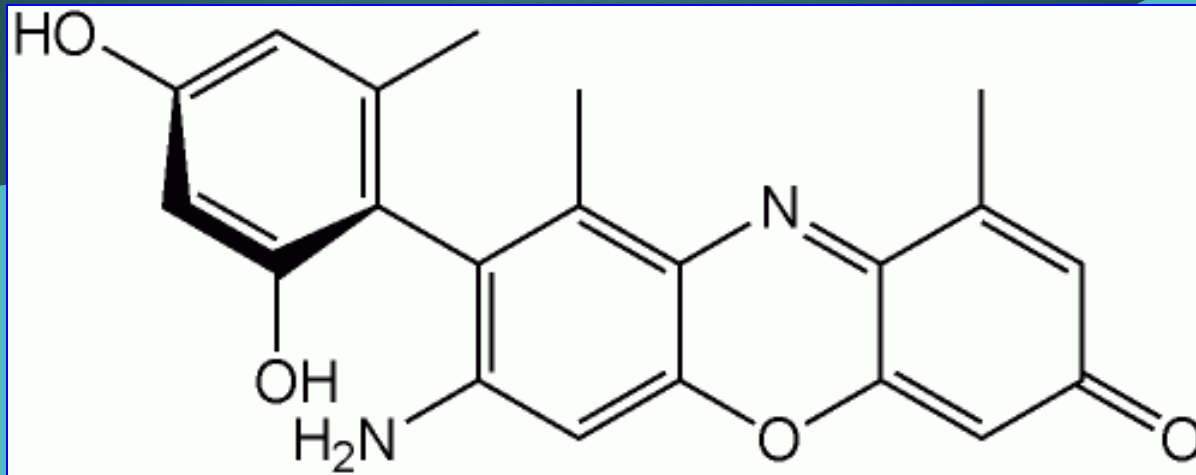
kyselina karmínová



*Dactylopius coccus*

Cochineal, Natural Red 4, C.I. 75470

# Orcein

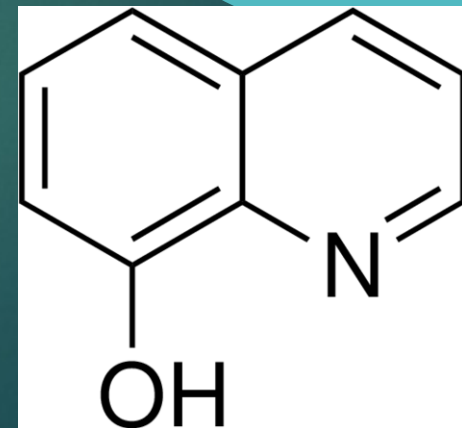


archil, orchil, lacmus, litmus a C.I. Natural Red 28, (E121)

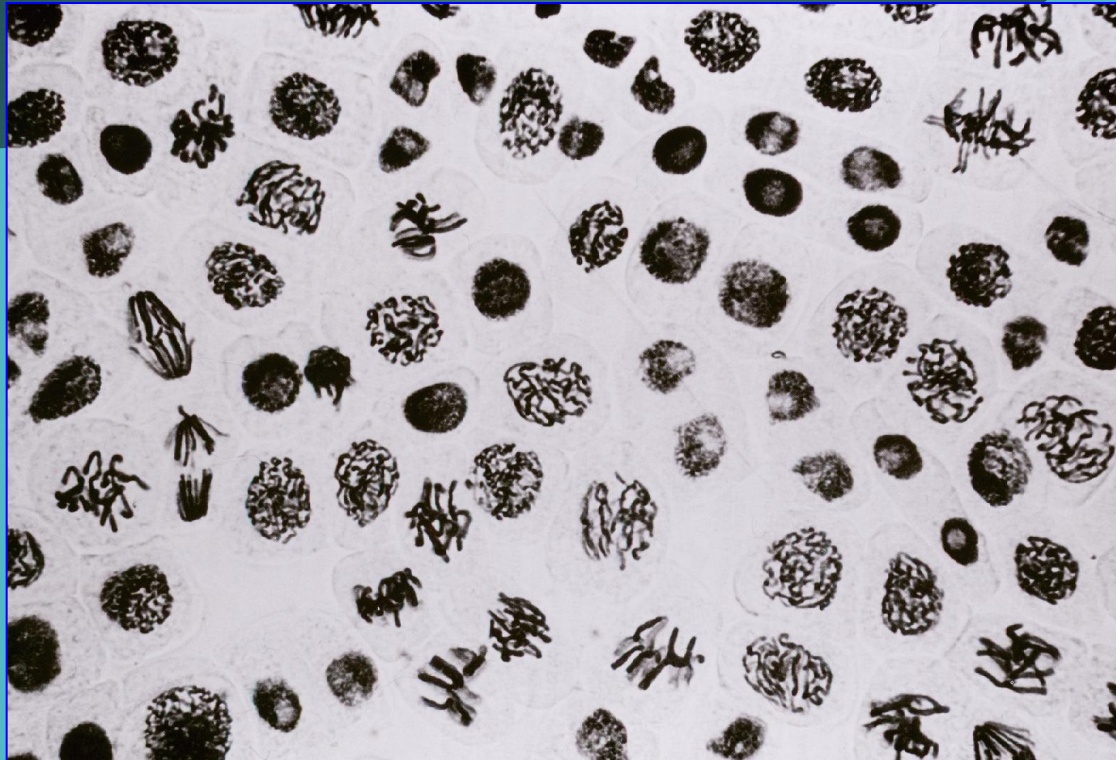
červené v kyselém pH, modré v alkalickém pH

