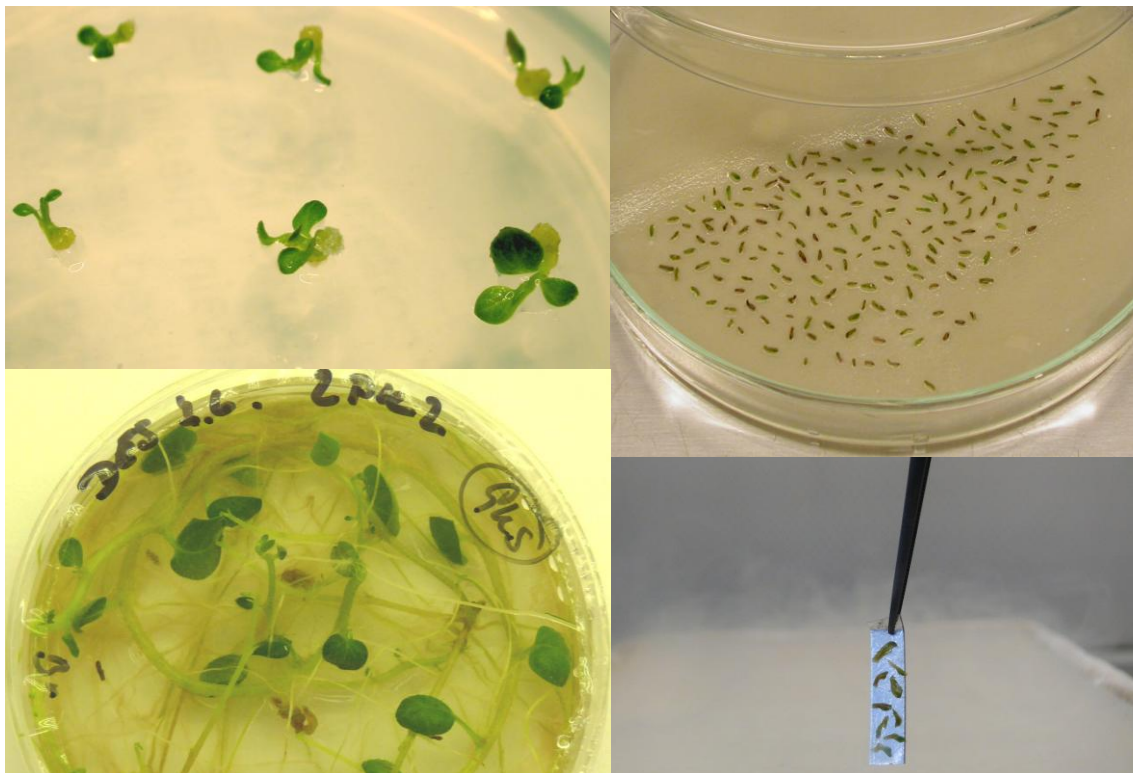




Ing. Miloš Faltus, Ph.D.
 RNDr. Alois Bilavčík, Ph.D.
 Ing. Jiří Zámečník, CSc.

Metodika kryokonzervace citlivých genotypů bramboru

CERTIFIKOVANÁ METODIKA



Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

2016

Metodika je výstupem řešení institucionálního projektu VÚRV, v.v.i. č. RO0416. Metodika proběhla oponentním řízením. O uplatnění metodiky byla dne 16. 12. 2016 uzavřena smlouva podle ustanovení §269 zákon č. 513/1991 Sb., obchodního zákoníku. MZe, jako certifikační orgán, vydal Osvědčení č.j. 73521/2016-MZE o uznání uplatněné certifikované metodiky dne 21.12. 2016.

Autoři:

Ing. Miloš Faltus, Ph.D., VÚRV, v.v.i. Praha
RNDr. Alois Bilavčík Ph.D. , VÚRV, v.v.i. Praha
Ing. Jiří Zámečník, CSc. , VÚRV, v.v.i. Praha

Oponenti:

Ing. Přemysl Landa, Ph.D., Ústav experimentální botaniky AV ČR, Praha
Ing. Iva Křížková, Ph.D., Ministerstvo zemědělství ČR

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha, 2016
ISBN: 978-80-7427-222-6

Metodika kryokonzervace citlivých genotypů bramboru

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Vydal Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.
2016

Kryokonzervace bramboru

Uchování genetických zdrojů bramboru v polních podmínkách je ovlivněno řadou biotických a abiotických stresorů, které přinášejí riziko ztráty cenných položek. Kryokonzervace je metodou, která tato rizika eliminuje a umožňuje bezpečné dlouhodobé uchování genetických zdrojů bramboru a je tedy vhodnou metodou uchování nejcennějších položek jako „safety duplication“, bezpečnostní duplikace. Metoda kryokonzervace je založena na uchování rostlinného materiálu při teplotě kapalného dusíku v životaschopném stavu, kdy jsou všechny procesy ve skladovaném materiálu prakticky zastaveny. Tato metodika popisuje postup přípravy explantátů před kryokonzervací, dehydrataci vzrostných vrcholů, způsob a zásady pro zamražení vzorků i regeneraci kontrolních rostlin, včetně hodnocení životnosti a regenerace explantátů pro citlivé genotypy bramboru, které bylo dříve jen velmi obtížné úspěšně kryokonzervovat. Uživatelem metodiky je MZe, které ji uplatní v rámci „Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin, zvířat a mikroorganismů významných pro výživu a zemědělství“.

Klíčová slova: brambor; genetické zdroje; konzervace; *Solanum tuberosum* L.

