

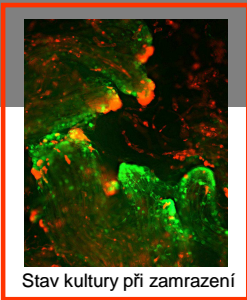


Kryoprezervace embryogenních kultur jehličnanů

Kateřina Eliášová, Zuzana Vondráková, Martin Vágner

Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Rozvojová 263, 165 02 Praha 6 – Lysolaje, ČR

vondrakova@ueb.cas.cz



Stav kultury při zamrazení

Úvod

Proces kryoprezervace je sled přesně definovaných kroků: zamrazení, skladování, rozmrazení a regenerace. Rostlinný materiál je přitom ošetřen tak, aby byl co nejméně poškozen během zamrazování a skladování při teplotách blízkých se -200°C . Po rozmrazení dochází k regeneraci a obnově růstu. Tento způsob uchování rostlinného materiálu poskytuje možnost skladovat dlouhodobě např. geneticky významný rostlinný materiál. Užívá se 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 kryoprezervace je třeba zachovávat přesný postup jednotlivých kroků, které je nutné ověřit zvlášť pro každý rostlinný materiál.

Materiál a metodika

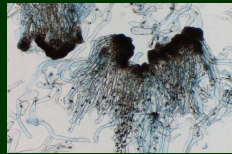
Porovnávali jsme anatomické změny, ke kterým dochází v průběhu kryoprezervace embryogenních linií smrku (*Picea abies*) a jedle (*Abies cephalonica*). Použili jsme roztlačkové preparáty barvené trypanovou modří; viabilitu buněk jsme studovali pomocí fluorescenčního dvojitého vitálního barvení FDA (fluoresceindiacetátem) a PI (propidium jodidem).

Zamrazovali jsme embryogenní suspenzorovou hmotu (ESM) indukovanou ze zygotických embryí. Je tvořena nezralými somatickými embryi, sestávajícími z meristemických center, na která jsou napojeny dlouhé a silně vakuolizované suspenzorové buňky. ESM je kultivována 10 dní v tekutém médiu; 11. a 12. den je vystavena působení sorbitolu (0,2 resp. 0,4M) a 13. den je aplikován DMSO (2%); poté je kultura řízeně ochlazována. V suspenzi kultury dochází k rozvolnění ESM, po aplikaci sorbitolu jsou poškozeny suspenzorové buňky, krátkodobé působení DMSO tento efekt mírně prohlubuje. Takto připravená kultura přesto může být úspěšně zamrazena a skladována v tekutém dusíku. Při rozmrazování je důležité postupovat rychle, především odstranit zbytky kryoprezervantů, zejména DMSO. Následná regenerace ESM trvá několik týdnů.

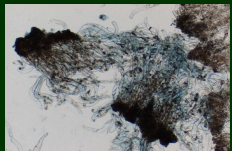
Příprava k zamrazování

embryogenní kultura smrku

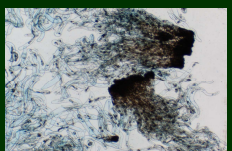
AFO
odolná vůči vnějším zásahům



kultivace v tekutém médiu

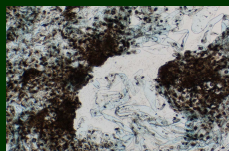
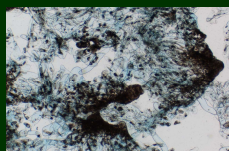
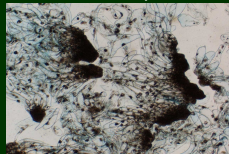


po aplikaci sorbitolu – rozvolnění a poškození suspenzorů



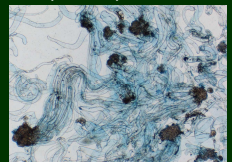
po aplikaci DMSO – rozvolnění a poškození embryí

L2
velmi citlivá k vnějším zásahům

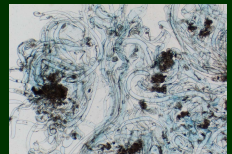


embryogenní kultura jedle

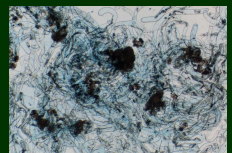
AR21
odolnější vůči vnějším zásahům



kultivace v tekutém médiu

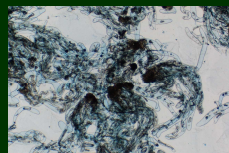
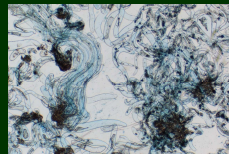
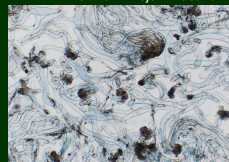


po aplikaci sorbitolu – rozvolnění a poškození suspenzorů



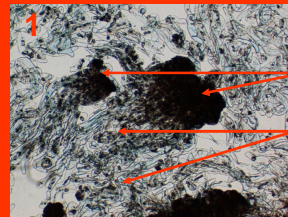
po aplikaci DMSO – rozvolnění a poškození embryí

