

Zárójelentés

A pályázat célja a növényi petesejtek ill. zigóták krioprezerválási módszerének kidolgozása volt gabonaféléken.

A krioprezerválás során különböző növényi részeket fagyasztunk és tárolunk folyékony nitrogénben (-196°C) úgy, hogy azok a felolvasztás után visszanyerik életképességüket. Ennek érdekében egyfelől meg kell akadályozni a fagyáskor bekövetkező túlzott mértékű vízvesztést, másfelől a nagyfokú intracelluláris jégképződést, mely irreverzibilisen károsíthatja a membránintegritást és ezen keresztül a sejt pusztulásához vezethet. Mindezek elkerülésére sok esetben még a hűtés előtt egy adaptációs kezelést is alkalmaznak, ami egyrészt csökkenti a minták relatív szabad víztartalmát, másrészt membránstabilizáló szerepük is lehet, ill. védelmet biztosíthatnak bizonyos fehérjék denaturációja ellen. A hűtés során a különböző krioprotektor anyagok (glicerin, DMSO, stb.) alkalmazásával megakadályozható a nagyméretű intracelluláris jégkristályok képződése, ugyanakkor ezen anyagok bizonyos toxicitással is rendelkeznek az élő anyagra nézve. A fagyasztás sebessége is nagymértékben meghatározza a sejtek túlélési képességeit. Túlságosan lassú hűtés esetén a sejtek sok vizet veszítenek és kiszáradnak, míg az optimálisnál gyorsabb fagyáskor olyan nagyméretű jégkristályok képződnek a sejtekben, melyek már a membránok károsodását idézik elő. Pillanatszerű fagyás (vitifikáció) során nincs intracelluláris jégképződés, viszont nagy koncentrációjú (és emiatt gyakran toxikus) krioprotektor anyagok jelenléte szükséges. A krioprezerváció sikeresség szempontjából fontos a felolvasztás és rehidratáció körülményeinek pontos meghatározása is, mert a sejtek károsodása nagyon gyakran ebben a fázisban következik be.

Mivel mindeztől ellentétben az állati petesejtekkel, növényi petesejtek ill. zigóták mélyhűtésére kidolgozott módszer nem állt rendelkezésre, munkánk kiindulásaként a növényi szövet- és sejtuszuspenziókra, protoplasztokra kidolgozott krioprezervációs irodalmi adatokra hagyatkozhattunk. Sajnos azonban a különböző sejt ill. szövetfélések krioprezerválhatóságában alkalmazott módszerek igen eltérőek voltak, ezért az ozmotikusan és a tápközeg összetételére igen érzékeny növényi gaméták krioprezervációjának módszerének kidolgozásához az egyes lépések (adaptációs közeg összetétele, adaptációs ideje és körülményei, a fagyasztás és a rehidratáció módja) hatásait egymás után tesztelve tudtuk csak meghatározni a krioprezerváció optimális körülményeit.

I. Növényi petesejtek és zigóták krioprezervációs módszerének kidolgozása

A protoplasztok ill. növényi sejtuszuspenziók fagyasztásra történő felkészítéséhez adaptációs közegként ill. krioprotektáns anyagokként gyakran alkalmaztak prolint, szorbitolt, glicerolt ill. DMSO-t. Ezek a vegyületek egyrészt csökkentik a sejtek vízpotenciálját, másrészt stabilizáló szerepük révén védelmet biztosítanak a jégképződésekkel szemben. Így első lépésben mi is ezeket a vegyületeket próbáltuk alkalmazni a növényi petesejtek krioprezervációjához. A krioprezerváció sikerességét életképességi teszt (FDA festés) segítségével határoztuk meg.

Eredmények:

I. 1. Az adaptációs közeg összetételének optimalizálása

A petesejtek izolálására használt oldatban (0.4 M mannitol, 0.2 M glükóz + 2 mM CaCl₂) a petesejtek 100%-a legalább 4-6 órán keresztül életben tartható különösebb károsodás nélkül. 24 óránál hosszabb idejű *in vitro* tároláshoz már megfelelő tápközeg szükséges, mely

biztosítja a petesejtek ill. zigóták tápanyagellátását, anyagcseréjéhez, növekedéséhez szükséges biogén faktorokat.

Amikor a 600 mOsmolaritású izoláló oldathoz 0.3 M prolint adtunk, ezáltal az oldat ozmolaritása közel 1000 mOsmol-ra növekedett, az izolált petesejtek víztartalma jelentős mértékben csökkent (térfogatának 44 %-t elveszette), miközben a petesejtek legalább 65%-a életképes maradt a kezelést követően (1. és 2. ábra). A sejtek ozmotikus potenciáljának növelésére (vízpotenciál csökkentésére) használt szorbitol alkalmazása a petesejtek életképességét drasztikusan csökkentette (0.3 M szorbitol kezelést a petesejtek 40%-a, 0.5 M szorbitol kezelést a petesejtek 30%-a élte túl), így ezen vegyület hosszú távú alkalmazhatósága a krioprezerváció során megkérdőjelezhető a búza petesejtek esetében.

Az adaptáló közeg összetételének megváltoztatása (30% glicerolt és 10 % szacharózt tartalmazó oldatra) jelentős javulást eredményezett a petesejtek túlélését tekintve. Az eddig elért 65%-os túlélési arány 78%-ra emelkedett. Ugyanakkor ezen oldatkombináció lényegesen nagyobb ozmolaritású (2000-3000 mOsmol közé tehető, de pontos meghatározása ilyen töménység mellett még ozmóméter segítségével is nehézkes), mint a korábban alkalmazott prolin ill. prolin-szorbitol keverék. A 30% glicerolt és 10 % szacharózt tartalmazó oldatkombináció alkalmazásával igen jelentős, 60%-s térfogatcsökkenés volt elérhető, amellett, hogy a petesejtek döntő többségénél a membránok épsége megőrződött (9. ábra). Ugyanakkor a rehidratáció során ezen sejtek eredeti térfogata jelentős részben visszaállítható volt (lásd később). Mindezzel arra utal, hogy a glicerol-szacharóz oldat igen hatékony membránvédő funkciót lát el a búza petesejtek esetében.