Grapevine cryoconservation

Storage of potato germplasm is endangered by biotic and abiotic stressors in the field conditions, and it is connected with the risk of valuable accession loss. Cryoconservation is a method which eliminates the risk and makes a safe long-term storage of plant germplasm possible and it is recommended for storage of the most valuable accessions as a safety duplication. Cryoconservation method is based on storage of plant material at a temperature of liquid nitrogen when all processes are practically stopped but the viability of plant material remains. This methodology describes preparation of plant explants before cryoconservation, apical shoot tip dehydration by cryoprotectants, procedure and principles of long-time plant storage and plant recovery for evaluation of explant survival and regeneration for sensitive potato genotypes whose cryoconservation was formerly almost impossible. The Ministry of Agriculture of the Czech Republic is the user of this methodology and it will utilize it in the framework of “National Programme on Conservation and Utilization of Plant, Animal and Microbial Genetic Resources for Food and Agriculture”.

Key words: conservation; genetic resources; potato; *Solanum tuberosum* L.

Obsah:

I.	Cíl metodiky.....	6
II.	Vlastní popis metodiky	6
a)	Princip metody.....	6
b)	Materiál a metody.....	6
c)	Postup metody kryoprezervace bramboru	9
III.	Srovnání novosti postupů	13
IV.	Popis uplatnění Certifikované metodiky	14
V.	Ekonomické aspekty.....	15
VI.	Seznam použité související literatury	16
VII.	Seznam publikací, které předcházely metodice	17
VIII.	Dedikace	17
IX.	Jména oponentů:.....	17

I. Cíl metodiky

Cílem metodiky je optimalizovat postup pro dlouhodobé uchování citlivých genetických zdrojů bramboru při ultranízkých teplotách v životaschopném stavu.

II. Vlastní popis metodiky

a) Princip metody

Tato metodika vychází ze standardní metodiky kryokonzervace bramboru z roku 2008, která je využívána v rámci „Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin, zvířat a mikroorganismů významných pro výživu a zemědělství“. Na základě několikaletých zkušeností se ukázalo, že některé genotypy bramboru jsou citlivé vůči této metodě kryokonzervace a to zejména vůči dehydrataci explantátů, která snižuje jejich životnost a tak limituje využití této metody. Proto vznikla potřeba vyvinout upravenou metodiku, která by splňovala podmínku mírné dehydratace bez poškození explantátů. Samotná metoda kryokonzervace je založena na poznatku, že za určitých okolností je možné uchovat organismus v životaschopném stavu i při teplotách kapalného dusíku, hluboko pod bodem mrazu. Předpokladem pro dosažení těchto podmínek je snížení obsahu vody v kryoprezervovaném materiálu, které vede k omezení krystalizace. Ta přináší poškození skladovaného materiálu a ztrátu jeho životaschopnosti. Aby nedošlo při teplotě kapalného dusíku ke krystalizaci vody, musí se materiál nacházet v tzv. skelném stavu, který má svou viskozitou charakter pevné látky, ale při fázovém přechodu nedochází k entalpickým změnám (mrznutí či tání) spojeným se změnou struktury. Principem nové metodiky kryoprezervace bramboru je otužení a dehydratace explantátů pomocí předkultivace explantátů na médiu se zvýšeným obsahem sacharózy, izolace vzrostných vrcholů, jejich úprava na požadovanou velikost a následná pomalá dehydratace vzrostných vrcholů v přiklopené Petriho misce. Metodika popisuje postup přípravy rostlinného materiálu, vlastní kryoprezervaci a následnou regeneraci rostlinného materiálu.

b) Materiál a metody

1. Přístrojové vybavení

Pro využití metody kultivace explantátů bramboru je třeba disponovat následujícím přístrojovým vybavením:

Práce s tkáňovými kulturami rostlin v in vitro podmínkách:

- kultivační box, laminární box

Vybavení pro sterilizaci materiálu a kultivačních médií:

- autokláv, horkovzdušný sterilizátor, třepačka

Přístroje pro přípravu a uchování kultivačních médií:

- analytické váhy, přesné váhy, pH-metr, laboratorní míchačka, chladnička, mikrovlnná trouba

Uchování kapalného dusíku a kryokonzervovaných vzorků:

- Dewarova nádoba na kapalný dusík
- Dewarova nádoba pro uložení vzorků v kapalném dusíku

Záznamy, výpočty a tisk čárového kódu:

- PC, tiskárna čárového kódu, tiskárna

2. Chemikálie

V následujícím seznamu jsou uvedeny všechny chemikálie potřebné pro kryokonzervaci explantátů bramboru.

Kultivační média:

- destilovaná voda
- makroelementy – dusičnan amonný, dusičnan draselný, dusičnan vápenatý, dihydrogen fosforečnan draselný, chlorid vápenatý, síran hořečnatý
- mikroelementy - chlorid kobaltnatý, síran měďnatý, síran draselný, síran železnatý, kyselina boritá, jodid draselný, síran manganatý, molybdenan disodný, síran zinečnatý, železito-sodná sůl kyseliny etylendiaminotetraoctové
- vitamíny a další účinné látky – thiamin, pyridoxin, kyselina nikotinová, glycin, myo-inositol
- fytohormony – kyselina indolyl octová (IAA), kinetin a kyselina gibberelová (GA₃)
- sacharosa (P.A.)
- agar (Sigma Aldrich)

Úprava pH média:

- hydroxid - hydroxid draselný
- kyselina - kyselina chlorovodíková

Kryoprotektivní roztoky:

- destilovaná voda
- sacharóza (P.A.)

