

Zdeňka Pazourková a Jaroslav Pazourek:

Nová modifikace nigrosinové metody

(Ústav pro fyziologii rostlin a Genetický ústav university Karlovy)

Je tomu asi 30 let, co byly do cytologické mikroskopické techniky zavedeny t. zv. rychlé barvicí metody. Jejich užívání se zvláště v poslední době velmi rozšířilo a u nás jsou to hlavně praktici, kteří se o tyto metody silně zajímají a nejvíce jich užívají při své práci. Hlavním důvodem, proč jim dávají přednost před klasickou metodou parafinovou, je jistě především rychlost, s jakou lze připravit preparát zcela dostačující pro cytologické zhodnocení materiálu, jednak proto, že tyto metody nekladou velkých nároků na laboratorní zařízení.

Jednou z nejmladších barvicích metod je metoda acetonnigrosinová, která proti ostatním, u nás nejčastěji užívaným metodám (acetoorcein, acetokarmín, acetolakmoid) má tu výhodu, že rozmáčkнутý objekt barvíme za studena. Původní předpis (G ö s t a v o n R o s e n 1947) zdůrazňuje, že preparace se má dít při snížené teplotě. Tak při fixaci má být dodržena teplota 8 až 12 °C, při maceraci 10 až 15 °C, při vypírání nemá teplota destilované vody přesáhnout 15 °C a barvicí tekutina má být teplá asi 15 °C. Ochlazování jednotlivých roztoků by jistě bylo větší komplikací než zahřívání při metodách jiných a proto by tato metoda nebyla jednodušší než druhé, při nichž barvíme za tepla. Tuto obtíž odstranili N e č á s e k a P a l e č k o v á (1951), neboť zjistili, že není nutno užívat barviva chlazeného.

Při praktickém užívání této metody jsme se setkali s dalšími obtížemi. První z nich byla doba fixace. Při experimentální práci nelze často, zvláště odebíráme-li vzorky mimo laboratoř, kde objekty zpracováváme, dodržeti určenou dobu fixace (15 až 30 min.) a často nelze také časově zvládnout provedení pokusu i zpracování objektů v jednom dni. V tomto případě je pak výhodné všechny odebrané vzorky zpracovávat až druhý den. Zkoušeli jsme tedy, jak dlouho je nutno fixovat, aby fixace byla dostačující a zároveň i to, jak dlouho je možno fixovat, aby objekty nebyly prefixované. Pokusy jsme konali na naklíčených semenech cibule kuchyňské (*Allium cepa*) a zjistili jsme, že odríznuté kořínky je možno s úspěchem fixovat 10 min. až 40 hod.

Při většině pokusů bývá důležité fixovat několik objektů najednou a mnohdy je třeba odebírat více vzorků ve stejnou dobu. V těchto případech velmi zdržuje odřezávání kořínků při fixaci, což bývá někdy, zvláště u méně zkušených pracovníků, příčinou nezdaru i proto, že jim tato operace trvá příliš dlouho a odríznuté kořenové špičky oschnou. Proto jsme zkoušeli fixovat naklíčená semena celá a teprve po fixaci odřezávat kořenové špičky. Tento postup se nám velmi dobře osvědčil a užívali jsme ho při své práci běžně.

Další obtíží je, že nigrosin barví v dosud užívané koncentraci poměrně velmi rychle a tak se může snadno stát, že se preparáty snadno přebarví. Tuto závadu jsme odstranili tím, že jsme zásobní roztok ředili zředěnou kyselinou

octovou (destilovaná voda 1 díl, ledová kyselina octová 1 díl). Pro kořínky *Allium cepa* se nám nejlépe osvědčilo zředění 1 díl zásobního roztoku nigrosinu + 2 díly zředěné kyseliny octové.

Poslední úkol, který jsme si vytkli, bylo vyřešit otázku převedení preparátu do trvalého stavu. Preparát, zhotovený původní metodou, nemá dlouhého trvání a jediný způsob převedení v trvalý jest prossávání glycerolu a pozdější rámování. Takovýto postup je velmi pracný a poměrně dosti zdoluhavý. Chtěli jsme proto nalézt snadnější metodu, kterou by bylo možno při normálním předchozím postupu vyrobit ihned preparát trvalý. Tento problém jsme vyřešili následujícím způsobem: Nafixované, macerované a ve vodě vyprané kořínky *Allium cepa* jsme barvili in toto na hodinovém sklíčku 10 min. Pak jsme je krátce opláchli ve vodou zředěné kyselině octové (1 : 1), vložili na podložní sklo a přebytečnou tekutinu odsáli filtračním papírem. Pak jsme na ně kapli kapku levulosového syruhu a přiložili krycí sklíčko. Na krycí sklíčko jsme pak mírně tlačili prýží tak, až se kořínek rozmáčknu a jednotlivé buňky se od sebe oddělily. Téměř stejně dobře jako levulosový syruhu se nám osvědčil syruhu Apáthy-ho. Ve Schweizerově uzavíracím mediu a v Liquido Faure zbarvení vybledlo.