# Mitotické jedy

- halogenové deriváty aromatických uhlovodíků (p-dichlór benzén, ■bróm naftalén, 8-hydroxychinolin)
- alkaloidy (kolchicin, vincristin)
- herbicidy (oryzalin)



# Buňky meristému kořene hrachu *Pisum*



po synchronizaci jaderného dělení oryzalinem (dr. J. Macas)

# Obecný postup roztlakové metody

## předpůsobení

- fixace Carnoy, Farmer
  - macerace HCl
  - roztlačení
  - barvení acetokarmín, laktopropionový orcein
  - projasnění levulózový sirup, glycerol
- } fixačně-macerační směs

# Fixačně-macerační směs

Dostál J. (VÚOK Průhonice)

- 1 díl 96% etanolu
- 1 díl normálního butanolu
- 1 díl ledové kyseliny octové
- 1 díl konc. HCl (35 - 36%)
- 4 díly destilované vody

# Pracovní postup

Materiál: kořeny *Allium cepa* L.

## bez předpůsobení - fáze buněčného cyklu

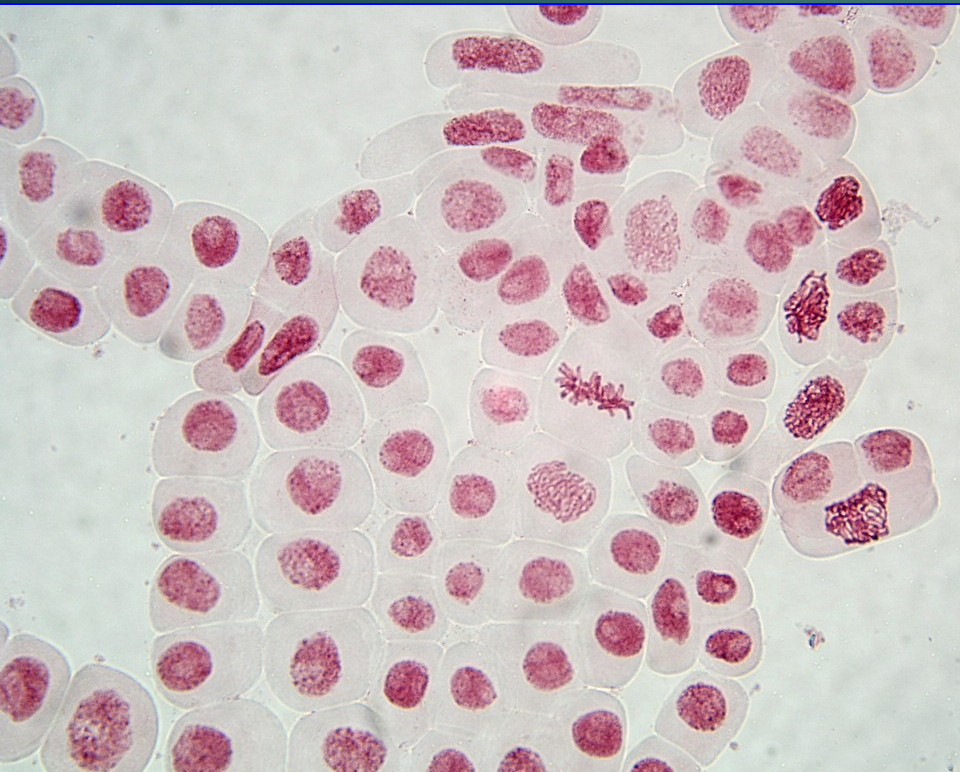
- odběr naklíčených kořenů
- fixace a macerace v činidle
- izolace kořenové špičky
- barvení laktopropionovým orceinem
- rámování lakem na nehty