Aszkorbinsav alkalmazása az adaptáció során egyértelműen pozitívan befolyásolta a petesejtek túlélését úgy a prolint, prolin-szorbitolt, mint a glicerol-szacharózt tartalmazó tápközegben. Az aszkorbinsav védő szerepének felderítésére meghatároztuk, azt az aszkorbinsav koncentrációt, mely alkalmazásával a petesejtek túlélési aránya növelhető. Ennek alapján a 120-150 mM aszkorbinsav tartalom mellett jelentős javulás érhető el a petesejtek túlélésében (8-20%-al nőtt az életképes petesejtek száma adaptációs közegben), míg az aszkorbinsav koncentrációjának növelése további javulást már nem eredményezett (2. és 3. ábra) egyik adaptációs közegben sem. Az aszkorbinsav fiziológiai hatásának vizsgálata során megállapítottuk, hogy kedvező hatása nemcsak az adaptáció során mutatkozik meg, hanem még kifejezettebb a fagyasztást követő rehidratáció folyamán (lásd később).

I.2. Az elkezelt idejének meghatározása

Mindezek után meghatároztuk az adaptációs kezelés optimális idejét. Mivel a protoplasztok esetében az adaptáció akár több napon keresztül is tarthatott, ugyanakkor a petesejtek izoláltan csak rövid ideig életképesek éhezés és károsodás nélkül, úgy gondoltuk a petesejtek esetében a protoplasztokhoz képest sokkal rövidebb idejű adaptálást kell alkalmazni. Tapasztalataink azt mutatták, hogy a relatíve kisebb ozmolaritású (1000-1700 mOsmol) terhelést jelentő kezelések esetében is a petesejtek életképessége 30 perces kezelést követően már drasztikusan lecsökken. A kezelés optimális időtartama 10-15 min volt (4. ábra). Ugyanakkor a nagyobb ozmotikus terhelést jelentő glicerol-szacharóz kombinált oldat alkalmazása még ennél is rövidebb idejű (1-5 perc) kezelést tett szükségessé. Éppen ezért ez utóbbi esetben a bár rövid idejű, de mégis hirtelen ozmotikus sokkot előidéző kezelés helyett a következő alkalmazási módra tértünk át: a petesejteket tartalmazó izoláló oldat 7.5 µl-éhez 2.5 µl glicerol-szacharóz kombinált oldatot adtunk, így ennek arányát 25%-ra emeltük, majd 1 perc múlva további 27.5 µl hozzáadásával a glicerol-szacharóz oldat arányát 80%-ra növeltük. Ugyanezt a technikát alkalmaztuk a későbbiekben akkor is, amikor a glicerol-szacharóz kombinált oldatot kiegészítettük különböző krioprotektáns anyagokkal (DMSO, PG).

I.3. Krioprotektáns anyagok kiválasztása

Irodalmi adatok azt mutatták, hogy protoplasztok, sejtszuszpenziók esetében is gyakran alkalmaztak DMSO-t, PG-t krioprotektáns anyagként. Éppen ezért mi is megvizsgáltuk ezen anyagok hatását a petesejtek túlélésére. Tapasztalataink azt mutatják, hogy glicerol és prolin jelenlétében alkalmazott 0.5 M-s DMSO kezelés hatására az él petesejtek száma a felére csökkent, ettől nagyobb koncentrációjú DMSO kezelés már olyan minimálisra csökkentette a petesejtek túlélési valószínűségét, hogy alkalmazásuk megkérdőjelezhető. Ezekhez a vizsgálatokhoz hasonlóan, amikor a 30% glicerol-10% szacharóz tartalmú oldathoz 5, 10 ill. 15 % DMSO-t is tettünk a petesejtek túlélési képessége drasztikusan csökkent (10% alá). Ugyanakkor ugyanilyen mértékű PG alkalmazása mellett a petesejtek több, mint 40%-a életképes maradt (3. ábra). Mindkét kísérletsorozat eredménye azt mutatta, hogy a DMSO, ellentétben számos szomatikus növényi szövettel és sejttel, igen toxikus hatású a petesejtekre, és csak kis koncentrációban és megfelelő körülmények között (lassú fagyasztás, lásd később) alkalmazható. A PG-nak ilyen drasztikus kedvezőtlen hatása nincs, bár a PG koncentrációjának növelésével 5-től 15%-ig a petesejtek túlélési aránya a fagyasztást követően itt is csökken (8. ábra).

I.4. H mérséklet hatása az elvezetések sikerességére

Irodalmi adatok alapján ismert, hogy az alacsony hőmérséklet csökkenheti a krioprotektáns vegyület sejtekre gyakorolt toxikus hatását. Éppen ezért megvizsgáltuk a hőmérséklet hatását a petesejtek túlélésére. A legsikeresebb oldatkombinációt (30% glicerol+ 10% szacharóz + 5% PG) mutató adaptációs kezelést elvégeztük szobahőmérsékleten, ill. 0 °C-on (jégen tartva), és a kezelések hatására megállapítható volt, hogy az alacsony hőmérséklet, mintegy 24% -al megemelte a 10 perces adaptációt követő petesejtek számát (5. ábra).

I.5. Fagyasztási procedúra

Krioprezerválási folyamatokban általában kétféle módszert ill. ezek kombinációit alkalmaznak sikeresen. Az egyik a lassú, programozott hőmérséklet, a másik egy gyors, hirtelen folyékony N₂-be történő helyezéssel pillanatszerű fagyasztás, az ún. vitrifikáció. Gyakran használják azt a technikát is, hogy egy kezdeti lassú hőmérséklet után a kritikus fázisátalakulási pont alá érve (-8 - -10°C) a mintát folyékony N₂-be (LN₂) helyezik. Mindhárom módszer alkalmazhatóságát teszteltük.

