



STANOVENÍ VIABILITY RANÝCH SOMATICKÝCH EMBRYÍ SMRKU ZTEPILÉHO V PRŮBĚHU KRYOPREZERVACE

Kateřina Eliášová, Zuzana Vondráková, Jaroslava Špačková, Martin Vágnér
ÚEB AVČR, v. v. i., Rozvojová 263, 165 02, Praha 6 – Lysolaje, ČR

Úvod

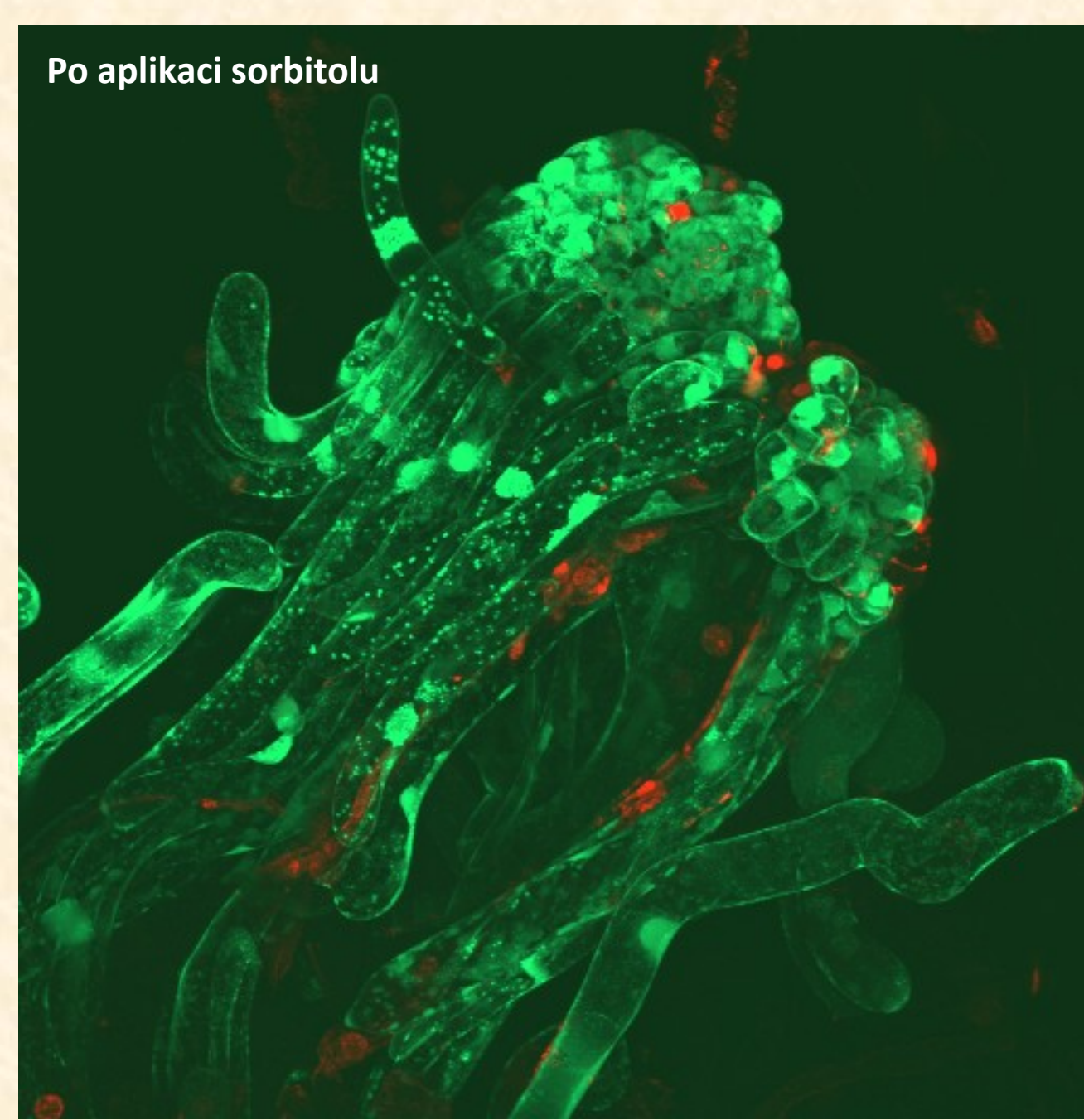