Chladicí a skladovací médium:

- kapalný dusík

3. Drobné pomůcky

Následující pomůcky jsou potřebné pro realizaci metody kultivace explantátů bramboru:

Příprava roztoků a médií:

- Erlenmeyerova baňka 500 ml
- odměrný válec 1000 ml
- Pasteurova pipeta 3 ml
- stříčka

- váženky
- dávkovač
- magnetické míchadlo
- kopistka
- pipety a špičky

Práce se sterilním materiálem:

- skalpel
- nůžky
- pinzety
- stojánek na nástroje
- hliníková folie

Kultivace rostlin:

- kultivační zkumavky s hliníkovým uzávěrem (rozměry 16 x 1,7 cm)
- stojánek na zkumavky
- skleněné Petriho misky (průměr 15 cm)
- plastové Petriho misky (průměr 6 cm)
- plastové kultivační nádoby 11 x 10 x 5 cm (Duchefa)
- plastové Petriho misky 6 cm
- skleněné Petriho misky 15 cm

Předkultivace rostlin:

- Erlenmeyerova baňka 25 ml

Izolace a dehydratace vzrostných vrcholů:

- injekční jehly 0,7 x 40 mm
- stříkačky 10 ml
- skleněné Petriho misky (průměr 15 cm)
- hliníkové plíšky (20 x 6 x 0,05 mm)

Kryokonzervace:

- kryozkumavky 1,8 ml (NUNC)
- polystyrénový džbán 1L
- stojánek na kryozkumavky

Odtání vzorků:

- Erlenmeyerova baňka 100 ml
- nerezová miska
- parafilm

4. Rostlinný materiál a kultivační podmínky

Výchozím materiálem pro kryokonzervaci bramboru jsou explantátové kultury. Rostliny *in vitro* uchováváme obvykle ve zkumavkách (16 x 1,7 cm) s hliníkovým víčkem. Explantáty pěstujeme v kultivačním boxu při teplotě 22 ± 1 °C, intenzitě osvětlení $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a

fotoperiodě 16/8 h. Plastové krabičky o velikosti 11 x 10 x 5 cm použijeme pro kultivaci stonkových segmentů a jejich otužení roztokem 2 M sacharosy před kryoprezervací.

5. Kultivační media

Pro kultivaci rostlin se používají dva typy agarových kultivačních medií. Jedno je tzv. multiplikační, které se používá pro namnožení explantátů bramboru do potřebného počtu a druhé medium je tzv. regenerační, které stimuluje regeneraci explantátů bramboru po jejich kryoprezervaci. Multiplikace *in vitro* rostlin probíhá na modifikovaném kultivačním mediu podle Grospietsche *et al.* (1999) bez kaseinu a myoinositolu a se sníženým obsahem dusíku (25 % původního obsahu NH_4NO_3 a 50 % původního obsahu KNO_3 ve srovnání s mediem podle Murashige a Skooga, 1964), 30 g l^{-1} sacharosy a 7 g l^{-1} agaru. Regenerační medium má shodné složení jako množící medium, ale pro podporu regenerace rostlin navíc obsahuje směs fytohormonů ($0,5 \text{ mg l}^{-1}$ kyseliny indolyl octové, $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ kinetinu, $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ kyseliny gibberelové). Regenerační média aplikujeme do sterilních plastových misek o průměru 6 cm v objemu 10 ml.

c) Postup metody kryoprezervace bramboru

Postup kryoprezervace explantátů bramboru lze rozdělit do pěti postupných kroků:

- Namnožení a otužování explantátů sacharosou
- Izolace vzrostných vrcholů a jejich sycení sacharosou
- Pomalá dehydratace vzrostných vrcholů
- Kryoprezervace vzrostných vrcholů
- Hodnocení životnosti a regenerace rostlin

