

Transplantace cytoplasmy do cílové buňky prostřednictvím elektrických polí

E. Greplová*, P. Habásko**

Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská, Břehová 7, 115 19 Praha 1

*grepleli@fjfi.cvut.cz, **habaspet@fjfi.cvut.cz

Abstrakt

Pomocí asymetrické somatické hybridizace byla předána funkční cytoplasma planého druhu *Solanum verrucosum* do kulturního *Solanum tuberosum*. Inaktivace buněčného jádra u mezofylových protoplastů *Solanum verrucosum* byla provedena pomocí UV záření o intenzitě $370 \mu\text{W cm}^{-2}$ po dobu 10 minut. U mezofylových protoplastů *Solanum tuberosum* byla inaktivována cytoplasma pomocí metabolických inhibitorů jodoacetamidu a kyseliny jodoctové v koncentracích 0,4 mM a 0,2 mM. Takto ošetřené protoplasty nevykazovaly regenerační schopnost. Tyto ozářené a metabolicky inaktivované protoplasty byly spojovány pomocí elektrických polí (střídavý proud 5 V/0,5 mm, 2 – 18 s; stejnosměrný proud 10 V/0,5 mm, 80 μs) za účelem komplementace a potenciálně přenosu žádoucích vlastností. Fúzované protoplasty regenerovaly a bylo dosaženo tvorby kalusu.

Klíčová slova: asymetrická somatická hybridizace; elektrofúze; jodoacetamid; jodoctová kyselina; UV-záření.

1 Úvod

Sexuální hybridizace využívá znalostí dědičných zákonitostí, a tak vede k posilování určitých žádoucích znaků a vlastností. U rostlin je ale běžné, že některé druhy téhož rodu jsou nekřížitelné v důsledku pre- a post-zygotických bariér. K překonání těchto bariér jsou využívány některé biotechnologické postupy. Jedním z nich je somatická hybridizace. Nutným předpokladem pro jejich využití je mimo jiné i znalost strukturních a funkčních zákonitostí rostlinné buňky.

Rostlinná buňka je i přes svoji velikost (běžně 10 – 100 μm) složitá a vysoce organizovaná jednotka [1]. Oproti buňce živočišné je rostlinná buňka opatřena buněčnou stěnou, která je do jisté míry mechanickou ochranou a současně vnější kostrou. Cytoplasmu ohraničuje polopropustná plasmatická membrána (model tekuté mozaiky). Z hlediska organizace je možné sledovat činnosti řídicí a výkonné. Řídicí činnosti náležejí v první řadě jádru, ve kterém je uložena dědičná informace v podobě DNA. V menší míře pak semiautonomním organelám (plastidům a mitochondriím), které mají vlastní DNA a kromě toho vykonávají specifické výkonné funkce. Mitochondrie zajišťují buněčné dýchání, jehož produktem je energie v podobě molekuly ATP (adenosintrifosfát), která je využívána k nejrůznějším pochodům v buňce. Plastidy jsou organelami, v nichž probíhá fotosyntéza, mohou sloužit jako zásobní organely. Dalšími výkonnými organelami je endoplasmatické retikulum (ER), Golgiho aparát, ribozomy, vakuoly.

Somatická hybridizace pracuje s protoplasty (buňky zbavené buněčných stěn, Obr. 1) a využívá jejich schopnosti chovat se za určitých okolností jako buňky pohlavní, tj. splývat (fúzovat) v důsledku působení specifických fyzikálních (např. elektrické pole) nebo chemických podmínek (např. polyethylenglykol). Druhou nezbytnou schopností je totipotence buněk. Každá buňka obsahuje kompletní genetickou informaci pro celý organismus a totipotentní buňka má jedinečnou schopnost diferenciaci, která umožní zregenerovat za vhodných podmínek celou rostlinu.

Somatická hybridizace umožňuje několik způsobů kombinování genetické informace [2, 3, 4, 5] dvou různých jedinců. Základním typem je symetrická fúze protoplastů, při které dochází ke splynutí fungujících jader i cytoplasem obou rodičů. Dojde tak součtu ploidie. Při fúzi protoplastů tetraploidní odrůdy bramboru s diploidním planým druhem vznikne hexaploidní somatický hybrid, v jehož jádře jsou obsaženy všechny chromosomy obou rodičů. Tato metoda umožňuje uplatnění cytoplasem obou rodičů na rozdíl od sexuální hybridizace, kde se setkáváme téměř výhradně s matroklinní dědičností, tj. po matce. Vytváří se tak zcela nové kombinace genů a tyto jedinci mohou být přímo využiti v křížení.