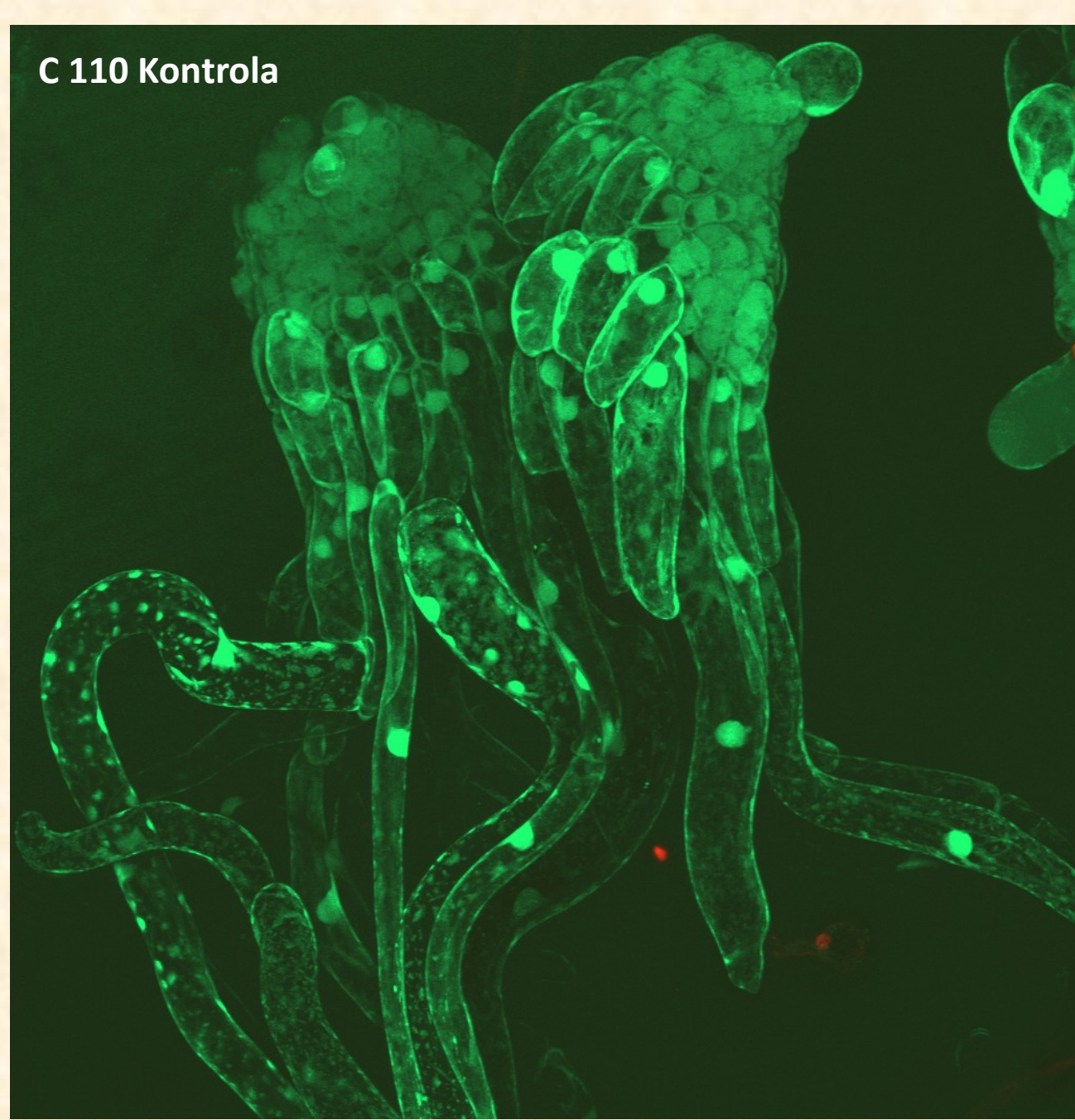
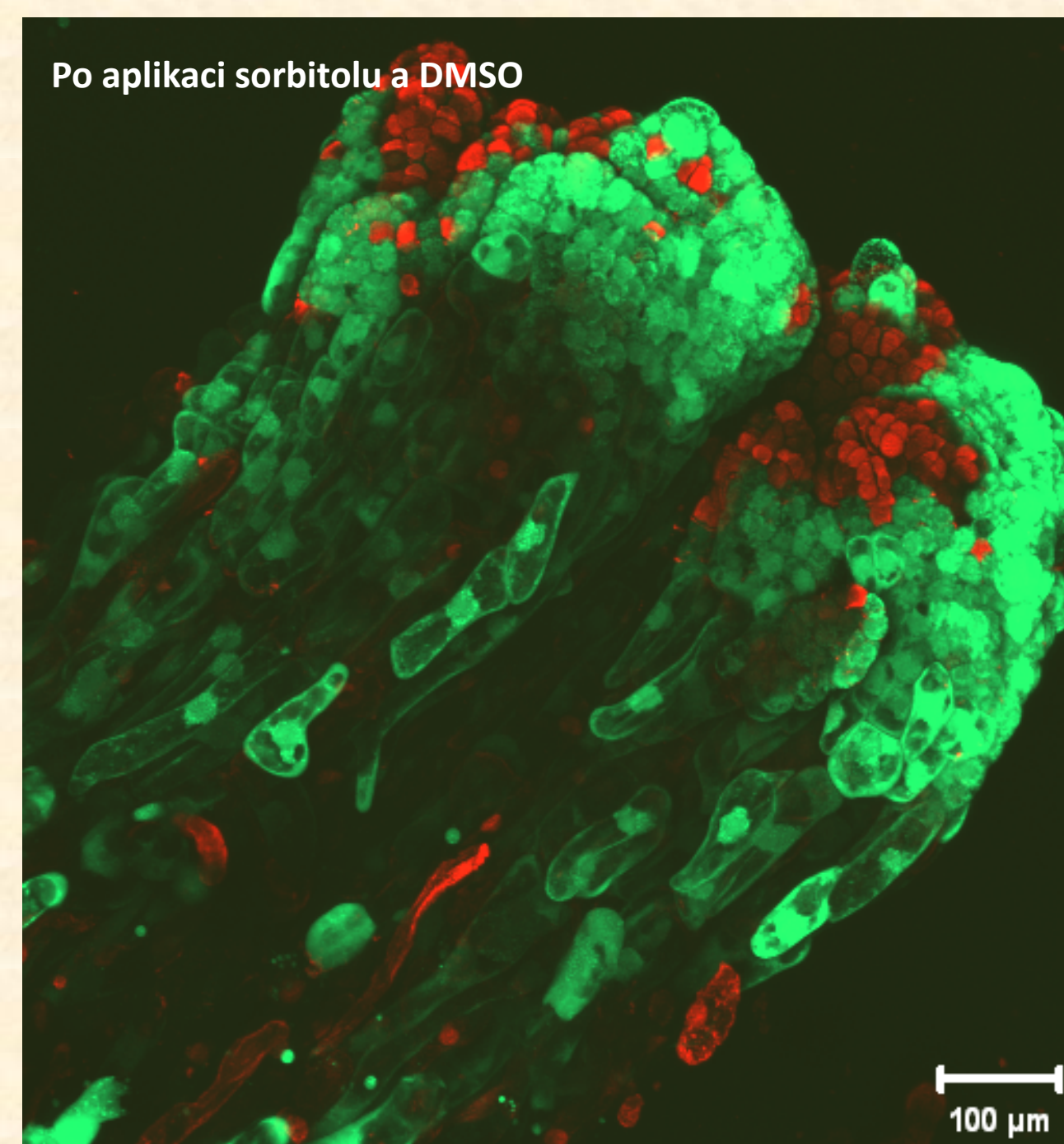
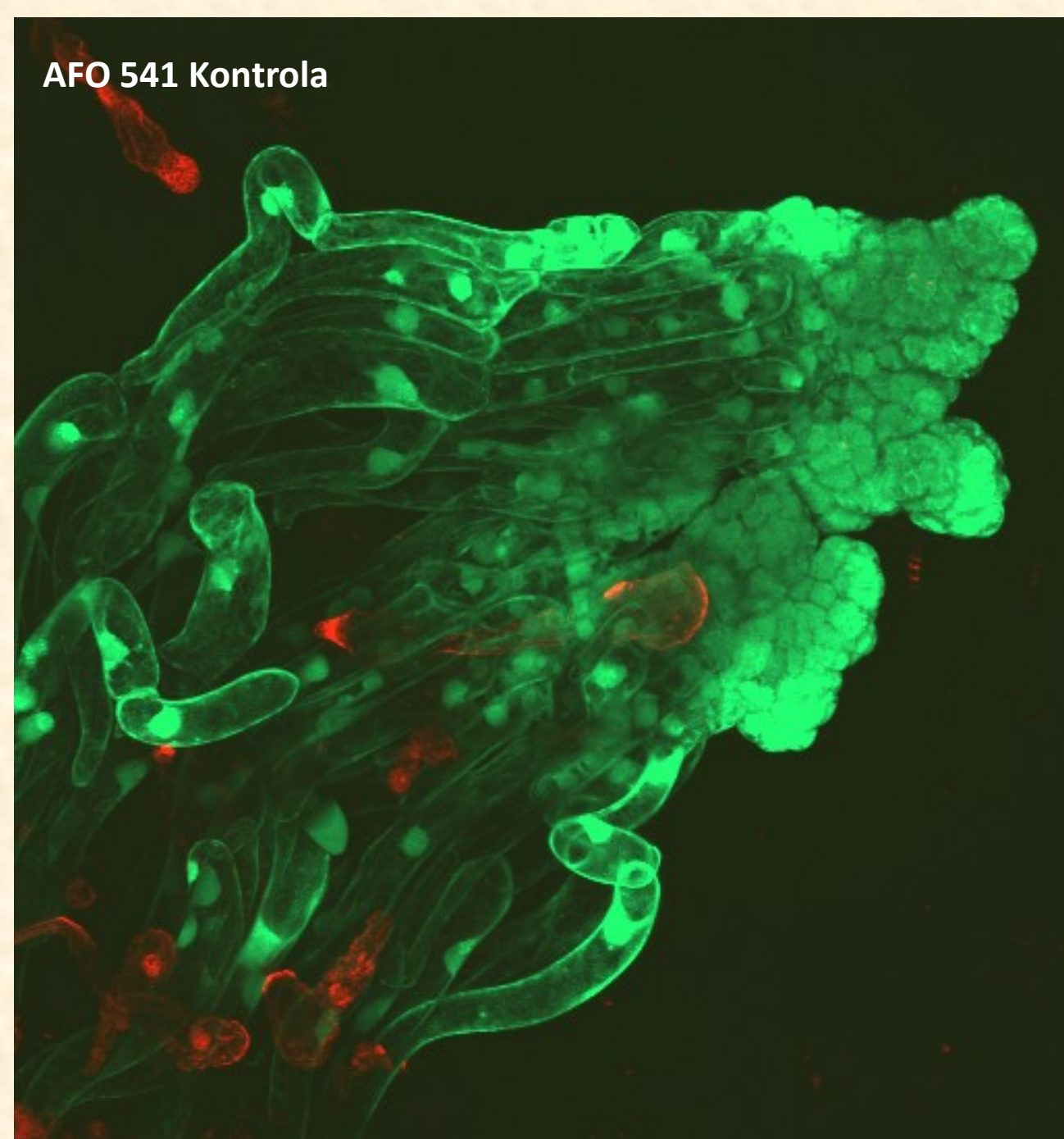
Kryoprezervace poskytuje možnost dlouhodobého skladování rostlinného materiálu. Uskladnění při teplotách blízkých -200°C je vhodným způsobem jak uchovat geneticky významné druhy či odrůdy rostlin po relativně dlouhou dobu. Tento postup se užívá i pro uchování vybraných tkáňových kultur. Pro úspěšný průběh procesu zamrazování i rozmrazení a regenerace kultury je třeba zachovávat přesný postup jednotlivých kroků, které je nutné optimalizovat pro každý rostlinný materiál.