Lassú programozott hőmérséklet: 0- -8°C-ra hőmérséklet 0.5 °C/perces sebességgel, -8 °C-on tároltuk 20 percig, majd hőmérséklet 0.5 °C/perces sebességgel -30 °C-ra. Utána azonnal folyékony N₂-be helyeztük a mintákat.

Lassú és gyors hőmérséklet kombinációja: 0 - -8°C-ra hőmérséklet 0.5 °C/perces sebességgel, majd LN₂-be helyezés

Vitrifikáció: Egy lépésben gyors hőmérséklet LN₂-ben.

Fagyasztás előtt a petesejteket vékony műszalmába helyeztük, majd 0 °C-on tároltuk a fagyasztási procedúra megkezdése előtt. Az eljárás végén a műszalmában lévő petesejteket, tartalmazó cseppeket LN₂-ben tároltuk. A fagyasztás sikerességét felolvasztás után FDA teszt segítségével vizsgáltuk. Ehhez a LN₂-ben tárolt petesejteket, tartalmazó műszalmákat 40 °C-s vízfürdőbe helyeztük 1 percre, majd szobahőmérsékleten tároltuk még 5 percig. Utána a petesejteket eltávolítottuk a műszalmából, és FDA teszt segítségével meghatároztuk az életképes petesejtek számát (7. ábra).

Problémát jelentett, hogy a petesejtek a m szalmák falához tapadtak a kezelési-fagyasztási folyamat során, megakadályozva ezzel azok visszanyerhet ségét. A probléma megoldása érdekében 1% borjúsérumot (BSA), illetve 1% PVPP-t adtunk az alkalmazott oldatokhoz. Úgy t nt, hogy a petesejtek esetében a BSA sikeresebben akadályozta meg a petesejtek kitapadását, mint a PVPP, mivel a borjúsérum hatására a sejtek m szalmából való visszanyerhet sége 65,5 %-kal megn tt.

A m szalma használata a lassú, programozott és kombinált h tési módszernél elengedhetetlen volt, ugyanakkor a vitrifikációs eljárás során alkalmaztuk azt a technikát is, hogy a petesejteket tartalmazó oldat cseppjeit közvetlenül LN₂-be helyeztük.

A prolint, glicerolt, DMSO-t és aszkorbinsavat tartalmazó el kezeléseket során a lassú h tés ill. a lassú h tés követ gyors fagyasztás a petesejtek 8±3% ill. 12±3%-ának túlélését eredményezte. A vitrifikáció ebben az adaptációs közegben nem járt sikerrel, 2% körüli túlélést mutatott (7. ábra). Ezzel ellentétben az igen nagy ozmolaritású (glicerol-szacharóz-PG-Asc) oldat alkalmazásakor a vitrifikáció mutatkozott a leghatékonyabbnak: 1 órával a sejtek felolvasztása és rehidratációja után 5% -os PG koncentráció esetén 12.7; 10%-os PG esetén 7.34%-os, ill. 15%-os PG-nél 3.25% volt a túlélési arány (8. ábra).

I.6. Petesejtek rehidratációja

Folyékony N₂-ben történt tárolás után a sejteket több lépésen keresztül rehidratáltuk.

A lassú h tési eljárással fagyasztott sejteket, miután eltávolítottuk a m szalmából, az izoláló oldat több lépésen (4-5, 5 min lépésenként) keresztüli hozzáadásával rehidratáltuk. Ezt követ en határoztuk meg FDA teszt segítségével az életképes sejtek számát (7. ábra).

Vitrifikációval történt fagyasztás esetén el ször 4:1 arányú ((30% glicerol + 10% szacharóz + 120 mM Asc) : izoláló oldat) elegyet adtunk a petesejtekhez 15 percre a PG eltávolítása érdekében, majd az oldat ozmolaritását izoláló oldat hozzáadásával csökkentettük 5 percenként 4-6 lépésen keresztül. A folyamat végén, 1 órával a rehidratálás után kaptuk meg a fentebb említett 12.7%-os túlélési arányt. Ugyanakkor meg kell említeni azt is, ebben az állapotban a közeg ill. a petesejtek ozmotikus potenciálja magasabb maradt, mint a krioprezerválás megkezdése el tt, de az ozmotikus potenciál további csökkentése már kedvez tlenül hatott a petesejtek túlélési képességére. Mindezek alapján nem zárható ki, hogy a krioprezerválás során a petesejtekben egy újabb ozmotikus egyensúly alakulhatott ki. Ennek igazolása további vizsgálatokat igényel.

I.7. Zigóták krioprezervációja

A petesejtek esetében legsikeresebbnek mutatózó krioprezervációs eljárást adaptáltuk búza zigótákra is. Ennek során az adaptációs fázisban, az izoláló oldatban lev zigótákhoz 25%-ban 30% glicerolt + 10% szacharózt + 5% PG-t és 120mM aszkorbinsavat tartalmazó oldatot adtunk 5 percre, majd ennek az oldatnak az arányát 80%-ra emeltük (+10 min). Ezután vitrifikációs eljárással fagyasztottuk a sejteket, majd rehidratáltuk a fentebb leírt módon. Eredményeink azt mutatják, hogy a zigóták 27.5%-a életképes maradt a felolvasztást követ 1 óra múlva, ami lényegesen jobb eredmény a petesejtek esetében kapotténál.

Tapasztalataink azt mutatták, hogy a zigóták esetében az adaptációs szakasz idejének növelése (5, ill. 10 min-re) megnövelte a zigóták túlélési gyakoriságát. Ez valószínűleg abból adódik, hogy a már sejtfallal rendelkező zigótákban a krioprotektáns anyagok bejutása lassabban megy végbe, mint a sejtfallal nem rendelkező petesejtekben.

Ugyanakkor hasonlóan a petesejtekhez itt is megfigyeltük azt a jelenséget, hogy a rehidratáció során bár a zigóták sejttérfogata az eredeti 85 %-ára visszatért és a citoplazmaáramlás is

megindult, a zsigóták nagyobb ozmoralitású tápközeget igényeltek életben maradásukhoz, mint izolálásukkor.

