

Kryoprezervace embryogenních kultur smrku



Eliášová Kateřina, Vondráková Zuzana, Špačková Jaroslava, Vágnér Martin
Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Rozvojová 263, 165 00 Praha 6 – Lysolaje, ČR
eliasova@ueb.cas.cz

Úvod:

Kryoprezervace poskytuje možnost dlouhodobého skladování rostlinného materiálu. Uskladnění při teplotách blízkých -200°C je vhodným způsobem jak uchovat geneticky významné druhy či odrůdy rostlin po relativně dlouhou dobu. Tento postup se užívá i pro uchování vybraných tkáňových kultur, u nichž musí zůstat zachovány jejich důležité vlastnosti, které by mohly být ovlivněny např. v důsledku somaklonální variability v průběhu dlouhodobých kultivací. Skladované kultury jsou zároveň záložním zdrojem materiálu, který může utrpět i vlivem náhlých a neočekávaných změn podmínek kultivace. Pro úspěšný průběh procesu zamrazování i rozmrazení a regenerace kultury je třeba zachovávat přesný postup jednotlivých kroků, který je nutné optimalizovat zvláště pro každý rostlinný materiál. Cílem naší práce je zjistit a popsat fyziologické změny, ke kterým dochází v průběhu kryoprezervace embryogenní kultury smrku ztepilého (*Picea abies* (L.) Karst.)

Materiál a metodika:

Ke kryoprezervaci používáme embryogenní suspenzorovou hmotu (ESM), která byla indukována ze zygotických embryí. Před zamrazením je kultura pěstována v tekutém médiu (GD + 2,4-D, BAP, kin), potom je vystavena působení sorbitolu a DMSO. Následuje pozvolné řízené zamrazování až na teplotu blízkou se -200°C . V tekutém dusíku je kultura dlouhodobě uchovávána. Rozmrazování začíná rychlým zvýšením teploty. Kultura je umístěna na filtrační papír a několikrát za sebou rychle přesazena na čerstvé pevné médium, aby byl odstraněn zbytek sorbitolu a DMSO. Regenerace kultury začíná po 2 - 3 týdnech kultivace na pevném médiu. Je-li regenerovaná kultura přesazena na maturační médium (GD + ABA), dochází k dozrání somatických embryí.

Stav kultury je dokumentován pomocí roztlačkových preparátů barvených trypanovou modří. Anatomie zralých somatických embryí byla studována na parafinových řezech barvených jádrou červení a alcianovou modří. Fotografie zralých embryí byly pořízeny pomocí binokulární lupy.

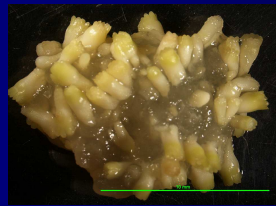
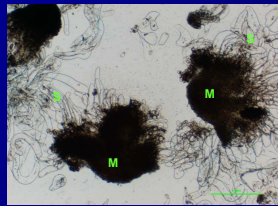
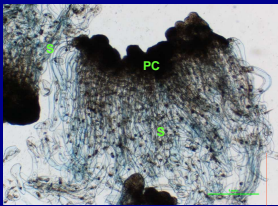
K experimentům jsme použili embryogenní buněčnou linii smrku AFO 541, výsledky byly prověřeny na dalších dvou buněčných liniích smrku C110 a C111.

Průběh somatické embryogeneze - embryogenní kultura smrku - AFO (kontrola)

proliferace

začátek maturace

konec maturace

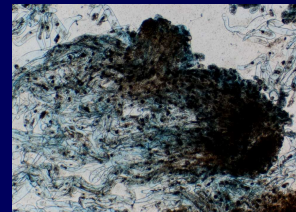
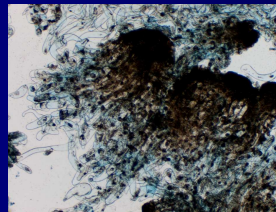
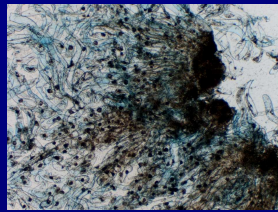
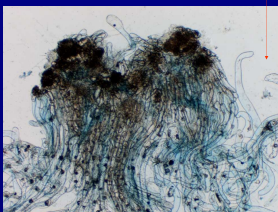


Proliferace: ESM je tvořena nezralými somatickými embryi. Často se vyskytují polyembryogenní meristematická centra (PC), na která jsou napojeny dlouhé suspenzorové buňky (S). I v dlouhých meristematických pásech jsou zřetelné jednotlivé meristematické embryonální „hlavy“.

Maturace: Z polyembryogenních center se odštěpí jednotlivá somatická embrya, jejich meristematická část (M) se zvětšuje, postupně dochází k polarizaci embrya, diferenciaci se apikální i kořenový meristem, u zralých embryí jsou už dobře vyvinuté dělohy. Suspenzor je postupně redukován. Na počátku maturace jsou suspenzorové buňky vázány k meristematické hlavě embrya, později jsou však uvolňovány, suspenzor se rozpadá a stává se součástí zbytkové embryonální hmoty. Zralá embrya jsou zcela samostatná.

Úspěšnost maturace AFO závisí na dobrém stavu kultury v proliferaci. Pro kvalitní další vývoj je důležitá doba vyvinutí meristem pevně napojený na bohatý suspenzor tvořený jasně orientovanými suspenzorovými buňkami.