Studujeme proces kryoprezervace embryogenní kultury smrku (ESM), která je tvořena nezralými somatickými embryi (SE). SE sestávají z meristematických center, na která jsou napojeny různé dlouhé suspenzorové buňky. Při přípravě na zamrazení je ESM kultivována v tekutém médiu, vystavena působení sorbitolu a DMSO a po řízeném ochlazení zamrazena a skladována v tekutém dusíku. Rozmrazení kultury začíná rychlým zvýšením teploty, následuje odstranění DMSO a kultura je přenesena na živné médium, kde několik týdnů regeneruje.

Vypracovali jsme metodu stanovení viability buněk, abychom zjistili míru poškození kultury způsobenou stresovými faktory v jednotlivých krocích protokolu. Viabilitu jsme stanovovali také po rozmrazení a během regenerace kultury.

Buňka je považována za viabilní, pokud si zachovává schopnost růstu a dalšího vývoje. Běžně používané testy životaschopnosti buněk využívají změn fyzikálních vlastností buněk (např. integrity membrán, proudění cytoplazmy) nebo metabolické aktivity buněk (redukce tetrazoliových solí nebo hydrolýza fluorogenních substrátů). K posouzení celistvosti buněčných membrán se používají barviva, která pronikají přes poškozené membrány a barví obsah mrtvých buněk. Takto obarvený materiál je možno vyhodnotit mikroskopicky nebo spektrometricky. V našich experimentech jsme ke zviditelnění mrtvých buněk použili fluorescenční barvivo propidium jodid (PI), které proniká do buněk pouze přes poškozenou cytoplazmatickou membránu a specificky se váže na DNA, do určité míry i na RNA. Barví tak jádro a částečně i cytoplazmu neživých buněk červeně. Přítomnost živých buněk jsme ověřovali pomocí fluorescein diacetátu (FDA), který jsme použili jako substrát nespecifických esteráz. Jeho hydrolýzou v živých buňkách vzniká vysoce fluorescenční fluorescein, který se akumuluje v cytoplazmě a buňky barví jasně zeleně (1,2).

Během kultivace dochází k přirozenému odumírání některých buněk ESM, především suspenzorových (kontrola). V průběhu přípravy na zamrazení odumírá množství buněk jak v suspenzorové, tak meristematické části embryí.