II. Strukturális vizsgálatok

A sikeres krioprezerválási módszer kidolgozása után megvizsgáltuk, hogy a krioprotektor anyagok ill. a mélyhűtés előidéz-e morfogenetikus, finomszerkezeti változásokat a petesejtben ill. zsigótákban.

Ennek érdekében nyomon követtük a petesejtek térfogatváltozásait az egyes dehidratációs és rehidratációs lépések során.

A mintát a 9. ábra is mutatja a 30% glicerolt + 10% szacharózt + 5% PG-t tartalmazó oldattal történő dehidratáció jelentős mértékű térfogatcsökkenést eredményezett, ami lényegében a kezelést követő 2 perc alatt lezajlott. Ezután a sejtek térfogata tk. állandó maradt. Rehidratáció során kezdetben egy gyors nagymértékű térfogat-növekedés volt a jellemző a sejtekre, majd a térfogat-növekedés 10 perc után egyenletessé vált, míg a sejtek vissza nem nyerték eredeti térfogatuk 85-90%-át. Az aszkorbinsav kedvező hatása a sejtek térfogatváltozásában a dehidratációs szakaszban nem, de a rehidratáció során egyértelműen megmutatkozott. A 120 mM aszkorbinsavval kiegészített oldatokban a sejtek vízvesztésének mértéke nem tért el szignifikánsan az aszkorbinsavat nem tartalmazó oldatoknál megfigyeltétől. Ezzel szemben az aszkorbinsav csökkentette a víz beáramlásának sebességét a rehidratáció korai szakaszában, ezzel csökkentve annak lehetőségét, hogy a rehidratáció folyamán a külső, folyamatosan csökkenő ozmolaritású oldatból a sejtek rövid idő alatt jelentős mennyiségű vizet vegyenek fel, és membránsérüléseket szenvedjenek el (9. ábra).

Strukturális vizsgálatok (10. ábra) azt mutatták, hogy a dehidratációt megelőzően az izotóniás oldatban a petesejtek alakja gömbszerű, belső szerkezetük és a citoplazmamozgás megfigyelhető. Az adaptáló közeg ill. krioprotektáns anyag (30% glicerol + 10% szacharóz + 5% PG) hatására a sejtek térfogata jelentős mértékben lecsökkent, a plazmamembrán feszessége megszűnt, a sejtsejtszervecskéik a térfogatcsökkenés és a sejtmembrán gyűrűsége miatt nem voltak tisztán megkülönböztethetők és a citoplazma mozgása is megszűnt. A 15 perces unloading kezelés, mely során eltávolítottuk a PG-t nem okozott érdemi strukturális változást, hiszen ozmolaritása lényegében nem változott. Az izotóniás oldattal történő rehidratálás során a petesejtek a 4.-5. lépés után nyerték vissza eredeti gömbszerű alakjukat, és a rehidratáció végén a citoplazma mozgása is újra láthatóvá vált.

Izolált búza petesejtek és zsigóták meggyantába történő beágyazása után végzett finomszerkezeti vizsgálatok egyrészt megerősítik a prompt vizsgálatok eredményeit, másrészt további információkkal szolgálnak: a kezelt petesejtek az izolálás után gömbszerű alakot mutattak, sejtmagjuk viszonylag nagy, központi helyzetű volt, benne erőteljesen festődő sejtmagvacskával (11. ábra). Citoplazmájuk denz, sötét és egyenletesen festődő. Benne az organellumok (lipidtestek, mitokondriumok, amiloplasztok) egyenletesen helyezkedtek el. A citoplazma, főként annak külső, sejtthártya felé eső része gazdagon vakuolizált.

Az élő, teljes krioprezervációs procedúrán (adaptáció, uploading, fagyasztás, downloading, rehidratálás) átesett petesejtek finomszerkezeti képe azonban kissé eltért a fagyasztás nélküli sejtektől. A sejtek gömbszerű alakja a rehidratáció után beágyazott mintán többé-kevésbé ismét megfigyelhető, a sejtthártyán sérülések nyoma nem látható. Ugyanakkor a sejtek citoplazmájának szerkezete megváltozott: az organellumok a plazma sejtmag körüli részen koncentráálódtak, míg a perifériális részen megjelent egy világosabban festődő, organellumokat és vakuolumokat alig tartalmazó, világosabban festődő citoplazmarégió. A jelenség oka valószínűleg a krioprezervációs folyamat során lejátszódott nagymértékű vízvesztésben keresendő: a dehidratáció során a citoplazma igen koncentrálttá válik, majd a

rehidratáció alatt nagymértékű vízfelvétel mintegy kihígítja a plazma külső részét, sejthártya felé es

A krioprezervációt túl nem élő sejtek finomszerkezete jelentős károsodásokat mutat (11. c ábra): a rehidratáció során gömbszerű alakjuk nem állt helyre, sejthártyájuk sérülések nyomait mutatta, a citoplazmában egyenletes eloszlásban számtalan kisméretű vakuolum jelent meg. A mag és a magvacscsa kevésbé festődött.

Lényegében hasonló tapasztalataink voltak a zigóták vizsgálata során is.

III. Hidegérzékenység hatása a búza krioprezerválhatóságára

Kísérleteink további szakaszában arra voltunk kíváncsiak, hogy a különböző hidegérzékenységgel rendelkező búzafajták genetikai tulajdonságai hatással vannak-e a petesejtek krioprezerválhatóságára. Ennek érdekében összehasonlítottuk különböző hidegérzékenységű, hidegérzékeny - Siete Cerros (tavaszi búza) ill. hidegtűrő - Mironovszkaja 808 (széles búza) búza genotípusok petesejtjeinek krioprezerválhatóságát.

Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a hidegtűrő Mironovszkaja esetében úgy a lassú hűtési eljárással, min a vitrifikáció során lényegesen nagyobb túlélési % érhető el, mint a Siete Cerros genotípussal. Ez utóbbi genotípus esetében úgy történt, hogy már az adaptáció során alkalmazott ozmotikus kezelés is nagy megterhelést jelentett számukra. Lassú és gyors hűtési kombinált eljárással 10% alatti túlélés még elérhető volt, de a relatíve nagy ozmotikus terhelést jelentő vitrifikációs eljárással már olyan drasztikus struktúrális és funkcionális változást idéztek elő a petesejtekben (lásd 11. ábra C kép), hogy felolvasztás után a petesejtek jelentős része (95%) életképtelen volt. Ugyanakkor ugyanezen eljárás még 12,7-20% közötti túlélést biztosított a hidegtűrő Mironovszkaja esetében. Mindezen eredmények azt mutatják, hogy a genetikailag determinált hidegtűrő rész és az ozmotikus érzékenység között szoros korreláció áll fenn még az ivarsejtek szintjén is.

IV. Egyéb eredmények

Mindezek mellett vizsgálataink során azt is megállapítottuk, hogy a petesejt krioprezerválhatósága nagymértékben függ:

- a petesejt korától és fiziológiai állapotától: Úgy történt, hogy az ideális állapotú (antézis korú), ill. a fiatal, még kissé éretlen petesejt (antézis előtt 3 nappal) alkalmas petesejtek fagyasztására, de az öregedés jeleit mutató, az antézis után 3 nappal lévő petesejtek fagyasztást követő túlélése jelentősen csökken, ami arra utal, hogy az öregedő petesejt már igen érzékeny az ozmotikus változásokra.

- a kalász típusától: Tapasztalataink szerint a bokrosodott búzának csupán a fő kalászból izolált petesejtek alkalmasak krioprezervációra, mert a másod- ill. harmad-kalászból nyert petesejtek életképessége igen alacsony (20-30%) már az adaptációs fázis után is. E tény jelentős mértékben korlátozta a kísérletek elvégzését. (A mellékkalászból izolált petesejtek nem alkalmasak krioprezervációra)

Eredmények összefoglalása és értékelése

A pályázat célja a növényi petesejtek ill. zigóták krioprezerválási módszerének kidolgozása gabonaféléken.

Munkánk során kidolgoztuk azokat a módszertani feltételeket (adaptációs közeg összetétele, adaptáció ideje és körülményei, krioprotektáns anyagok min sége, a fagyasztás menete és a rehidratáció körülményei), melyek segítségével többféle krioprezervációs módszert is sikeresen alkalmaztunk növényi petesejtek és zigóták krioprezervációjára.

Így, bár kisebb hatékonysággal, de sikeres krioprezervációt valósítottunk meg izolált búza petesejteken hosszabb idej (10-15 perces), kis ozmotikus terhelést (1000-1400 mOsmol) jelent el kezelés, ill. lassabb, programozott h tési eljárás segítségével úgy a hidegérzékeny Siete Cerros, mind a hidegt r Mironovskaja 808 fajta esetében (12. és 13. ábra). Ez utóbbi fajta esetében nagyobb hatékonyságú krioprezerváció valósítható meg az ún. vitrifikációs módszer segítségével, melynél egy rövid idej (1-5 perces), nagy ozmotikus terhelést jelent (2000-3000 mOsmol) glicerol-szacharóz oldat gradiens-szer alkalmazása után a petesejteket hirtelen folyékony N₂-be helyeztük. E módszer azonban sikertelen volt a hidegérzékeny Siete Cerros esetében. Vizsgálataink rámutattak arra, hogy a genetikailag determinált hidegt r és az ozmotikus érzékenység között szoros korreláció áll fenn, ami még az ivarsejtek szintjén is megmutatkozik.

Munkánk során kimutattuk továbbá, hogy az aszkorbinsav kedvez en befolyásolja a petesejtek ill. zigóták túlélési képességét. Hatása egyértelm en megmutatkozik a dehidratáció és a rehidratáció során is. Ez utóbbi esetben az aszkorbinsav jelent sen csökkentette a víz beáramlásának sebességét a rehidratáció korai szakaszában, ezzel csökkentve annak lehet ségét, hogy a rehidratáció folyamán a küls , folyamatosan csökken ozmolaritású oldatból a sejtek rövid id alatt jelent s mennyiség vizet vegyenek fel, és membránsérüléseket szenvedjenek el.

Megállapítottuk, hogy a krioprotektáns anyagok közül a DMSO, ellentétben számos szomatikus növényi szövettel és sejtrel, igen toxikus hatású a petesejtekre, s csak kis koncentrációban és megfelel körülmények között (lassú fagyasztás) alkalmazható. A PG-nak ilyen drasztikus kedvez tlen hatását nem tapasztaltuk, bár 5% fölötti koncentrációnál a petesejtek túlélési aránya már csökken.

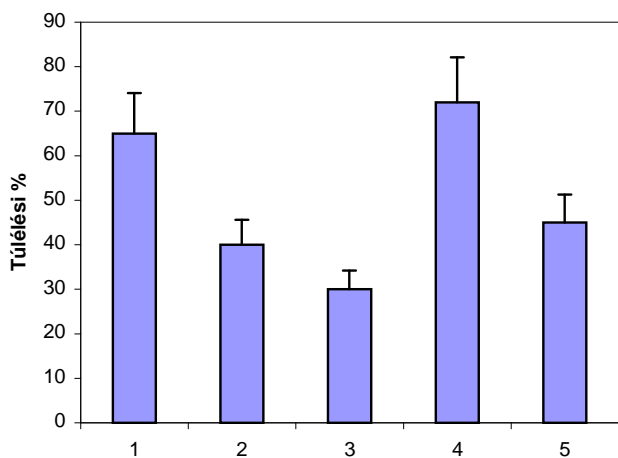
Kimutattuk, hogy amennyiben az el kezeléseket alacsony h mérsékleten (T=0°C) végezzük a krioprotektáns anyagok kedvez tlen hatása mérsékelhet .

A petesejtekre kidolgozott krioprezervációs módszer kisebb módosítással (adaptáció idejének növelése) alkalmazható volt a zigóták krioprezervációjára is. E technikával a zigóták krioprezervációja 10-15%-al nagyobb hatékonysággal hajtható végre, mint a petesejteké, ami valószínűleg abból következik, hogy a már sejtfallal rendelkező zigóták kevésbé sérülékenyek, mint a petesejtek.