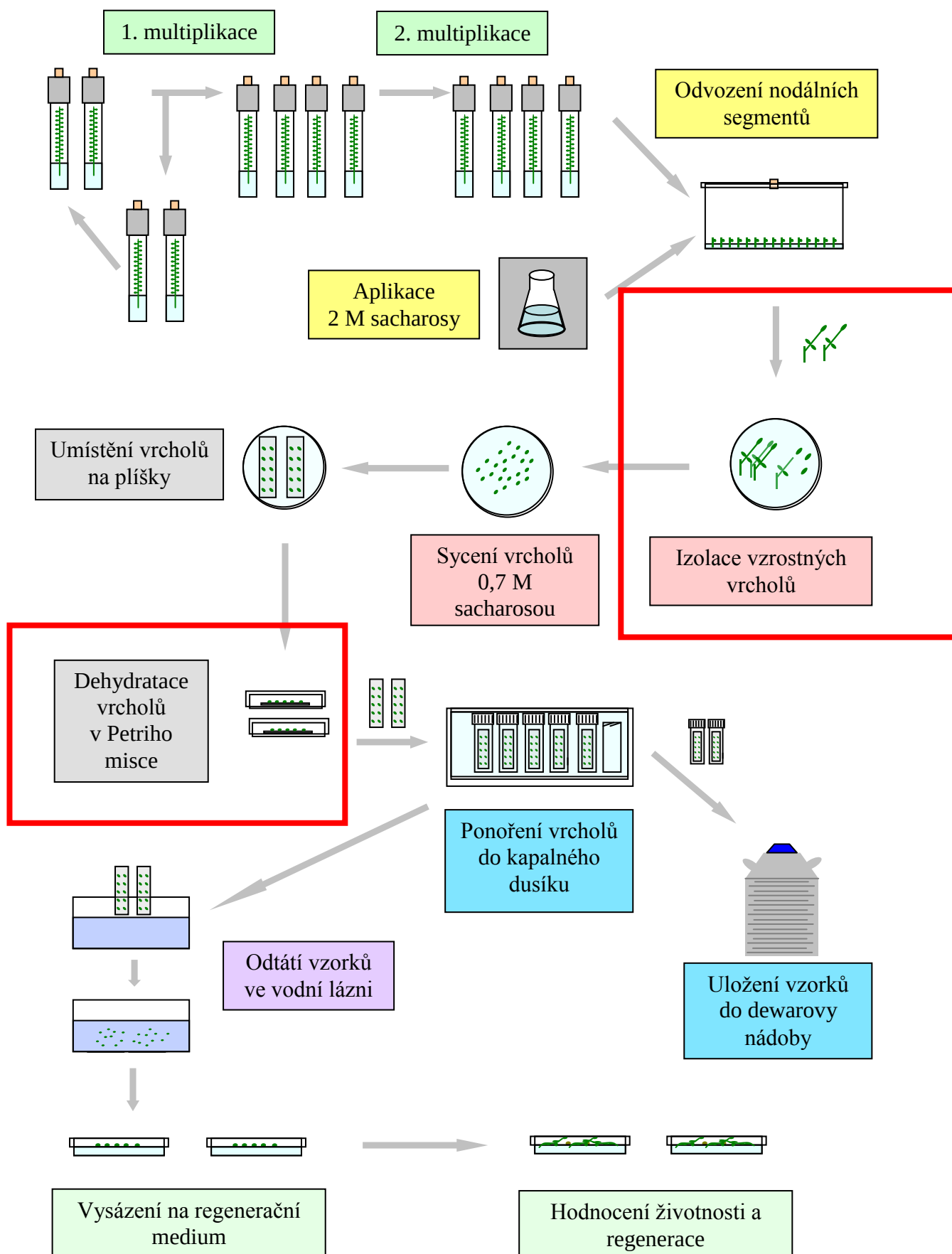
Postup kryokonzervace bramboru je schematicky znázorněn na Obr.1.

1. Namnožení a otužování explantátů sacharosou

Explantáty bramboru množíme na multiplikačním mediu v kultivačních zkumavkách do potřebného počtu 160 rostlin při subkultivačním intervalu 3-4 týdny. Po namnožení explantáty nařízkujeme na jedno-nodální stonkové segmenty a vložíme je po 100 kusech do tří plastových krabiček o velikosti 11 x 10 x 5 cm s 50 ml multiplikačního media. Krabičky se stonkovými segmenty vrátíme do kultivačního boxu, kde probíhala multiplikace explantátů. Po pěti dnech kultivace se do každé krabičky s nodálními segmenty **aplikujeme 25 ml 2 M roztoku sacharosy**.

2. Izolace vzrostných vrcholů a jejich sycení sacharosou

Po 5 až 6 dnech kultivace nodálních segmentů zalitých roztokem 2 M sacharosy **vyizolujeme vzrostné vrcholy** vyrostlé z nodálních pupenů. Vrcholy vyřežeme z nodálních segmentů pomocí injekční jehly, která se použije jako mikroskalpel. Pomocí měřítka umístěného pod Petriho misku upravíme délku vzrostných vrcholů na 2 mm. Vrcholy umístíme do Petriho misky (12 cm) na sterilní filtrační papír nasycený 0,7 M roztokem sacharosy (14 ml) s fytohormony shodného složení jako v regeneračním mediu ($0,5 \text{ mg l}^{-1}$ kyseliny indolyl octové, $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ kinetinu, $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ kyseliny gibberelové). Apikální vrcholy sytíme v roztoku sacharosy po dobu 20 hodin při 22°C .



Obr. 1. Postup kryokonzervace explantátových kultur bramboru. Červené obdélníky vyznačují postupy, které byly upraveny pro kryokonzervaci citlivých genotypů bramboru.

3. Pomalá dehydratace vzrostných vrcholů

Po nasycení vzrostných vrcholů bramboru sacharosou explantáty umístíme na hliníkové plíšky po deseti kusech, vždy dva plíšky se umístí do jedné Petriho misky (4 cm). Plíšky a malé Petriho misky usnadňují manipulaci s explantáty. Petriho misku přiklopíme a umístíme do laminárního boxu, kde probíhá pomalá dehydratace při teplotě 22-23 °C.

Doba dehydratace explantátů je přibližně 4 - 5 hodin v závislosti na velikosti explantátů a je ukončena při dosažení vlhkosti materiálu 0,37 g vody na 1 g sušiny. Kontrolu míry dehydratace provádíme vážením na analytických vahách s přesností 0,01 mg. Nejprve zvážíme Petriho misky (4 cm) s hliníkovými plíškami bez explantátů, pak s explantáty před dehydratací a po dehydrataci. Nakonec kontrolní vzorky dosoušíme 72 hodin v sušárně při 105 °C pro získání hmotnosti sušiny.