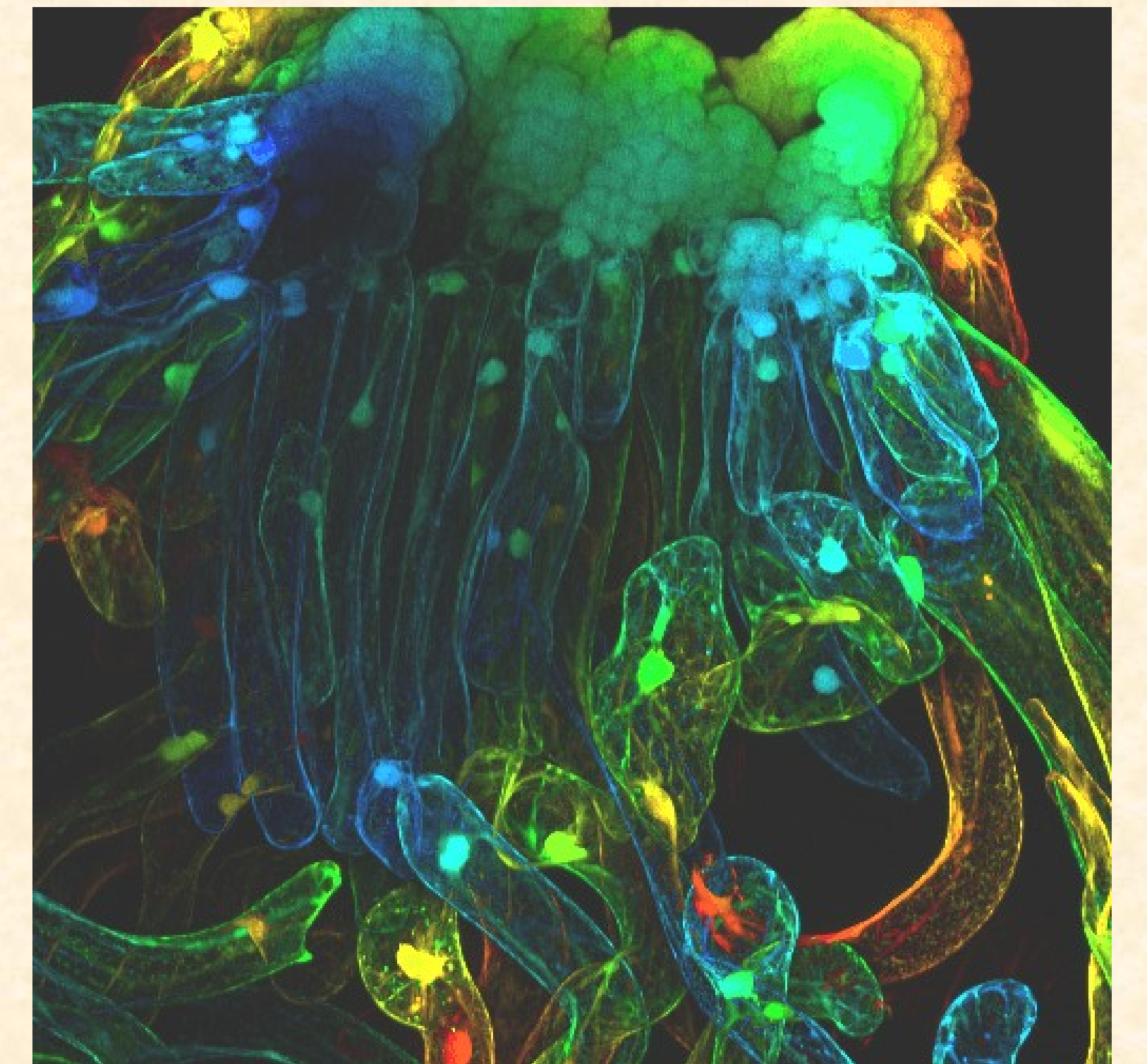
Závěry

-Metoda dvojitěho vitálního barvení fluorescein diacetátem a propidium jodidem umožňuje nejen velmi přesně rozlišit v ESM buňky živé od neživých, ale studovat také jejich vnitřní strukturu.

-Metoda poskytla informace o okamžitém stavu embryogenní kultury během přípravy na zamrazení, krátce po rozmrazení a v průběhu regenerace.

-Použití konfokálního mikroskopu umožňuje vytvořit velké množství optických řezů a složit je do prostorového obrazu. Poskytuje tak informace o větších objektech, které lze obtížně pozorovat pomocí standardního fluorescenčního mikroskopu.

-Kombinace dvojitěho vitálního barvení s konfokální mikroskopií představuje velmi efektivní nástroj k posouzení viability buněk jakéhokoli rostlinného materiálu.



Hlubková projekce vytvořená softwarem konfokálního mikroskopu
Buňky byly počítačově obarveny v závislosti na své poloze v prostoru
(nejblíže jsou modré, nejdál červené)

Materiál a metody

Materiál: 2 linie embryogenní kultury smrku (AFO 541 a C 110), odvozené ze zygotických embryí

Metody: dvojitě vitální barvení fluorescenčními barvivy

Postup: - odebrat 1.5 ml ESM v suspenzi

-obarvit 210 μl ředěného PI

-připravit preparát, vzorek na podložním skle dobarvit 2 kapkami ředěného FDA a pozorovat v mikroskopu ihned, případně nechat několik minut probarvit.