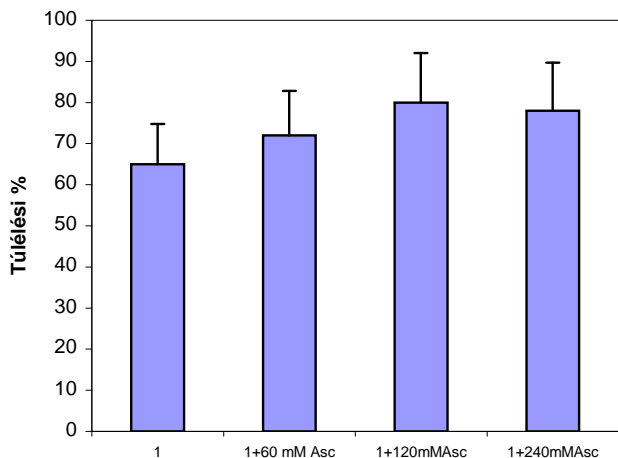
Strukturális vizsgálatokkal kimutattuk, hogy a krioprezerválás során a petesejtek ill. zigóták citoplazmaszerkezete jelent s mértékben átrendez dik: az organellumok a plazma sejttag körüli részén koncentráálódtak, míg a perifériális részen megjelent egy világosabban fest d , organellumokat és vakuolumokat alig tartalmazó citoplazmarégió.

Vizsgálataink, újszer ségéb l következ en (ezidáig növényi petesejteket, zigótákat még nem krioprezerváltak), számos új és hasznos információval szolgálnak az alap kutatás számára a növényi petesejtek és zigóták krioprezervációja tekintetében, és hasonlóan a pollenekhez, megteremti a lehet ségét a petesejtek és zigóták hosszútávú tárolásához, génbanki meg rzéséhez.

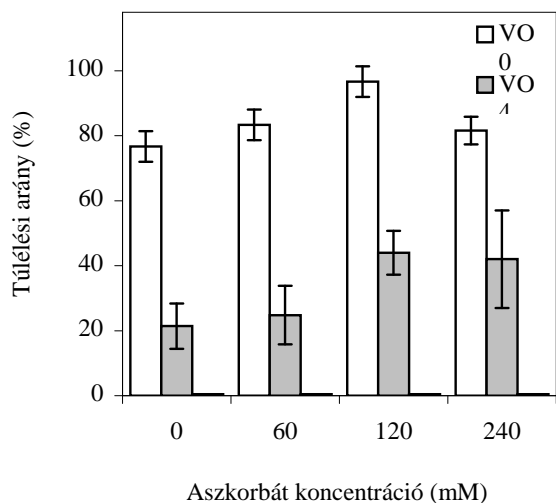
1. ábra: Búza petesejtek FDA teszt segítségével meghatározott túlélési %-s különböző adaptációs közegben. A kezelés időtartama 10 perc.



1. Izoláló közeg + 0.3 M Prolin + 2 μ M ABS
2. Izoláló közeg 0.3 M Prolin + 0.3 Szorbitol + 2 μ M ABS
3. Izoláló közeg 0.3 M Prolin + 0.5 Szorbitol + 2 μ M ABS
4. Izoláló közeg + 0.3 M Prolin + 60 mM Aszkorbinsav + 2 μ M ABS
5. Izoláló közeg 0.3 M Prolin + 0.3 Szorbitol + 60 mM Aszkorbinsav + 2 μ M ABS

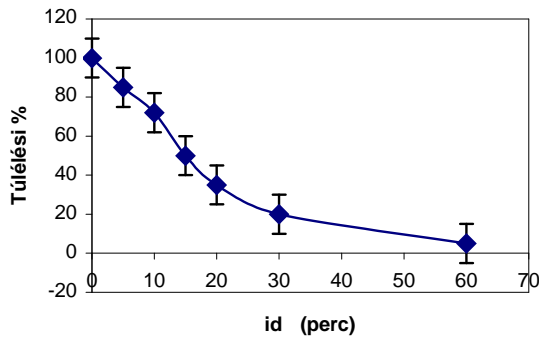


2. ábra: Különböző aszkorbinsav koncentrációk hatása az 1. adaptáló közegben történő túlélésre.

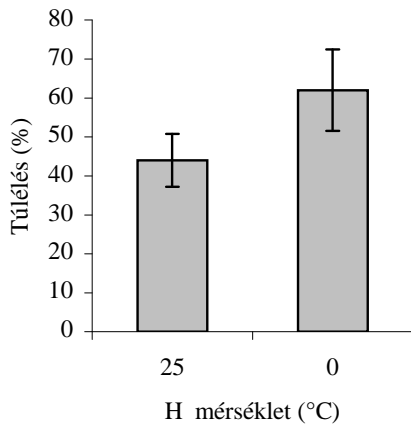


3. ábra: Különböző aszkorbinsav koncentrációk hatása a petesejteknek a glicerolt + szacharózt tartalmazó közegben történő túlélésére.

- VO0: 30% glicerol + 10% szacharóz
 VO4: 30% glicerol + 10% szacharóz + 5% PG
 VO1: 30% glicerol + 10% szacharóz + 5% DMSO

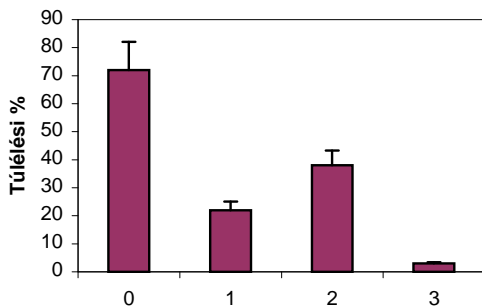


4. ábra: Búza petesejtek FDA teszt segítségével meghatározott túlélési %-ának idő függése. Az adaptáció a prolin + aszkorbinsavat tartalmazó oldattal történt.