Takto zhotovené preparáty jsou tedy ihned trvalé a první zkušební preparáty, zhotovené více než před půldruhým rokem, vydržely beze změny dodnes.

Nakonec připojujeme přehled postupu, kterým jsme barvili kořínky naklíčených semen *Allium cepa*, jednak předpisy pro uzavírací media a pro základní roztok nigrosinu. Je třeba však připomenout, že, jako u většiny mikrotechnických metod, je třeba i zde přezkoušet tuto metodu a upravit koncentraci nigrosinu a doby působení pro každý materiál zvlášť. Tak na př. kořínky naklíčených semen *Ricinus communis* jsme barvili nigrosinem, zředěným 50% kyselinou octovou v poměru 1 : 5 20 minut, listové meristémy *Coleus scutellarioides* nigrosinem ředěným 1 : 4 10 minut a pod.

Přehledný postup modifikované metody:

1. Fixace: 1 díl ledové kyseliny octové
+ 2 díly 95% alkoholu : 10 min. až 40 hod.
2. Macerace: 1 díl konc. HCl + 1 díl 95% alkoholu : 10 min.
3. Vypírání: destilovaná voda : 10 min. (i více).
4. Barvení: 1 díl ledové kyseliny octové +
1 díl destilované vody + 1 díl základního roztoku nigrosinu : 10 min.
5. Oprání: v 1 dílu ledové kyseliny octové
+ 1 dílu destilované vody : krátce.
6. Vložit na podložní sklo, odsát přebytečnou tekutinu, kápnout kapku uzavíracího media a tlakem na přiložené krycí sklíčko rozmáčknout objekt.

Základní 4% barvicí roztok:

Ve 100 cem destilované vody a ledové kyseliny octové v poměru 1 : 1, kterou zahřejeme až k bodu varu, rozpustíme 4 g nigrosinu (musí to být nigrosin rozpustný v alkoholu !) a pováříme 3 až 5 minut. Pak ponecháme několik minut v pokojové teplotě chladnout, načež se rychle ochladí. Roztok se přechovává ve tmě v době uzavřené lahvičce. Před použitím se filtruje, zraje asi 14 dní.

Levulosový syruhu:

30 g levulosity rozpustíme ve 20 cem destilované vody a necháme v termostatu zhoustnout.

Apáthy-ho syruhu:

Na vodní lázni rozpustíme stejnou váhovou díly arabské gumy, třtinového cukru a destilované vody a přidáme 1 až 2 % formolu.

Souhrn.

Byla zlepšena nigrosinová metoda. Přezkoušeli jsme dosud udávanou dobu fixace a zjistili jsme, že odříznuté kořínky lze fixovat minimálně 10 min., maximálně 40 hod. Fixovati lze i celá naklíčená semena a teprve po fixaci uřezávati kořínky pro další manipulaci.

Jelikož při dosud užívané koncentraci nigrosinu lze preparát snadno přebarvit, užívali jsme při barvení zředěný zásobní roztok nigrosinu, který jsme ředili směsí: 1 díl ledové kyseliny octové a 1 díl destilované vody. Poměr zásobního roztoku nigrosinu a zředěné kyseliny octové musí být pro každý objekt experimentálně stanoven.

Protože preparát, zhotovený původní metodou, během krátkého času vyschne a je znehodnocen, a převedení v trvalý stav je zdlouhavé a pracné, vypracovali jsme metodu, kterou lze trvalý preparát vyrobit při normálním předchozím postupu. Kořínek byl barven in toto na hodinovém sklíčku (doba barvení musí být pro každý objekt vyzkoušena), opláchnut zředěnou kyselinou octovou (1 : 1), vložen na podložní sklíčko a přebytečná tekutina odsáta filtračním papírem. Potom se na objekt kápne kapka levulosového syruhu Apáthyho a kořínek se rozmáčkne tlakem na přiložené krycí sklíčko, jako při normální metodě.

Literatura.

- Hrubý K., Pazourková Z. (1952): Základy mikroskopické techniky, Státní pedagog. nakl. Praha.
Nečásek J., Palečková F. (1951): Some remarks to the Rapid Cytological Stains *Studia Botanica Czechoslovaca*, 12 : 241—243.
Rosen G. von (1947): The rapid nigrosine-method for chromosome counts, applicable to all the growing tissues of the plant. *Hereditas* 33 : 576—570.
Wolf J. (1954): Mikroskopická technika optická i elektronová pro biologické účely. Praha.

Vysvětlivky k tabulce IX.

- Obr. 1. Mitosa z kořenové špičky cibule (*Allium cepa*). Barveno modifikovanou metodou nigrosinovou, preparát uzavřen v levulosovém syruhu.
Obr. 2. Mitosa z kořenové špičky skočce (*Ricinus communis*). Úprava preparátu stejná jako u obr. 1.