4. Kryoprezervace vzrostných vrcholů

Po vysušení jsou explantáty přilepeny k plíškám zaschlým přebytkem roztoku sacharosy. Díky tomu můžeme s plíškami manipulovat, aniž by došlo k náhodnému odpadnutí explantátu. Nejprve si připravíme polystyrenovou nádobu, která slouží jako stojánek pro kryozkumavky a zároveň jako nádoba na kapalný dusík. Tuto nádobu naplníme kapalným dusíkem a pak do ní umístíme kryozkumavky a i ty naplníme kapalným dusíkem. Plíšky s **explantáty** přeneseme pomocí pinzety, a co nejrychleji **ponoříme do kapalného dusíku** v polystyrenové nádobě. Po ochlazení explantátů plíšky umístíme do kryozkumavky a uzavřeme víčkem. Víčko kryozkumavky nedotahujeme, ale mohl kapalný dusík pronikat přes závit do kryozkumavky; čímž je zaručena stálá přítomnost kapalného dusíku v kryozkumavce při jejím umístění do Dewarovy nádoby.

5. Hodnocení životnosti a regenerace rostlin

Vzorky pro kontrolu životnosti a regenerace rostlin bramboru po kryokonzervaci připravujeme spolu se vzorky pro uložení do Dewarovy nádoby. Minimální doba pobytu vzorků v kapalném dusíku je 1 hodina. Regeneraci vzorků provádíme po ohřevu kryoprezervovaných vzorků a po jejich vysazení na regenerační medium. Kryozkumavky se vzorky umístíme do stojánku s kapalným dusíkem. Po otevření víčka musí být kryozkumavky stále ponořeny v kapalném dusíku. Pinzetou hliníkové plíšky rychle vytáhneme z kryozkumavek a i s **vrcholy ponoříme do vodní lázně** o teplotě 40 °C. **Explantáty** po jejich odlepení od plíšků vyjmeme z vody a **přeneseme na regenerační medium** s fytohormony (0,5 mg l⁻¹ kyseliny indolyl octové, 0,5 mg l⁻¹ kinetinu, 0,2 mg l⁻¹ kyseliny gibberelové).

Hodnocení životnosti rostlin provedeme po dvou týdnech a **hodnocení regenerace** po osmi týdnech od vysazení. Za živé považujeme explantáty, u nichž je patrný růst a nedochází u nich ke ztrátě chlorofylu. Apikální růst spojený s tvorbou stonku je známkou regenerace rostliny.

d) Evidence a uložení vzorků při kryokonzervaci

Každou kryozkumavku označíme specifickým čárovým kódem. Tento kód obsahuje pořadové číslo kryoprezervované položky, přesnou lokalizaci položky ve skladovacím systému a datum zamrazení položky. Označení každé zkumavky spolu s informací o vzorku uložíme do databáze zamrazených položek. Vzorky umístíme do skladovacích Dewarových nádob naplněných kapalným dusíkem. Musíme zabezpečit pravidelné doplňování těchto nádob z důvodu odparu kapalného dusíku.

e) Kryoprotokol

Celý postup kryokonzervace zaznamenáme v kryoprotokolu, který obsahuje základní identifikační údaje o kryokonzervovaných vzorcích a o metodě kryokonzervace a jejím výsledku. Tyto informace můžeme v případě potřeby doplnit dalšími údaji, které přesněji definují podmínky kryokonzervace a vlastnosti kryokonzervovaných vzorků.

Základní údaje:

<u>Materiál:</u>	plodina, genotyp, identifikátor EVIGEZ, interní identifikátor
<u>Množství:</u>	počet kryoprezervovaných vzrostných vrcholů, počet kontrolních rostlin
<u>Označení:</u>	číslo kryoprezervované položky, pozice v kryoskladu, datum kryoprezervace
<u>Kryo:</u>	metoda kryokonzervace
<u>Výsledek:</u>	životnost, regenerace

Doplňující údaje:

Dehydratace: čerstvá hmotnost vzrostných vrcholů, počáteční obsah vody, konečný obsah vody, doba dehydratace, podíl krystalické fáze, přítomnost a charakteristika skelných přechodů (teplota skelného přechodu, změna tepelné kapacity)

Poznámky: odchylky od standardního postupu

f) Stanovení minimálního rozsahu uložených vzorků

Z hlediska konzervace genetických zdrojů rostlin, je velmi důležitá informace, zda počet vzorků uložených v kapalném dusíku umožňuje úspěšnou regeneraci daného genotypu. Pravděpodobnost regenerace rostlin závisí na úspěšnosti regenerace a reprezentativnosti (počtu jedinců) kontrolního vzorku a na počtu vzorků uložených v kapalném dusíku. Na základě regenerace rostlin kontrolního vzorku můžeme stanovit minimální počet rostlin, které lze zregenerovat z rostlin uložených v kapalném dusíku (Dussert *et al.*, 2003). V Tabulce 1 je uvedeno minimální procento regenerace kontrolních rostlin v závislosti na velikosti kontrolního souboru a na počtu uložených vzorků v Dewarově nádobě pro 95%-ní pravděpodobnost regenerace alespoň jedné rostliny.

Doporučený počet vzrostných vrcholů uložených v kapalném dusíku od jednoho genotypu je 120 jedinců a velikost kontrolního vzorku je 40 jedinců. Pro 95 % pravděpodobnost, že z uložených vzorků zregeneruje alespoň jedna rostlina, je nutná desetiprocentní regenerace kontrolních rostlin, tedy čtyři rostliny ze čtyřiceti. V Tabulce 1 je uvedena minimální regenerace kontrolního vzorku pro 95 % pravděpodobnost regenerace alespoň jedné rostliny při různém počtu uložených vzorků v kryobance a různé velikosti kontrolního vzorku.

Pro dosažení jistoty uchování genotypu je nezbytná regenerace minimálně tří explantátů v kontrolním vzorku z celkového počtu uložených vzorků daného genotypu. Při 120-ti explantátech bramboru uložených v kapalném dusíku a 40-ti explantátech v kontrolním vzorku musí regenerace kontroly dosáhnout minimálně 15 %, aby s pravděpodobností minimálně 95 % došlo k regeneraci minimálně tří rostlin bramboru daného genotypu uloženého v kryobance (Tab. 2).