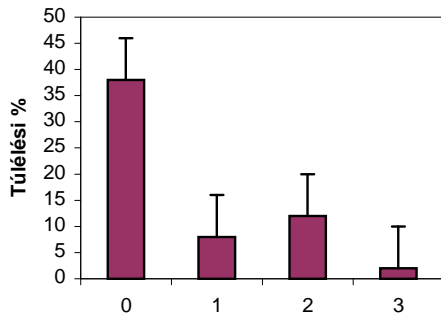
5. ábra.: A hőmérsékletek hatása a petesejtek túlélési arányára.

Amennyiben az előkezeléseket ill. A rehidratációt alacsony hőmérsékleten végezzük a petesejtek túlélési képessége megnövekszik.



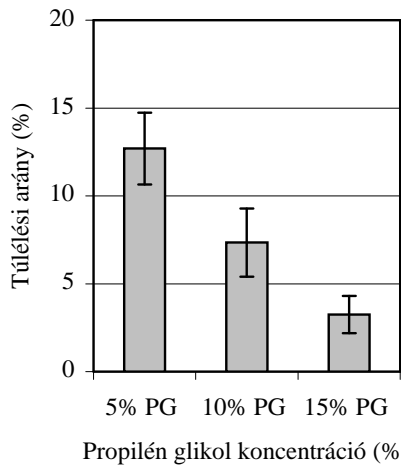
6. ábra: Túlélési % alakulása a különböző krioprezerváló oldatok alkalmazása után. A kezelés időtartama 10 perc. A kezelést 10 perces prolin + aszkorbinsav előkezelés előzetes meg.

- Kezelés nélkül (csak adaptációs előkezelés volt)
- 0.5 M DMSO + 0.5 M glicerol + 0.7 M szorbitol + 0.08 M Prolin
- 0.5 M DMSO + 0.5 M glicerol + 1.0 M Prolin
- 1M DMSO + 1M glicerol + 2M sucrose + 0.09 M Prolin

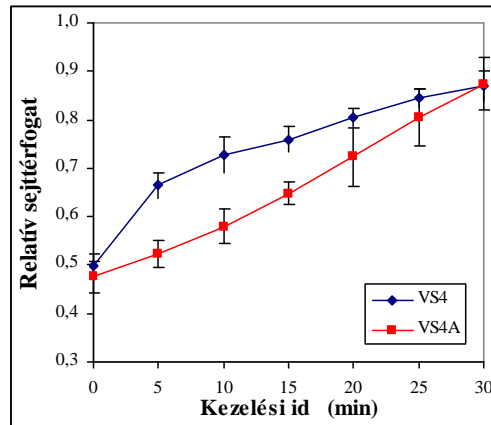
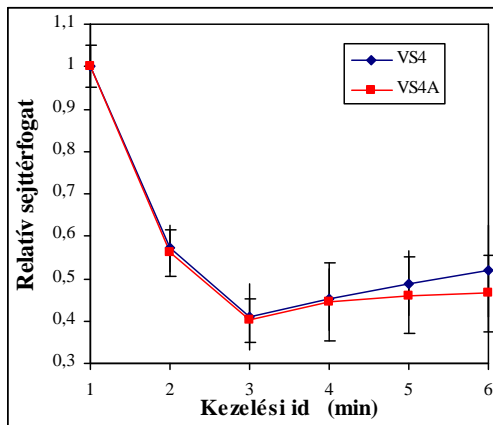


7. ábra: Túlélési % alakulása fagyasztást követően.

0. Fagyasztás előtt
1. Kétlépéses lassú fagyasztás
2. Lassú és gyors fagyasztás
3. Egylépes gyors fagyasztás

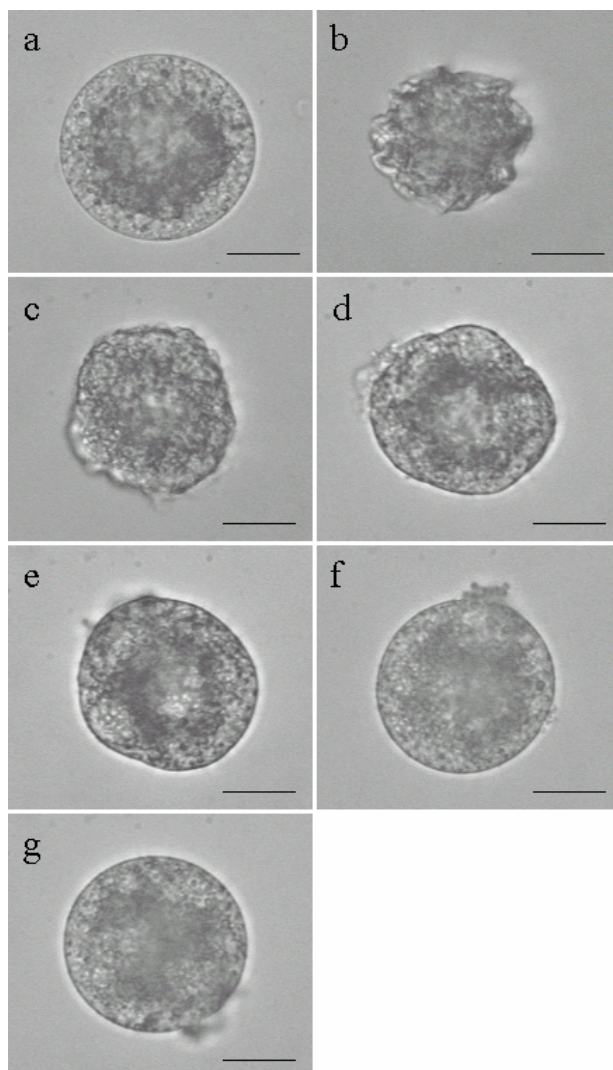


8. ábra A fagyasztás során alkalmazott PG koncentrációk hatása a sejtek túlélésére. A túlélési arány a PG koncentráció növelésével szignifikánsan csökkent.