Příprava k zamrazování



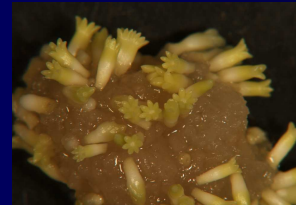
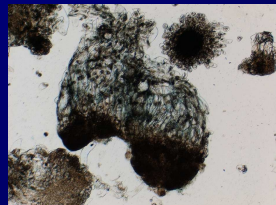
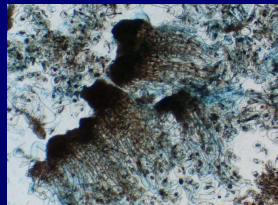
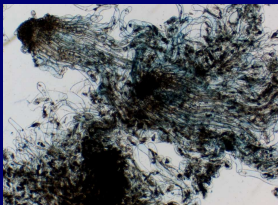
1. kultivace v tekutém médiu – rozvolnění kultury

2. aplikace sorbitolu – začátek destrukce suspenzorů

3. následné přidání DMSO

4. stav ošetřené kultury po ochlazení na -20°C

Průběh somatické embryogeneze – embryogenní kultura smrku - AFO po rozmrazení



5. regenerace – 2 týdny po rozmrazení

6. proliferace – 5 měsíců po rozmrazení

7. začátek maturace

8. konec maturace

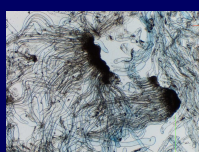
Závěr:

AFO

V průběhu zamrazování dochází k poškození zejména suspenzorových buněk, meristém jsou ovlivněny méně. Po rozmrazení kultury nastává rychlá regenerace. Už po 2 týdnech jsou v ESM patrná úplná somatická embrya vedle rozpadlých. Po 5 měsících vypadá kultura stejně jako před kryoprezervací. Raná embrya během maturace dozrávají a jejich kvalita je stejná nebo lepší než v kontrole.

Obecně:

Embryogenní kultura smrku může úspěšně procházet procesem kryoprezervace. Tolerance jednotlivých linií se však liší. Je tedy třeba upravit postup zamrazování i regenerace pro každý používaný materiál. Pro další úspěšný vývoj embryogenní kultury je třeba delší regenerace a stabilizace kultury, optimální je několikaměsíční proliferace.

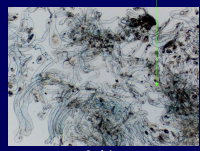


proliferace

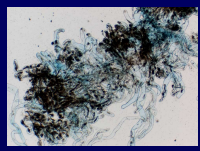
kryoprezervace

rozmrazení

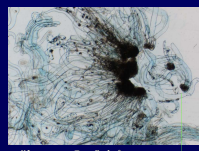
Embryogenní kultura smrku - C 110



regenerace - 2 týdny po rozmrazení



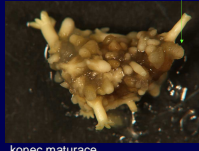
4 týdny po rozmrazení



proliferace – 5 měsíců po rozmrazení

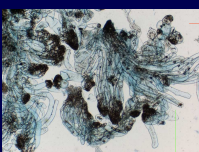


konec maturace



konec maturace

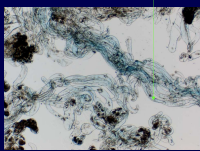
Stavba ESM je u C 110 podobná kultuře AFO – tvoří ji především velká polyembryogenní centra s mohutnými suspenzory. Regenerace zde trvá déle. Po 5 měsících vypadá už kultura stejně jako před kryoprezervací. Tomu odpovídá i výsledek maturace. Kvalita i množství somatických embryí se významně neliší u kultury po kryoprezervaci a u kultury kontrolní.



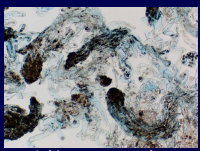
kryoprezervace

rozmrazení

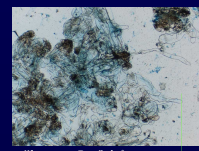
Embryogenní kultura smrku – C 111



regenerace – 2 týdny po rozmrazení



4 týdny po rozmrazení



proliferace – 5 měsíců po rozmrazení



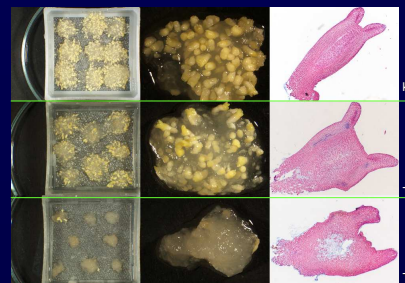
konec maturace



konec maturace

ESM je u linie C 111 tvořena především samostatnými ranými somatickými embryi. Po kryoprezervaci dochází k poměrně rychlé regeneraci, avšak ani po 5 měsících nemá kultura stejnou strukturu jako kontrola. Raná somatická embrya nemají dobře vyvinutý meristem ani kvalitní suspenzor. Proto většinou nejsou schopna dokončit úspěšně maturaci a výnos je výrazně nižší než v kontrole.

Viiv DMSO na maturaci AFO



kontrola

+ 0,01% DMSO

+ 1% DMSO

Vyšší koncentrace DMSO inhibují vývoj somatických embryí. Po rozmrazení kultury je nutné pečlivě vypláchnout DMSO, aby další vývoj kultury nebyl negativně ovlivněn.