AR19
citlivá k vnějším zásahům

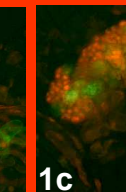
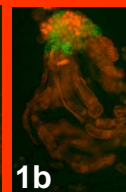
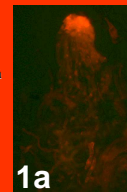


Regenerace po rozmrazení (AFO)

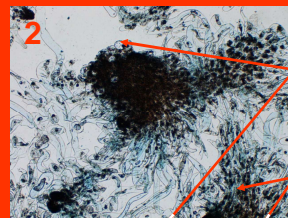
Regenerace AFO trvá asi 3 týdny. U ostatních linií probíhá ve stejných krocích, ale rychlost regenerace se liší.



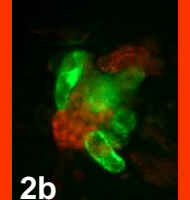
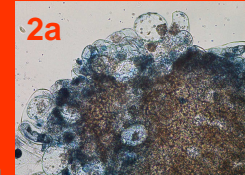
ESM těsně po rozmrazení:
kompaktní meristemická centra
poškozené suspenzorové buňky



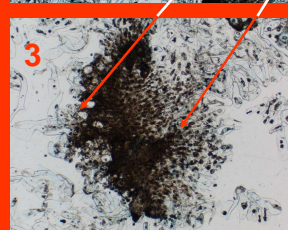
Složení právě rozmrazené ESM v detailu: červeně značené buňky jsou mrtvé, zeleně zbarvené jsou živé



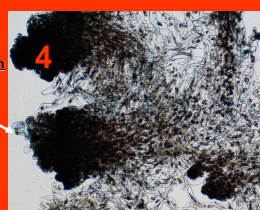
Počátek regenerace:
živé buňky se dělí a prodlužují
rozvolnění meristemických center



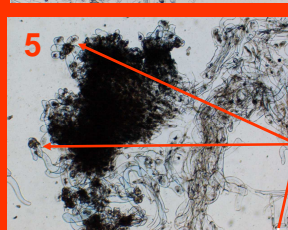
Počátek regenerace v detailu



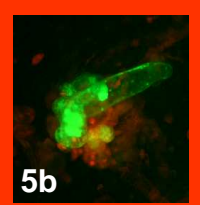
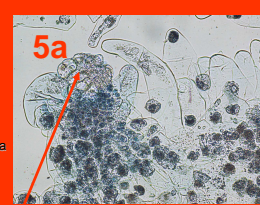
Vytváření jednoduchých somatických embryí



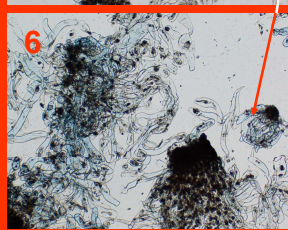
Detail nově vytvořeného somatického embrya



Samostatný vývoj nových somatických embryí
volná somatická embrya



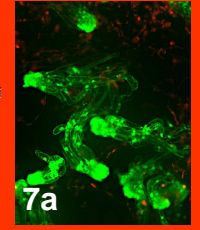
Detail rostoucího somatického embrya



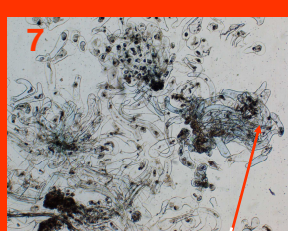
6a



Detail živé rostoucí embryogenní kultury



Detail volného somatického embrya s velkou meristemickou hlavou a bohatým suspenzorem



Úspěšný konec regenerace:
vytvářejí se polyembryonická centra a embryogenní kultura vstupuje do vývojové fáze proliferace
embrya, která nepřežila zamrazení se rozpadají

Závěry

- použitý postup kryoprezervace je vhodný pro embryogenní kultury smrku i jedle
- zamrazení nepřežívají celá somatická embrya, ale jen jejich části
- v průběhu zamrazování jsou poškozeny nejvíce suspenzorové buňky, v meristemických centrech přežívají jednotlivé buňky nebo skupiny buněk
- po rozmrazení dochází k regeneraci embryogenní kultury – z živých buněk se vyvíjejí somatická embrya a později i polyembryonické komplexy
- množství živých buněk po rozmrazení se liší u jednotlivých embryogenních linií; jejich odolnost vůči působení sorbitolu a DMSO je daná fyziologickým stavem kultury, anatomickou stavbou, rozpadavostí kultury atd.
- schopnost regenerovat a rychlost regenerace se liší u jednotlivých linií; je závislá nejen na množství živých buněk po rozmrazení, ale i na vlastnostech každé linie – obecně na rychlosti růstu a na velikosti limitního množství buněk nutných pro zahájení vývoje embryí a následnou proliferaci

Tato práce byla podporována grantem COST 871, OC 158, poskytnutým MŠMT ČR.