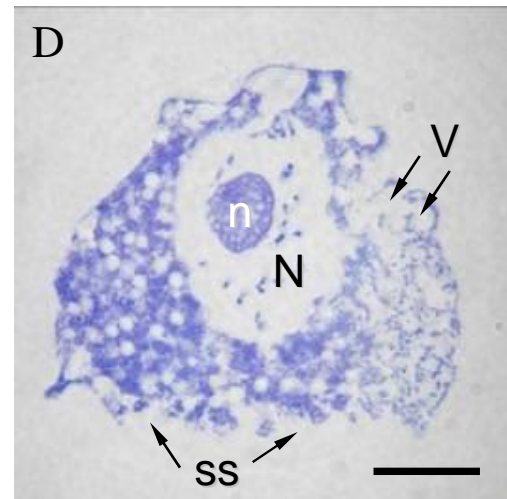
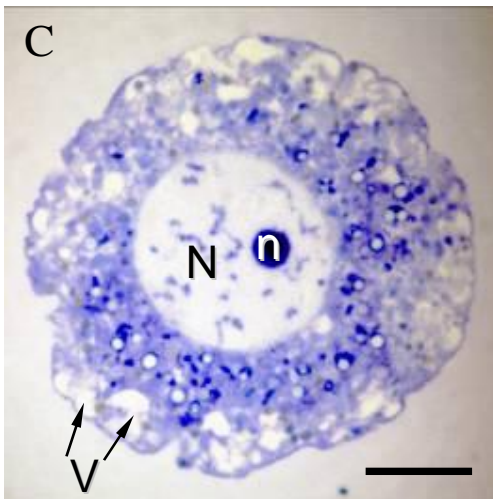
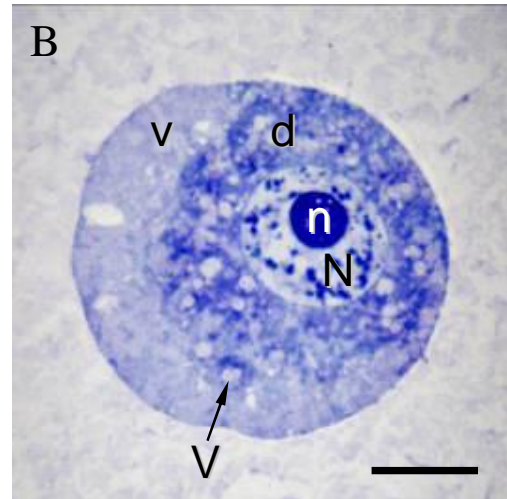
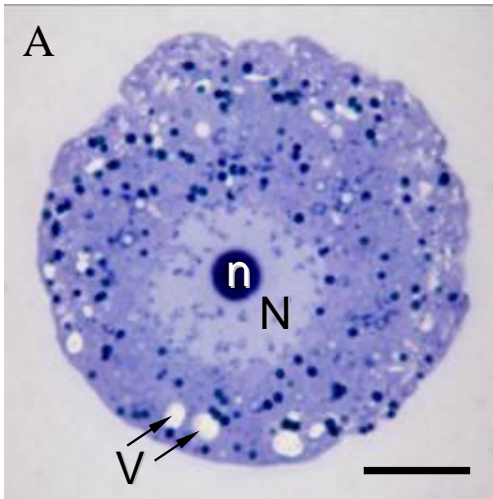
9. ábra: Az aszkorbinsav hatása a de- és rehidratáció folyamatára. VS4: 30% glicerol + 10% szacharózt tartalmazó oldat. VS4A: VS4+120 mM aszkorbinsav.

10. ábra: A petesejt méret- és alakváltozásai a de- és rehidratáció folyamán. a) kezeletlen petesejt, b) dehidratált petesejt, c-g) petesejt a rehidratáció különböző fázisaiban. Az ábrásor bemutatja, hogy hogyan nyeri vissza fokozatosan gömbszerű alakját az élő petesejt a rehidratálás során.

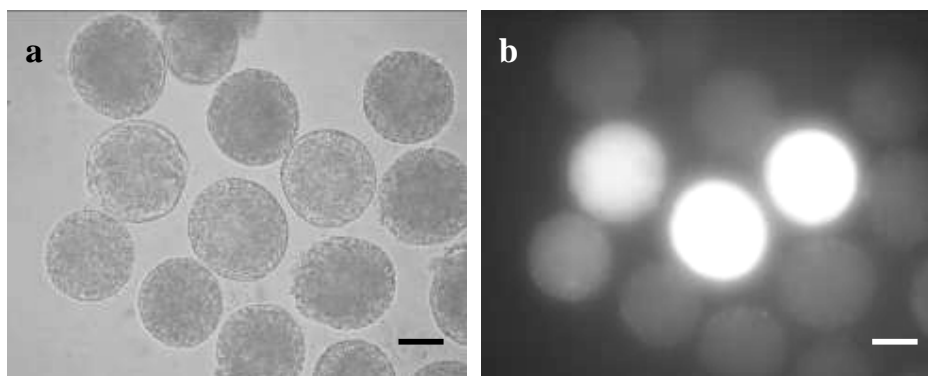


11. ábra. A: kezeletlen, B: él , teljes krioprezervációs procedúrán átesett, beágyazott Mironovszkaja 808 petesejt. C: kezeletlen, D: elhalt, teljes krioprezervációs procedúrán átesett, beágyazott Siete Cerros petesejt. Bar = 10 µm.

Jelmagyarázat: N:nukleusz, n: nukleolusz, V: vakuolum, v: világosan fest d: denz citoplazmarégió, ss: sérült sejtmembrán



12. ábra *Vitrifikációs procedúrán átesett, majd felolvasztott és rehidratált életképes búza (Mironovszkaja 808) petesejtek.*



(a) fénymikroszkópos felvétel, (b) a vitrifikációt túlélő sejtek FDA jelölése. Bar = 20 μm . A sejtek dehidratációja és fagyasztása során a VO4A fagyásvédő oldatot alkalmaztuk.

13. ábra: krioprezervált Siete Cerros petesejtek.

