Przebudowa cytoplazmy jako droga pokonania bariery stresu niskiej temperatury

Anna Mikuła, Kinga Górska, Jan J. Rybczyński

Ogród Botaniczny Polskiej Akademii Nauk Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej, ul. Prawdziwka 2, 02-973 Warszawa
obpan@ikp.atm.com.pl

WSTĘP

Krioprezerwacja jest obecnie powszechnie wykorzystywaną metodą przechowywania materiału biologicznego w niezmienionym stanie. Może być stosowana także do zachowania embriogennego charakteru tkanki kalusowej pochodzącej z kultur *in vitro*. Dla uzyskania odporności komórki na stres niskiej temperatury poddaje się ją różnego typu manipulacjom. Jedną z dróg jest podniesienie stężenia sacharozy w pożywce, czego konsekwencją jest przeorganizowanie protoplastu.

Celem badań było określenie wpływu przebudowy cytoplazmy komórek PEM-u na przeżywalność tkanki po traktowaniu LN_2.

MATERIAŁ I METODY

Materiałem do badań była embriogenna tkanka kalusowa (PEM) pochodząca z zawiesin komórkowych *Gentiana tibetica* (8-letniej) i *G.kurroo* (1-rocznej), inicjowanej z hypokotyla. Kultury prowadzono w zmodyfikowanej, płynnej pożywce MS (1962) zawierającej: 1.0mg/l dicamby, 0.1mg/l NAA, 2.0mg/l BAP, 80.0mg/l siarczanu adeniny, z 3, 6 i 9% sacharozą. Badań mikroskopowych i mrożenia PEM-u z wyższych stężeń sacharozy, dokonywano po minimum 4-tygodniach przebywania tkanki w pożywce z 6 lub 9% sacharozą.

Tkankę do obserwacji w mikroskopie świetlnym i elektronowym transmisyjnym przygotowywano wg procedury opisanej przez Mikuła i wsp. (2001). Pochodziła ona z pożywki zawierającej 3, 6 i 9% sacharozę.

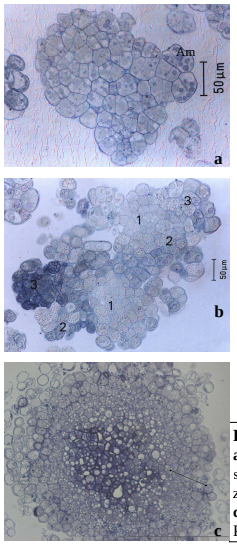
Tkankę kalusową do mrożenia pobierano z kultur będących w 6 lub 7-dniu po pasażu. Umieszczano ją w ciekłym azocie stosując program powolnego schładzania od +20°C do -40°C co 1°C, bez dodatkowej krioochrony lub poddając komórki uprzednio plazmolizie. Plazmolizy dokonywano dwustopniowo poprzez zanurzenie tkanki w 0,5M, a następnie 1M roztworze sacharozy. Po rozmrożeniu splazmolizowanych komórek, tkankę umieszczano bezpośrednio w pożywce z 6% sacharozą na 5 i 24 godziny. Komórki rozmrażano przez zanurzenie mikroprobówek w łaźni wodnej o temp. 37°C na 10 min. Oceny przeżywalności tkanki dokonywano barwiąc ją 0,4% TTC rozpuszczonym w buforze fosforanowym o pH 7,4.

Mikuła A., Rybczyński JJ., Tykarska T., Kuraś M. 2001. Biol. Biul. of Poznań 38 (1): 47-53.

WYNIKI

I. Zmiany w masie praembriogennej (PEM) obserwowane w mikroskopie świetlnym

Fot. 1.

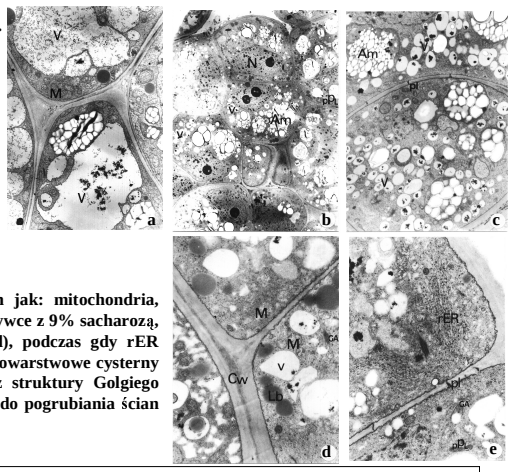


Podniesienie stężenia sacharozy z 3% (Fot. 1a) do 6 i 9% spowodowało zmniejszenie wielkości komórek oraz znaczne zwiększenie zawartości skrobi skupionej w amyloplastach. W agregatach zawiesiny *G. tibetica*, hodowanych w podwyższonym stężeniu sacharozy w pożywce (Fot. 1b), stwierdzono obecność trzech grup komórek: (1) intensywnie dzielących się, małych, ściśle do siebie przylegających, z drobną skrobią; (2) zawierających mniejsze, lecz bardzo liczne amyloplasty i (3) komórek większych, luźno ułożonych, z dużymi amyloplastami. W agregatach *G. kurroo* wykazujących strefowy układ komórek, zwiększenie ciśnienia osmotycznego w pożywce przyczyniło się do powiększenia strefy komórek małych, intensywnie dzielących się, zawierających liczne amyloplasty (Fot. 1c).

