



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

## **Metodika kryokonzervace *in vitro* kultur ovocných dřevin**

METODIKA



Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

2020

Metodika je výstupem řešení institucionálního projektu VÚRV, v.v.i. č. RO0418 a Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agro-biodiversity (č.j.: 51834/2017-MZE-17253). Metodika proběhla oponentním řízením. O uplatnění metodiky byla dne 8. 12. 2020 uzavřena smlouva (č. 64929-2020-MZE-18133) podle ustanovení §1746 odst. 2 zákona č. 89/2012 Sb., občanského zákoníku. MZe, jako certifikační orgán, vydal Osvědčení č. j. 66054/2020-MZE-18133 o uznání metodiky dne 18. 12. 2020.

**Autoři:**

RNDr. Alois Bilavčík Ph.D., VÚRV, v.v.i. Praha

Ing. Miloš Faltus, Ph.D., VÚRV, v.v.i. Praha

Ing. Jiří Zámečník, CSc., VÚRV, v.v.i. Praha

**Oponenti:**

Mgr. Petr Maršík, Ph.D., Ústav experimentální botaniky AV ČR, Praha

Mgr. Iva Křížková, Ph.D., Ministerstvo zemědělství ČR

# **Metodika kryokonzervace *in vitro* kultur ovocných dřevin**

## **METODIKA**

## Kryokonzervace *in vitro* kultur ovocných dřevin

V současnosti se v ČR používají k uchování ovocných dřevin především metody *ex situ* konzervací na stanovišti, a také *in vitro*. Vzhledem ke strategii bezpečného zajištění rozsáhlého potenciálu genetických zdrojů je nezbytné uchovávat ovocné dřeviny také zamrazením do ultranízkých teplot - kryoprezervací. Na širším spektru odrůd jabloně a hrušně byl vyvinut a odzkoušen enkapsulačně dehydratační kryoprezervační protokol. Výsledný kryoprezervační postup umožňuje meristematičtým částem přežít a regeneraci z ultranízkých teplot. Pomocí vyvinutého kryoprezervačního postupu je možné bezpečně uchovat genové zdroje vybraných ovocných dřevin. 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: *in vitro*; genetické zdroje; konzervace; *Malus x domestica* Borkh.; *Pyrus communis* L

## Cryopreservation of *In vitro* cultures of fruit trees

In the Czech Republic, *ex situ* and *in vitro* conservation is used for fruit tree germplasm conservation. In relation to the strategy of maintenance of broad genetic potential of fruit trees, there is a necessity to preserve genotypes by storage at ultralow temperatures, cryoconservation. Based on broad spectrum of apple and pear cultivars, an optimised *in vitro* cryopreservation protocol was developed. The developed encapsulation-dehydration cryoprotocol enables to establish a safe backup storage system for *ex situ* and *in vitro* collections of fruit trees germplasm. 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: *in vitro*, conservation; genetic resources; *Malus x domestica* Borkh.; *Pyrus communis* L.

Vydal Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.  
2020

## Obsah:

|       |                                                           |    |
|-------|-----------------------------------------------------------|----|
| I.    | Cíl metodiky .....                                        | 7  |
| II.   | Úvod.....                                                 | 7  |
| III.  | Vlastní popis metodiky .....                              | 8  |
| a)    | Princip metody .....                                      | 8  |
| b)    | Materiál a metody.....                                    | 11 |
| c)    | Postup metody kryoprezervace <i>in vitro</i> kultur ..... | 13 |
| d)    | Evidence a uložení vzorků při kryokonzervaci .....        | 18 |
| e)    | Kryoprotokol .....                                        | 18 |
| IV.   | Srovnání novosti postupů.....                             | 18 |
| V.    | Popis uplatnění metodiky .....                            | 19 |
| VI.   | Ekonomické aspekty .....                                  | 19 |
| VII.  | Seznam použité související literatury .....               | 20 |
| VIII. | Seznam publikací, které předcházely metodice .....        | 20 |
| IX.   | Dedikace .....                                            | 21 |
| X.    | Jména oponentů:.....                                      | 21 |

## I. Cíl metodiky

Cílem metodiky je optimalizovat postup pro dlouhodobé uchování genových zdrojů ovocných dřevin pomocí uložení *in vitro* kultur v ultranízkých teplotách za pomoci kryoprezervační metody, která není založená vitrificačních roztocích obsahujících potenciálně mutagenní DMSO, ale na postupech přirozeně zvyšujících jejich odolnost k nízkým teplotám.

## II. Úvod

Mezi ovocnými dřevinami patří jabloň domácí (*Malus x domestica* Borkh.) a hrušeň (*Pyrus communis* L) k ekonomicky nejvýznamnějším ovocným druhům mírného pásma. V České republice existují dlouhodobé programy na šlechtění nových odrůd jaderovin a udržovací šlechtění stávajících odrůd. V podmínkách *in situ* existuje mnoho faktorů komplikujících uchování rozmnožovacího materiálu vykazujícího stabilitu a dobrý zdravotní stav. Ten je v praxi vystaven značnému tlaku chorob virového, bakteriálního (karanténní *Erwinia amylovora*), fytoplazmatického (karanténní fytoplazma proliferace jabloně *Candidatus Phytoplasma mali*) a houbového původu, a také stále častějším extrémním výkyvům počasí, které přináší značná a pro rostlinu mnohdy i existenční rizika.