Tab. 1: Minimální procento regenerace kontrolního vzorku, která umožňuje regeneraci alespoň jedné rostliny s pravděpodobností 95 %, v závislosti na počtu kontrolních jedinců a počtu jedinců uložených v kryobance.

Velikost uložené kolekce (počet uložených jedinců)	Velikost kontrolního vzorku (počet jedinců)				
	20	40	60	80	100
100	15	10	8,3	7,5	7
120	15	10	8,3	7,5	6
140	15	10	6,7	6,3	6
160	15	7,5	6,7	6,3	5
180	10	7,5	6,7	6,3	5
200	10	7,5	6,7	5	5

Tab. 2: Minimální počet regenerujících rostlin z celkového počtu uložených explantátů (120 ks) v kapalném dusíku při 95 %-ní pravděpodobnosti v závislosti na procentu regenerace rostlin bramboru po kryokonzervaci v kontrolním vzorku o rozsahu 40 explantátů.

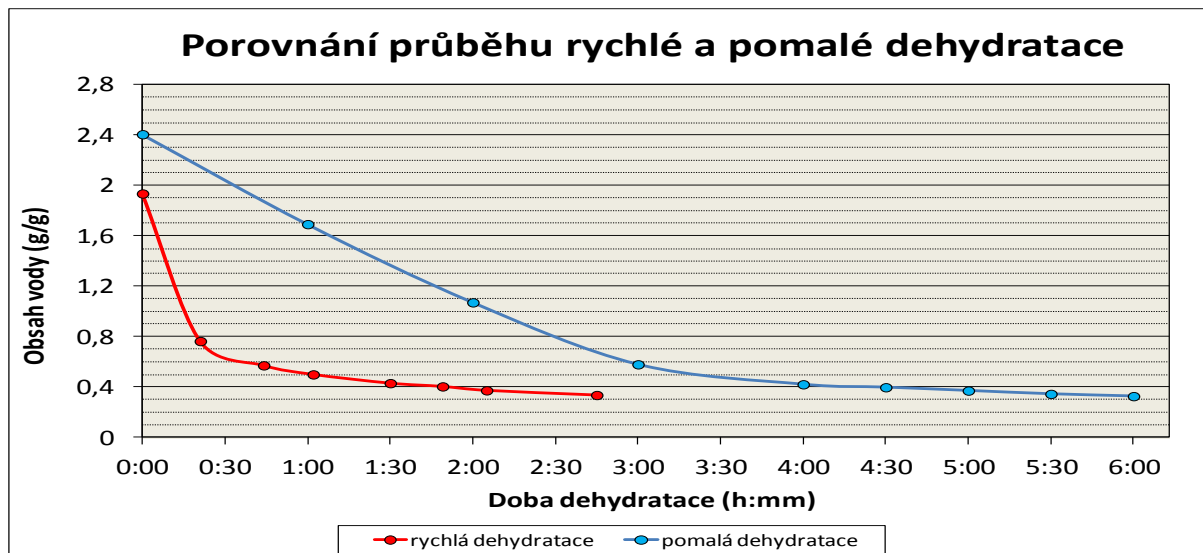
Regenerace v kontrolním vzorku (%)	Minimální regenerace rostlin v kryobance (počet jedinců)
10	1
12,5	2
15	3
17,5	5
20	7
25	10
30	14

Doporučený počet 120 explantátů je uložen v 6-ti kryozkumavkách po 20-ti kusech. Při třech životaschopných explantátech v kryobance pak teoreticky po odtání dvou kryozkumavek dojde k regeneraci jedné rostliny (obnova genotypu) a ve zbývajících čtyřech kryozkumavkách budou uloženy minimálně dva explantáty schopné regenerace do *in vitro* podmínek. V případě, že regenerace kontrolního vzorku je nízká, lze zvýšením rozsahu uložených vzorků (opakováním postupu kryokonzervace) docílit vyhovující pravděpodobnosti obnovení uloženého genotypu. Naopak v případě stabilně vysoké regenerace kontrolního vzorku lze omezit počet uložených vzorků, čímž lze snížit náklady na uložení genotypu.