Fot. 1.
a) Komórki PEM-u *G.tibetica* pochodzące z pożywki z 3% sacharozą; **b)** Grupy komórek PEM-u *G.tibetica* (1-3) z różną zawartością amyloplastów (6% sacharoza);
c) Powiększona strefa intensywnie dzielących się komórek w PEM-ie *G.kurroo* (6% sacharoza) bar=200µm

II. Zmiany w komórkach PEM-u obserwowane na poziomie ultrastruktury

Fot. 2.



Na poziomie ultrastruktury w komórkach PEM-u hodowanych w pożywce z 3% sacharozą, stwierdzono występowanie wielu, różnej wielkości wakuol (Fot. 2a). Podniesienie stężenia sacharozy prowadziło do silnego zagęszczenia cytoplazmy, rozbicia często centralnie położonych, dużych wakuol na wiele drobnych oraz zwiększenia liczby i silnego rozbudowania amyloplastów (Fot. 2b,c).

Wielkość organelli komórkowych takich jak: mitochondria, struktury Golgiego i ciała lipidowe w pożywce z 9% sacharozą, uległa znacznemu zmniejszeniu (Fot. 2d), podczas gdy rER było bardzo rozbudowane i tworzyło wielowarstwowe cysterny (Fot. 2e). Aktywnie produkowane przez struktury Golgiego pęcherzyki wakuolarne, przyczyniały się do pogrubiania ścian komórkowych.

Fot. 2.
a) Ultrastrukturalny obraz komórek PEM-u z pożywki z 3% sacharozą zawierających duże wakuole (V) (pow. 4000x); **b)** Ultrastrukturalny obraz fragmentu agregatu komórkowego. Widoczne duże amyloplasty silnie upakowane skrobią (Am), liczne proplastydy (pPl) oraz bardzo liczne lecz drobne wakuole (V) (pow. 1400x); **c)** Liczne, małe wakuole (V) ze złogami elektronowo gęstej substancji wewnątrz oraz połączenia plasmodesmowe pomiędzy sąsiednimi komórkami (Am-amyloplast) (pow. 4000x); **d)** Zagęszczona cytoplazma z licznymi ciałami lipidowymi i bardzo małymi wakuolami (V), widoczne mitochondria (M) i struktury Golgiego (GA) (pow. 10000x); **e)** Silnie rozbudowane szorstkie retikulum endoplazmatyczne (rER) (GA-struktury Golgiego, pPl-proplastydy, pl-plasmodesmy) (pow. 10000x);

III. Przebudowa cytoplazmy a krioprezerwacja PEM-u

Obserwowane zmiany związane z przeorganizowaniem cytoplazmy bezpośrednio przyczyniły się do zwiększenia tolerancji tkanki na stres niskiej temperatury. Wraz z podniesieniem stężenia sacharozy w pożywce stwierdzono wzrost przeżywalności tkanki po mrożeniu (Tab. 1). Podobną reakcję obserwowano również po zastosowaniu plazmolizy (Tab. 2). Jednocześnie komórki hodowane w pożywce z 6 i 9% sacharozą wykazywały większą tolerancję na uszkodzenia zachodzące w czasie deplazmolizy (Tab. 2).

Tab. 1. Przeżywalność PEM-u w zależności od stężenia sacharozy w pożywce, bez dodatkowej krioochrony (w %). Barwienie TTC przeprowadzono bezpośrednio po rozmrożeniu tkanki

Gatunek	3% sacharoza	6% sacharoza	9% sacharoza
G.tibetica	1,37 ±0,18	25,85 ±1,69	62,83 ±0,76
G.kurroo/H	1,10 ±0,11	39,88 ±1,22	57,89 ±0,62

Tab. 2. Wpływ stężenia sacharozy w pożywce na przeżywalność PEM-u *G. tibetica* poddanego uprzednio plazmolizie 1M sacharozą (w %)

Stężenie sacharozy w pożywce	Przeżywalność PEM-u (w %)			
	po plazmolizie*	po mrożeniu		
		bezpośrednio po rozmrożeniu **	po 5 godz w kulturze[1]	po 24 godz w kulturze[1]
3%	97,25 ±2,38	37,59 ±0,61	0,35 ±0,16	0
6%	100,00 ±2,07	77,79 ±2,06	20,32 ±0,53	6,8 ±0,48
9%	95,36 ±1,48	92,00 ±0,89	25,07 ±0,19	19,82 ±0,88

* tkanka nie mrożona; ** barwienie TTC wykonano ok. 30 min. od rozmrożenia tkanki
[1] tkankę bezpośrednio po rozmrożeniu umieszczano w pożywce płynnej z 6% sacharozą (bez stopniowej deplazmolizy)

WNIOSKI:

Długotrwałe (min. 4-tygodnie) podniesienie stężenia sacharozy w pożywce płynnej prowadziło do:

1. **przebudowy cytoplazmy komórek badanych zawiesin;**
2. **zwiększenia tolerancji komórek na stres niskiej temperatury;**
3. **zwiększenia tolerancji komórek na deplazmolizę.**