3. Пазуркова и Я. Пазурек :

Усовершенствованный метод приготовления раздавленных препаратов с нигрозиновой окраской.

Нами был разработан метод приготовления раздавленных препаратов и окраски нигрозином с некоторыми модификациями более подходящими к разного рода исследованиям.

Мы прежде всего установили проверкой срока фиксации, что напр. отрезанные корешки *Allium cepa* можно оставить в фиксирующей жидкости от 10 мин. (минимальный срок фиксации) до 40 часов без какого нибудь повреждения. Мы убедились дальше в том, что становится возможным фиксировать даже и целые прорастающие семена, от которых только после фиксации отрезаются корешки к последующей обработке.

При обычно применяемой концентрации нигрозина, в красящем растворе (4%), препараты очень легко переокрашиваются. Поэтому мы разбавляли, для окраски наших препаратов, 4-процентный раствор нигрозина разбавленной уксусной кислотой (1 часть ледяной уксусной кислоты и 1 часть дистиллированной воды). Соотношение раствора нигрозина и разбавленной уксусной кислоты, наиболее подходящее для хорошей окраски, надо установить специальным опытом для каждого отдельного типа объектов.

Раздавленные препараты изготовленные по общепринятому ходу обработки очень быстро высыхают и становятся таким образом бесценными. Поэтому мы решили изготавливать раздавленные препараты прямо в среде для заключения. С этой целью объекты — в нашем случае корешки *Allium sera* — подвергают после фиксации и мацерации тотальной окраске на часовом стекле (наиболее подходящий срок окраски для разного рода объектов надо испробовать). После обмывки корешков разбавленной уксусной кислотой (1 : 1) их кладут на предметное стекло и обсушивают фильтровальной бумагой. После того корешки покрывают каплей левулозowego сиропа или-же гумми сиропа по Апати и, накрывая препарат покрывным стеклом, одновременно распределяют клетки тонким слоем, осторожно надавливая на покрывное стекло.

Ход работы при подготовке раздавленных препаратов:

1) Фиксация в спирт-уксусной кислоте (95-градусного спирта 2 объемных частей, ледяной уксусной кислоты 1 объемная часть), от 10 мин. до 40 часов.

2) Мацерация смесью 1 части концентрированной соляной кислоты и 1 части 95-градусного спирта, 10 мин.

3) Промывка дистиллированной водой, 10 мин. и больше.

4) Окраска в растворе состоящем из 1 части ледяной уксусной кислоты, 1 части дистиллированной воды и 1 части 4-процентного раствора нигрозина, 10 мин.

5) Быстрая промывка разбавленной уксусной кислотой (ледяной уксусной кислоты 1 часть, дистиллированной воды 1 часть).

6) Объект помещается на предметное стекло, обсушивается фильтровальной бумагой, покрывается каплей среды для заключения и осторожным давлением на покрывное стекло объект раздавливается.

Z. P a z o u r k o v á and J. P a z o u r e k:

Improved rapid nigrosine method.

In the present paper an improvement of the rapid nigrosine method is described. The authors tried various times of fixation and found that the objects (root-tips) should be fixed at least 10 minutes but even the fixation time of 40 hours gave quite satisfactory results. The germinating seeds may be fixed in toto and the root tip cut off till after fixation. As the slide can be overstained by the genuine nigrosine method, we used a diluted solution of nigrosine. The standard solution should be diluted by a mixture of one part of glacial acetic acid and one part of distilled water. The appropriate dilution is to be found experimentally for every object.

Because the preparation, made by the original method, dries up during a short time and making it permanent is long and not quite easy, we have elaborated a method of making slides permanent by means of the normal previous procedure. The object—after fixation and maceration in a mixture of HCl and alcohol—was stained in toto on a watch-glass (staining time is to be tested for every object), rinsed in diluted acetic acid (1 : 1), then laid on the ground slide, the superfluous liquid being removed by a filter-paper. Then a small quantity of the levulose sirup or of the Apathy's sirup is dropped on the object, the cover slip applied and the object squashed by slight pressure on the cover slip as usually. The stain does not fade and after two years is as distinct as in the fresh slide.

The schedule of the improved method:

- 1) Fixing: 1 part glacial acetic acid + 2 parts 95% alcohol : 10 mins till 40 hours.
- 2) Maceration: 1 part concentr. HCl + 1 part 95% alcohol : 10 mins.
- 3) Washing: distilled water : 10 mins (even longer).
- 4) Staining: 1 part glacial acetic acid + 1 part distill. water + 1 part standard nigrosine solution : 10 mins.
- 5) Rinsing: 1 part glacial acetic acid + 1 part distill. water : shortly.
- 6) Lay the object on the ground slide, remove the superfluous liquid, drop the levulose sirup and apply the cover slip.
- 7) Squash the object by slight pressure.