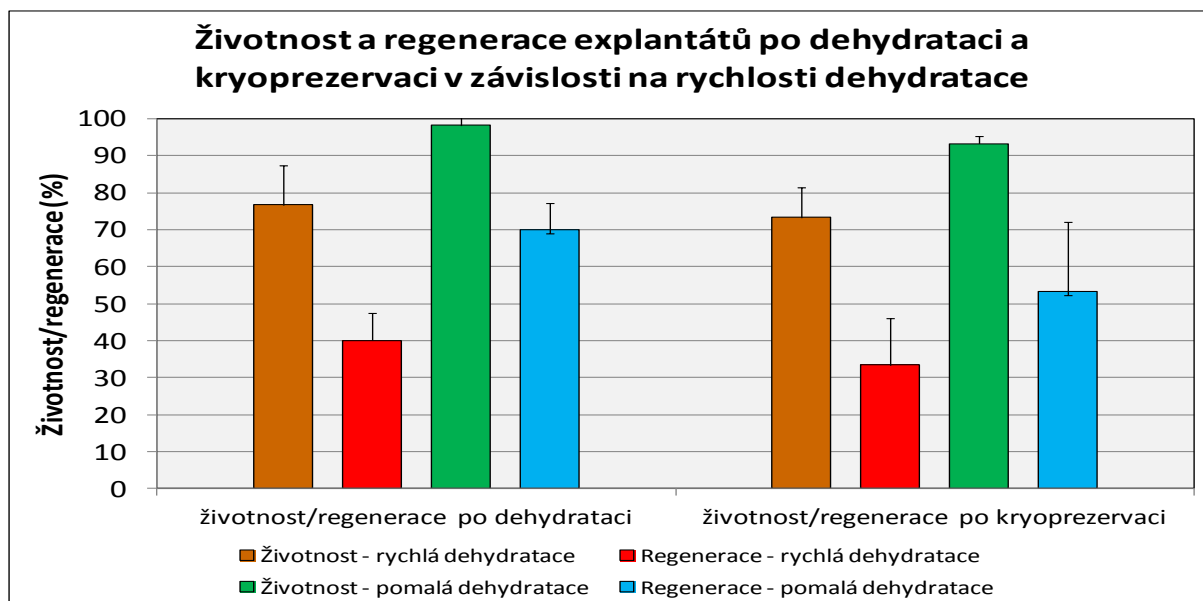
III. Srovnání novosti postupů

Nově navržená metodika přináší nový postup, který umožňuje uchování citlivých genetických zdrojů bramboru. Dosavadní postup uchování byl založen rychlé dehydrataci explantátů nad

silikagelem (Obr. 2), ale u citlivých genotypů bramboru snižoval životnost a regenerační schopnost explantátů (Obr. 3). Nový postup umožňuje kryokonzervovat i citlivé genotypy bramboru díky mírnější, pomalejší dehydrataci (Obr. 2), která nesnižuje jejich životnost a regenerační schopnost (Obr. 3) ve srovnání se standardní metodou kryokonzervace.



Obr. 2: Porovnání rychlosti dehydratace vzrostných vrcholů bramboru (odr. Désirée). Rychlá dehydratace při standardním postupu dehydratace nad silikagelem; pomalá dehydratace při novém postupu v přiklopené Petriho misce v laminárním boxu.



Obr. 3: Porovnání životnosti a regenerace explantátů vzrostných vrcholů bramboru (průměr tří odrůd: Steffi, Carnea, Fruhnudel). Rychlá dehydratace při standardním postupu dehydratace nad silikagelem; pomalá dehydratace při novém postupu v přiklopené Petriho misce v laminárním boxu. Chybové úsečky představují střední chybu průměru naměřených hodnot tří odrůd bramboru.

IV. Popis uplatnění Certifikované metodiky

Uživatelem této metodiky bude MZe ČR a to prostřednictvím „Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin, zvířat a mikroorganismů významných pro výživu a zemědělství“. Tato metodika umožní kryokonzervovat citlivé genotypy bramboru, u

nichž je to jinak velmi obtížné až nemožné, z důvodu jejich citlivosti vůči silné dehydrataci, ke které dochází při standardním postupu kryokonzervace.

V. Ekonomické aspekty

Náklady na zavedení postupů uvedených v metodice závisí na tom, jestli se zavádí nově celý provoz pro práci s rostlinami v aseptických podmínkách nebo se pouze implementuje tato metodika kryokonzervace do stávajících provozů tkáňových kultur. V případě, že laboratoř již postup kryokonzervace explantátů používá, jsou náklady na zavedení nové metodiky nulové.

Náklady na zavedení celého aseptického provozu jsou následující:

Vybavení pro sterilizaci materiálu a kultivačních médií:

autokláv	od 105 tis. Kč (repasovaný do 40 tis. Kč)
horkovzdušný sterilizátor	od 34 tis. Kč
Celkem	od 139 tis. Kč (74 tis. Kč)

Práce s tkáňovými kulturami rostlin v *in vitro* podmínkách:

kultivační box	od 300 tis. Kč (repasovaný od 200 tis. Kč)
laminární box	od 150 tis. Kč
Celkem	od 450 tis. Kč (350 tis. Kč)

Přístroje pro přípravu a uchování kultivačních médií:

analytické váhy	od 43 tis. Kč (bez interní kalibrace od 23 tis. Kč)
přesné váhy	od 7,5 tis. Kč
stolní pH-metr	od 25 tis. Kč
laboratorní míchačka	od 5 tis. Kč
chladnička	cca 4 tis. Kč
mikrovlnná trouba	cca 1 tis. Kč
dávkovač	od 4 tis. Kč
pipety (3 ks)	od 7 tis. Kč
Celkem	od 96,5 tis. Kč (76,5 tis. Kč)

Nádoby na kapalný dusík

Dewarova nádoba na kapalný dusík	27 tis. Kč
Dewarova nádoba na uchování vzorků v kapalném dusíku	50 tis. Kč
Celkem	77 tis. Kč

Spotřební materiál

Sklo	cca 10 tis. Kč
Plasty	cca 12 tis. Kč
Chemikálie	cca 35 tis. Kč
Pinzety, nůžky, skalpely	cca 5 tis. Kč
Celkem	cca 62 tis. Kč

<u>Celková cena za zavedení metodiky</u>	825 tis. Kč (640 tis. Kč)
---	----------------------------------

Z uvedeného přehledu je patrné, že zavedení nové metodiky kryokonzervace explantátů bramboru v *in vitro* podmínkách začíná na částce přibližně 640 tis. Kč, která je odvozena od nákladů za vybavení laboratoře přístroji pro práci s materiálem v aseptických podmínkách. Protože se předpokládá, že nová metodika nahradí standardní metodiku kryokonzervace bramboru v případě citlivých genotypů, lze konstatovat, že zavedení nové metodiky nebude vyžadovat žádné nové investice do nového zařízení ani spotřebního materiálu ve srovnání se stávající metodikou.