## předpůsobení v hydroxychinolinu - narušení cytoskeletu

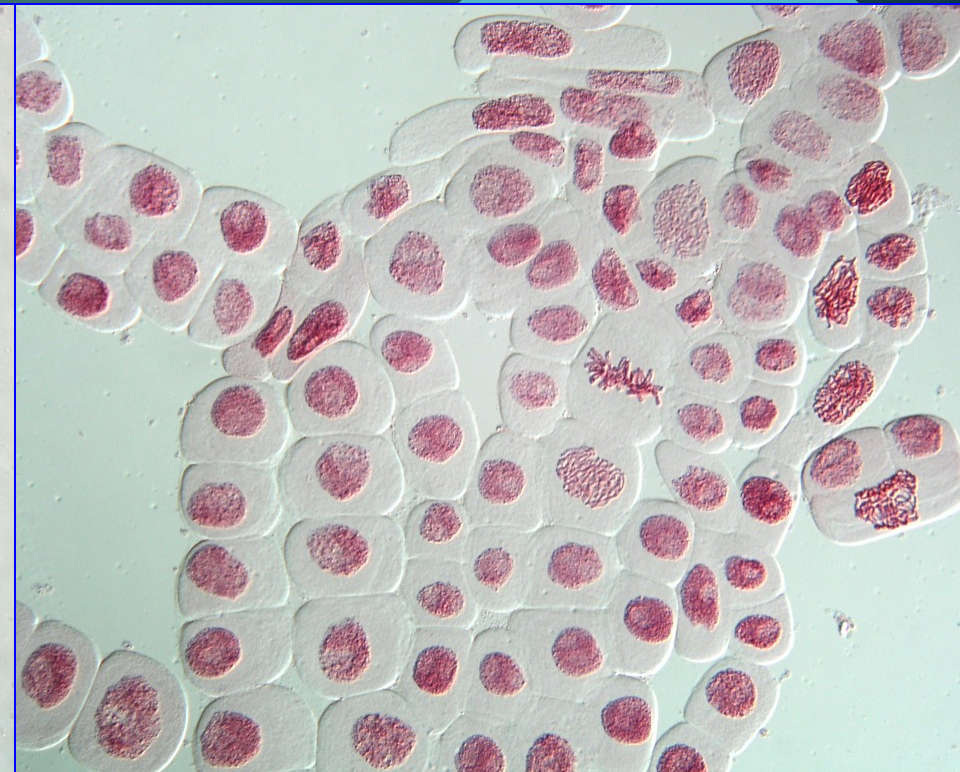
- inkubace kořenů v 0,02 M roztoku hydroxychinolinu
- odběr naklíčených kořenů
- fixace a macerace v činidle
- izolace kořenové špičky
- barvení laktopropionovým orceinem
- rámování lakem na nehty

# Laktopropionový orcein

roztakový preparát *Allium cepa*



Olympus BX-51  
procházející světlo



Olympus BX-51  
DIC



# Úkoly

- ▶ zhodnocení kvality macerace, roztlaku a obarvení
- ▶ srovnání barvení jaderným barvivem a toluidinovou modří
- ▶ fotodokumentace roztlaku kořínku bez předpůsobení a s předpůsobením hydroxychinolinem
- ▶ zhodnocení kvality preparátu vyrobeného během cvičení Cytologie a anatomie rostlin