FDA - zásobní roztok fluorescein diacetátu 20 mg/ 10 ml acetonu, ředěný čerstvě před každým barvením destilovanou vodou na konečnou koncentraci 0.02 % (w/v)

PI - zásobní roztok propidium jodidu 1 mg/ml destilované vody, ředěný 100x (2.25 μM)

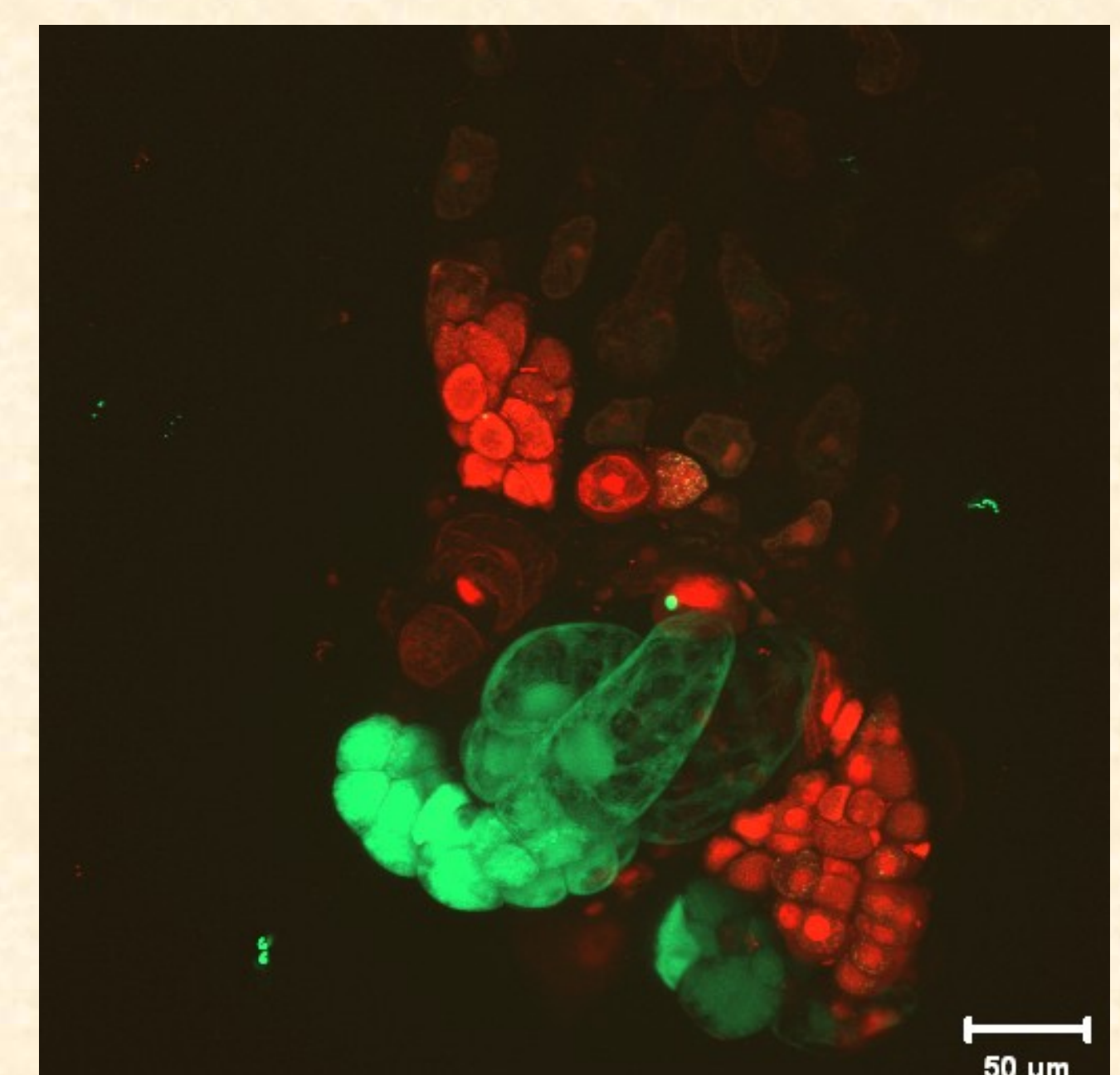
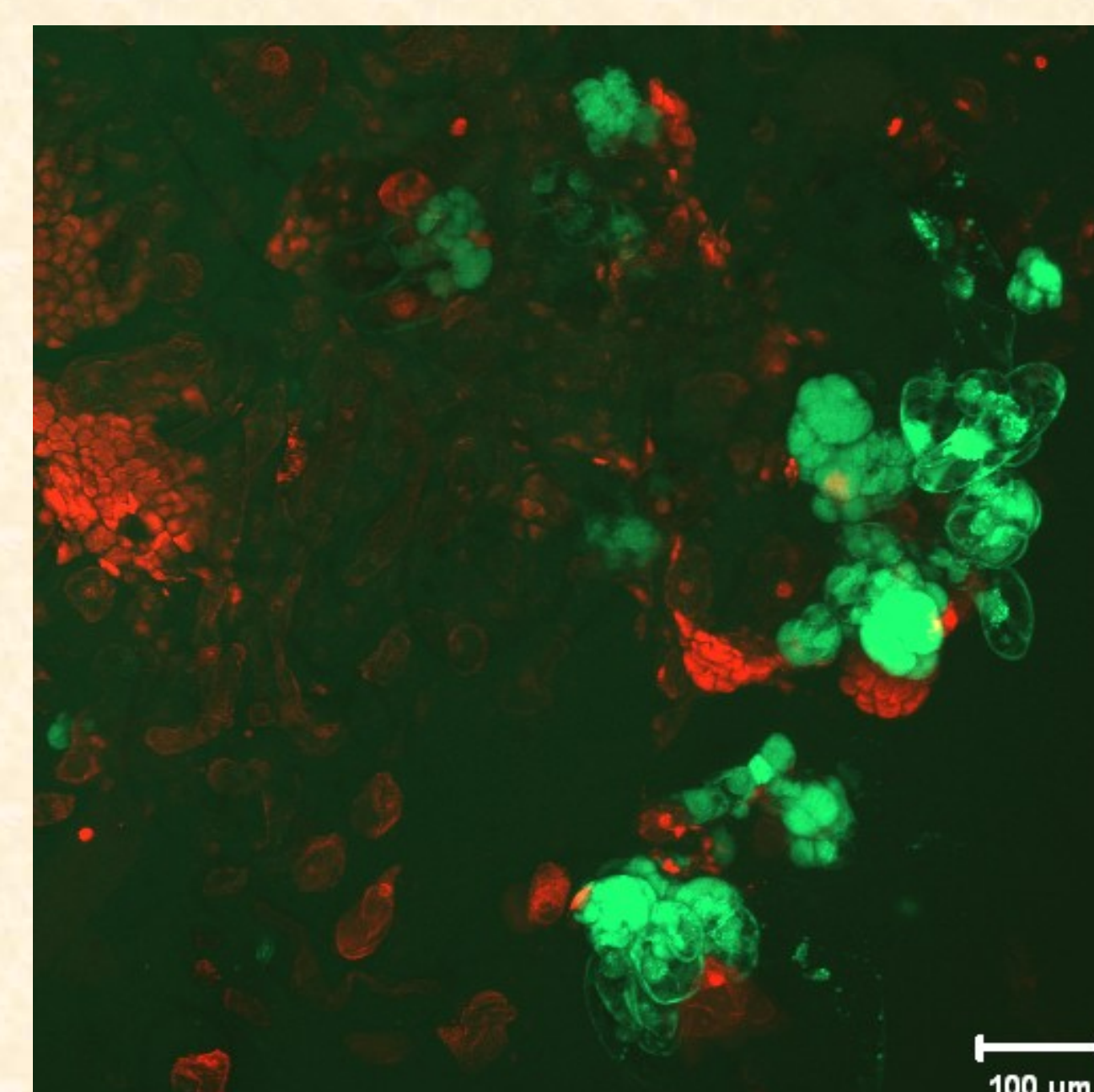