Ekonomický přínos pro uživatele

Předpokládané ekonomické přínosy využití této metodiky jsou minimálně 200 tis. Kč ročně při předpokladu každoroční kryokonzervace deseti nových odrůd bramboru. Vychází se ze skutečnosti, že tato částka by byla vynaložena na kryokonzervaci citlivých genotypů bramboru, ale k jejich úspěšné kryokonzervaci by nedošlo. Zmíněná částka vychází z nákladů na namnožení *in vitro* rostlin, jejich otužení a kryokonzervaci, včetně kontrolní regenerace a následného uchování 10 genotypů bramboru na 1 rok. Protože se jedná o metodu určenou pro dlouhodobé uchování genetických zdrojů, souvisí rentabilita této metody s dobou uchování vzorků v kapalném dusíku. Náklady na kryokonzervaci jsou nejvyšší na počátku při zavádění položek do kryobanky, ale samotné náklady na skladování v kapalném dusíku jsou poměrně nízké. Proto lze návratnost vstupních nákladů očekávat po osmi letech kryokonzervace a ekonomický přínos metodiky bude přímo úměrný době uchování vzorků v kapalném dusíku. Hlavním přínosem uplatnění této metodiky však bude bezpečné uchování nejceněnějších genotypů bramboru v podmínkách, které umožňují dlouhodobou neměnnost skladovaného materiálu, což je hlavním požadavkem na uchování jakýchkoliv genetických zdrojů rostlin.

VI. Seznam použité související literatury

- Dussert S, Engelmann F, Noirot M, 2003, Development of probabilistic tools to assist in the establishment and management of cryopreserved plant germplasm collections. *CryoLetters* 24, s. 339-350.
- Grospietsch M., Stodulková, E., Zámečník, J., 1999, Effect of osmotic stress on the dehydration tolerance of *Solanum tuberosum* shoot tips. *CryoLetters* 20, s. 339-346.
- Keller, ERJ, Kaczmarczyk, A, Senula, A, 2008, Cryopreservation for plant genebanks - A matter between high expectations and cautious reservation. *CryoLetters* 29, s. 53-62.
- Murashige T., Skoog F.A., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15, s. 473–497.
- Panta A, Panis B, Ynouye C, Criel B, Swennen R, Roca W, 2006, Improvement of potato cryopreservation for the long-term conservation of Andean landraces at CIP. In: Abstract Book of Cryo 2006. Hamburg

Schaefer-Menuhr A, Mueller E, Wagner EM, 1996, Cryopreservation: an alternative for long-term storage of old potato varieties. Potato Res. 39, s. 507-513

VII. Seznam publikací, které předcházejí metodice

Faltus M., Zamecnik J.: Kryokonzervace bramboru (*Solanum tuberosum*, L.). Metodika pro praxi. Odběratel metodiky: MZe, Vydal: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2008, první vydání, 40 výtisků.

Faltus, M., Bilavčík, A., Zámečník, J., Svoboda, P. & Domkářová, J. 2008. Establishment of cryobank of potato and hop apices in the Czech Republic. In: Laamanen, J., Uosukainen, M., Häggman, H., Nukari, A. & Rantala, S. (eds.). Cryopreservation of crop species in Europe. MTT Agrifood Research Finland, Finland. pp. 44-45.

Faltus M, Zamecnik J and Jadrna P, 2011, Cryopreservation and cryobanking of different vegetatively propagated crops: comparisons and contrasts. COST Action – 871 CryoPlaNet Final meeting 7 -11 February 2011.

Zámečník, J. & Faltus, M. 2011. Behavior of Water in Plants at Low and Ultralow Temperatures. In: Pessarakli, M. (ed.). Handbook of Plant and Crop Stress. CRC Press, United States of America, pp. 288-313.

Zámečník, J., Faltus, M., Bilavčík, A. & Kotková, R. 2012. Comparison of Cryopreservation Methods of Vegetatively Propagated Crops Based on Thermal Analysis. In: Katkov, I. (ed.). Current Frontiers in Cryopreservation. InTech, Rijeka, Croatia, pp. 333-357.

VIII. Dedikace

Metodika je výstupem řešení institucionálního projektu VÚRV, v.v.i. č. RO0416.

IX. Jména oponentů:

Odborný oponent:

Ing. Přemysl Landa, Ph.D.

ÚEB AV ČR, Rozvojová 263, 165 02 Praha 6 - Lysolaje

Oponent ze státní správy:

Mgr. Iva Křížková, Ph.D.

Oddělení OZE a environmentálních strategií, MZe, Těšnov 65/17, 117 05 Praha 1

Název: Metodika kryokonzervace citlivých genotypů bramboru
CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Autoři (podíl na práci): Ing. Miloš Faltus, Ph.D. (50 %)
RNDr. Alois Bilavčík, Ph.D. (25 %)
Ing. Jiří Zámečník, CSc. (25 %)

Vydal: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.
Drnovská 507, 161 06, Praha 6 – Ruzyně

Metodika je veřejně přístupná na adrese www.vurv.cz

Náklad: 40 výtisků

Vyšlo v roce 2016, první vydání

Vydáno bez jazykové úpravy

Kontakt na autory: faltus@vurv.cz
bilavcikurv.cz
zamecnik@vurv.cz

Autor fotografií: Miloš Faltus

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha, 2016
ISBN: 978-80-7427-222-6