Počet pěstovaných odrůd jednotlivých ovocných dřevin se s rozvojem intenzivního sadářství významně snížil. V současné produkci se např. u hrušně v ČR uplatňuje významně pouze 11 odrůd (Anonym, 2018). Staré, neatraktivní, z pomologického či pěstitelsky technologického hlediska v současnosti nevhodné odrůdy jsou v České republice uchovávány v kolekcích jednotlivých kurátorů ovocných dřevin v sadech. Tyto venkovní kolekce jsou vystaveny různým nepříznivým vlivům, které mohou potenciálně negativně ovlivnit počet uchovávaných položek. Proto je bezpečné zálohování sbírek ovocných druhů jedním z prvořadých úkolů současných programů pro uchování genetického potenciálu vegetativně množených plodin. Kryokonzervace patří v současné době k prakticky jedinému bezpečnému a dlouhodobě výhodnému způsobu takového uchování.

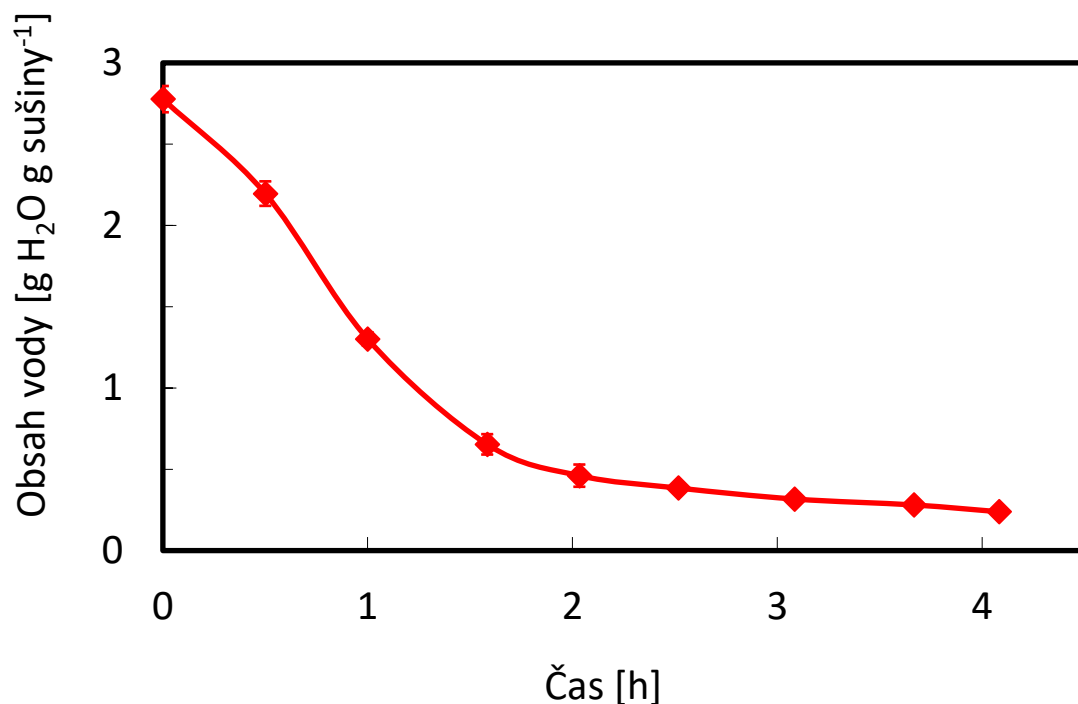
Kryoprezervace je metoda uchovávání rostlin v ultranízkých teplotách. Jedná se o technologii umožňující dlouhodobé uchovávání biologického materiálu při velmi nízké teplotě (nejčastěji v kapalném dusíku při -196 °C), při zachování jeho životaschopnosti po přenesení do normálních podmínek (Towill *et al.*, 2004). Při procesu kryoprezervace je třeba u zamrazovaných částí rostlin navodit takové pochody a stavy, které zvyšují jejich přirozenou odolnost proti tvorbě ledových krystalů v jejich pletivech a související dehydrataci (Faltus *et al.*, 2007; Bilavcik *et al.* 2012). Pro kryoprezervaci ovocných dřevin se využívá jak metod založených na vitrificačních postupech u *in vitro* kultur (Reed *et al.* 1998; Halmagyi *et al.* 2010; Feng *et al.* 2013), tak i na v poslední době znovu zaváděné dvoustupňové kryoprezervaci – především u dormantních pupenů ovocných dřevin (Tyler a Stushnoff, 1988; Towill *et al.*, 2004). Dvoustupňové zamrazování je výhodné vzhledem k potenciálu poměrně rychlého zamrazení většího počtu odrůd, zatímco kryoprezervace *in vitro* kultur je významná při uchování ozdraveného materiálu a pro využití v dalších biotechnologických aplikacích.