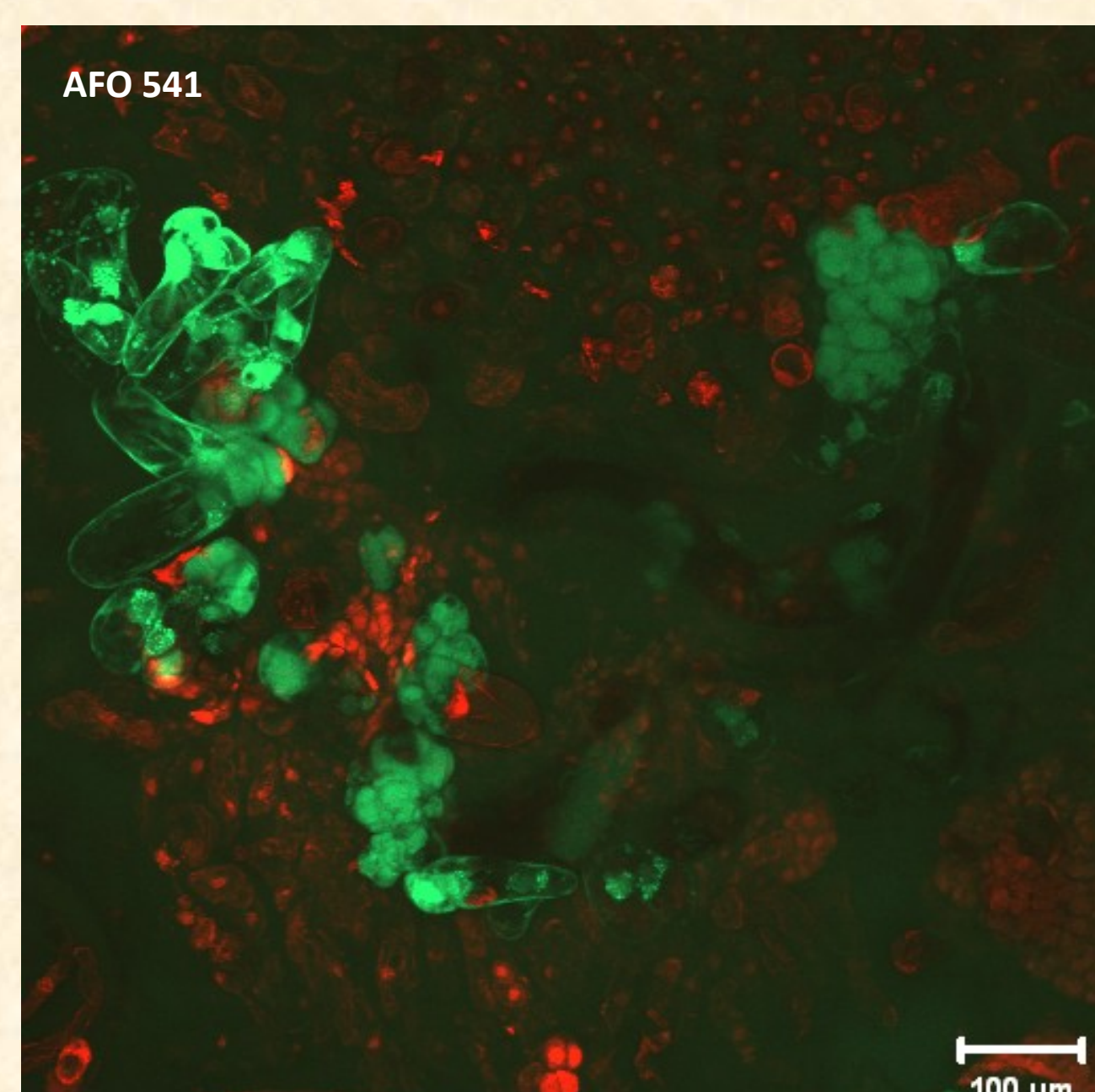
Mikroskopie: K pozorování preparátů jsme použili konfokální mikroskop Zeiss LSM 5 Duo, fluorescein byl excitován argonovým laserem při 488 nm (emisní filtr set LP 505). PI byl excitován DPSS laserem při 561 nm (emisní filtr set LP 575). Ze sérií optických řezů byly softwarem Zeiss LSM 5 Duo vytvořeny prostorové projekce.