Druhou variantou je ozáření jednoho z rodičů - donora (obvykle jsou ozařovány protoplasty planého druhu) ionizujícím zářením těsně před fúzí protoplastů. Ozáření způsobí fragmentaci chromosomů, a tedy inaktivaci jádra. Výsledkem fúze je asymetrický hybrid (obsahuje v jádře jenom část chromosomů donora a cytoplasmu obou rodičů nebo cytoplasmatický hybrid (obsahuje chromosomy pouze recipienta a cytoplasmu namíchanou od obou rodičů. Metoda se využívá v případě, že chceme omezit vliv nežádoucích vlastností, kódovaných jadernou DNA donora, ve vytvořených somatických hybridech. Hybridi musí být rozříděni podle žádoucí vlastnosti a vybraní jedinci se opět mohou uplatnit v sexuální hybridizaci.

Třetí variantou je dvojí ošetření protoplastů. Donor je ozářený ionizujícím zářením (způsobí zlomy na řetězci DNA a zamezí tak transkripci a následně translaci) zatímco recipient je chemicky ošetřený metabolickým inhibitorem (dojde k vazbě na enzymy v cytoplasmě, na proteiny v membránách nebo na vazebná místa pro ATP; [6]). V obou případech se zablokují životně důležité pochody v buňce. Dvojí ošetření protoplastů je samo o sobě dostatečný selekční systém, protože ošetřené protoplasty nejsou samostatně schopné další existence. Fúzí ošetřených buněk donora a recipienta dojde ke komplementaci a vzniká aloplasmatický hybrid s funkčním jádrem recipienta a funkční cytoplasmou donora. Při fúzi ozářených protoplastů planého druhu a chemicky ošetřených protoplastů odrůdy bramboru dojde k „transplantaci“ cytoplasmy tohoto planého druhu do buňky s jádrem odrůdy bramboru. Transplantací cytoplasmy se mohou do kulturního bramboru vnést pozitivní vlastnosti nesené semiautonomními organelami planého druhu (často rezistence k biotickým a abiotickým stresům) bez zátěže jeho jadernou DNA [7]. Takovýto hybrid nese již prošlechtěné vlastnosti a navíc lépe odolává stresům, může být jako matka zařazen do křížení, případně se stát cílovým genotypem.

2 Materiál a metody

Rostlinný materiál

Pro izolaci protoplastů byly použity rostliny kulturního bramboru *Solanum tuberosum* a *S. verrucosum*. Rostliny byly kultivovány 4 – 6 týdnů v kultivační komoře s fotoperiodou 16/8 h při intenzitě osvětlení $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a teplotě $22 \text{ }^\circ\text{C}$. Před izolací protoplastů byly rostliny umístěny do tmy a teploty $10 \text{ }^\circ\text{C}$ na dobu 24 h za účelem sjednocení buněčného cyklu.

Asymetrická somatická hybridizace a inaktivace protoplastů

Izolace protoplastů a elektrofúze byla provedena podle protokolu [8, 9].

Protoplasty *S. verrucosum* byly ozářeny UV světlem germicidní lampou (vlnová délka 254 nm) v intenzitě $370 \mu\text{W cm}^{-2}$ po dobu 10 minut [10].

Protoplasty *S. tuberosum* byly ošetřeny jodoacetamidem (IOA) v dávce 0,4 mM a kyselinou jodooctovou (IOAA) v dávce 0,2 mM [10].

Fúze elektrickým polem a kultivace byla provedena podle výše uvedeného protokolu [8, 9].

3 Výsledky

Protoplasty *S. verrucosum* ozářené UV světlem nebyly schopné další regenerace. Takto ošetřené protoplasty si zachovávaly sférický tvar 8 (maximálně 13) dnů. Zcela výjimečně byla pozorována regenerace buněčné stěny. Přesto došlo k zániku všech kultivovaných protoplastů ošetřených UV světlem v uvedené dávce. Kontrola – protoplasty neošetřené UV světlem – regenerovala velmi dobře (buněčné stěny byly pozorovány po 2 – 3 dnech a buněčné dělení po 6 – 7 dnech).