Nástrahy a obtíže

Metoda dvojitěho vitálního barvení je velmi rychlá a efektivní, ale má i svá úskalí. Je to především nestabilita naředěného roztoku FDA, který je použitelný jen několik hodin. Nestálý je i signál esterázami vytvořeného fluoresceinu v buňkách po osvětlení v mikroskopu. Během několika minut pozorování dochází k vysvícení především ve velkých vakuolizovaných buňkách s tenkou vrstvou nástěnné cytoplazmy. Naopak v malých meristematických buňkách se může fluorescein akumulovat v takovém množství, že jeho silný signál přesvítí obrazové pole. Díky přítomnosti esteráz, které se uvolňují do média z poškozených buněk, vzniká fluorescein z FDA i mimo buňky a během pozorování tak dochází k výraznému zvyšování pozadí.

Další problém při pozorování kultury představuje velikost raných somatických embryí, která se pohybuje řádově ve stovkách mikrometrů a v jedné rovině zaostření není ve standardním fluorescenčním mikroskopu možné pozorovat celé objekty.

Optimalizací barvení pro daný materiál a využitím konfokální mikroskopie lze tato úskalí úspěšně překonat.



Regenerace ESM po rozmrazení – v embryogenní kultuře jsou přítomna vedle sebe odumřelá somatická embrya (červená) a nová somatická embrya v různých stádiích vývoje (zelená)

Reference:

- Jones, K. H., Senft, J. A.: An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *J Histochem Cytochem* 1985, **33** (1): 77-79
- Petřek, J., Víteček, J., Vlašínová, H., Kizek, R., Kramer, K.J., Adam, V., Klejdus, B., Havel, L.: Application of computer imaging, stripping voltammetry and mass spectrometry to study the effect of lead (Pb-EDTA) on the growth and viability of early somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies* L./ Karst.). *Anal Bioanal Chem* 2005, **383**: 576-586