Protoplasty *S. tuberosum* ošetřené metabolickým inhibitorem si zachovávaly sférický tvar po dobu 6 – 8 dnů, pak následoval kolaps. Neošetřené kontrolní protoplasty prosperovaly velmi dobře, došlo k regeneraci buněčných stěn a k buněčnému dělení (po 5 – 6 dnech).

Ošetřené protoplasty *S. verrucosum* a *S. tuberosum* byly fúzovány elektrickým polem. S ohledem na dvojí ošetření protoplastů došlo k metabolické komplementaci a bylo dosaženo regenerace buněčných stěn a buněčného dělení, následované regenerací neorganizované tkáně (tzv. kalusu).

4 Závěr

Šlechtění rostlin, ať je uskutečňováno klasickými metodami nebo biotechnologickými postupy, je velmi náročný proces a vyžaduje množství zkušeností, vědomostí, trpělivosti a respektu k přírodě.

Fúze buněk je využíváno i v jiných biotechnologických procesech např. při tvorbě tzv. hybridomat, kdy jsou fúzovány nádorové myelomové buňky s lymfocyty B a výsledný produkt – hybridní buňky - se množí rychle a trvale a slouží k tvorbě velkých objemů monoklonálních protilátek. Monoklonální protilátky jsou čteně využívány v prevenci, diagnostice či k léčbě (například k identifikaci podskupin B a T buněk pro rozlišení typu leukémie, k vystopování nádorových antigenů, k napadení nádorových metastáz a k prevenci problémů spojených s transplantacemi kostní dřeně, k detekci záhadných metastáz pomocí imuno-cytologických analýz kostní dřeně, lymfatických uzlin apod.). Detekce malých množství invazivních nebo metastatických buněk standardními histologicko-patologickými postupy není tak citlivá.

5 Poděkování

Autoři příspěvku děkují pracovníkům Laboratoře experimentálního šlechtění Výzkumného ústavu bramborářského v Havlíčkově Brodě za umožnění provést vlastní experimenty, za poskytnutí informací a cenné rady.

Reference

- [1] S. Procházka a kol., *Fyziologie rostlin*, Academia Praha, 2003, str. 28-51
- [2] M. R. Davey, P. Anthony, J. B. Power, K. C. Lowe, *Plant protoplast technology: Current status*, Acta Physiologia Plantarum, 2005, 27: 117-129
- [3] J. Liu, S. Xu, X. Deng, *Intergeneric somatic hybridization and its application to crop genetic improvement*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2005, 82: 19-44
- [4] B. Oberwalder, B. Ruoff, L. Schilde-Rentschler, V. Hemleben, H. Ninnemann, *Asymmetric protoplast fusion between wild and cultivated species of potato (*Solanum ssp.*) - detection asymmetric hybrids and genome elimination*, Theor. Appl. Genet., 1997, 94:

1104-1112

- [5] W. Orczyk, J. Przetakiewicz, A. Nadolska-Orczyk, *Somatic hybrids of Solanum tuberosum – application to genetics and breeding*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2003, 74(1): 1-13
- [6] D. Aviv, R. Chen, E. Galun, *Does pretreatment by rhodamine 6-G affect the mitochondrial composition of fusion-derived Nicotiana cybrids?* Plant Cell Reports, 1986, 3: 227-230
- [7] S. G. Atienza, A. Martín, N. Pecchioni, C. Platani, L. Cattivelli, *The nuclear-cytoplasmic interaction controls carotenoid content in wheat*. Euphytica, 2008, 159: 325-331
- [8] M. Greplová a kol., *Procedure of protoplast electrofusion (in Solanum genus)*, <http://www.vubhb.cz/te.asp?f=institute/06dogr-protocols-mfpep.htm>
- [9] M. Greplová, H. Polzerová, H. Vlastníková, *Electrofusion of protoplasts from Solanum tuberosum, S. bulbocastanum and S. pinnatisectum*, Acta Physiologiae Plantarum, 2008, 30: 787-796
- [10] H. Polzerová, M. Greplová, *Introduction to cybridization between Solanum verrucosum and Solanum tuberosum*. Vědecké práce – Výzkumný ústav bramborářský, Havlíčkův Brod, 2008, 16 (in press)

Obr. 1 Rostlinné protoplasty rodu Solanum