### III. Vlastní popis metodiky

#### a) Princip metody

Tato metodika je založena na enkapsulačně dehydratačním zmrazování otužených *in vitro* kultur ovocných dřevin (Reed *et al.*, 1998). V metodickém postupu je nutné dodržovat aseptické podmínky, uchovaný materiál je po zpětném rozmražení regenerovaný v *in vitro* kultuře s následnou možností přenosu *ex vitro*. Účinnost samotné metody kryoprezervace *in vitro* kultur ovocných dřevin je ovlivněna různými faktory, zejména kombinací druhu, genotypu rostliny, schopností otužení se a tolerance k dehydrataci. V průběhu chladového otužení dochází u *in vitro* kultur k řadě fyziologických procesů, které navozují jejich vyšší odolnost k nízkým teplotám (Borkowka 1981; Bilavcik *et al.* 2012).

V současnosti se v oboru kryoprezervace rostlin začíná čím dál více uplatňovat termická charakterizace zamrazovaného materiálu, která vypovídá o fyzikálním chování daného materiálu při jeho vystavení ultranízkým teplotám. Termická analýza charakterizuje výskyt ledové krystalizace, začátek krystalizace a tání, množství krystalické vody a skelné přechody rostlinného materiálu připraveného pro kryoprezervaci.

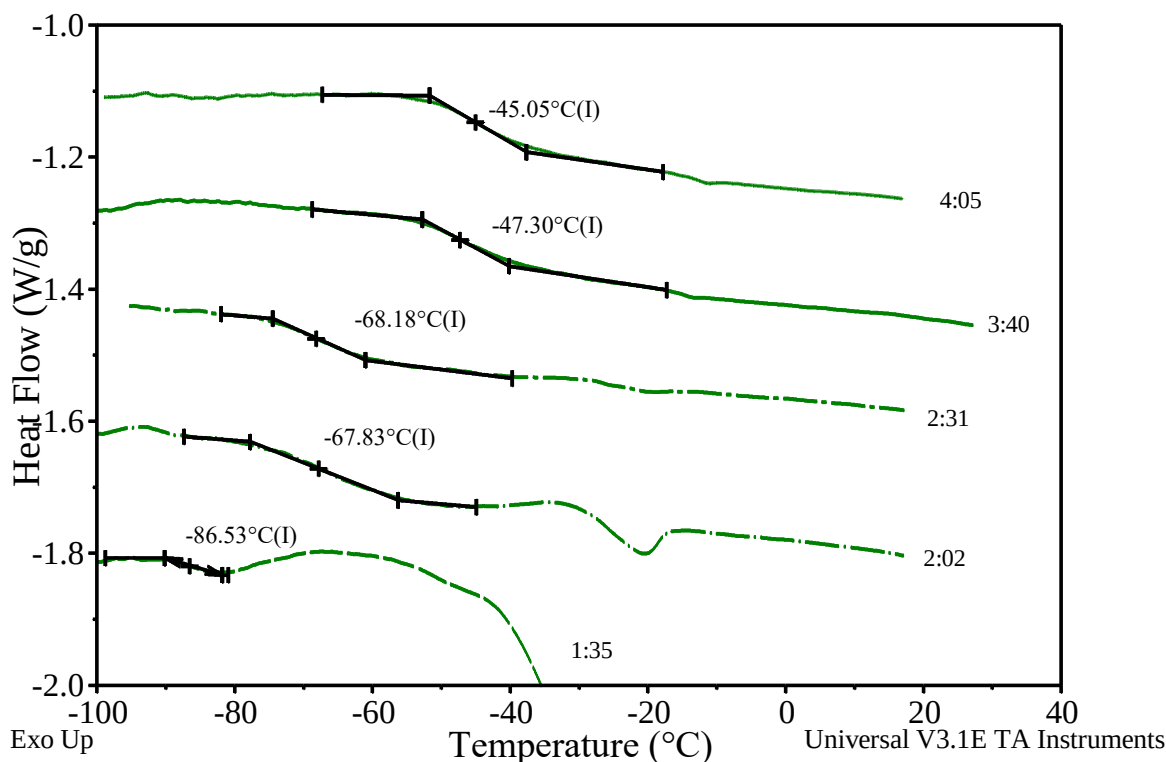


Obr. 1 Průběh dehydratace enkapsulovaných vzrostných vrcholů jabloně 'Greensleeves' v průběhu jejich dehydratace v proudu sterilního vzduchu ve flow-boxu.

V průběhu dehydratace rostlinného materiálu, viz obr. 1, dochází ke změnám v termogramech naměřených pomocí diferenčního skenovacího kalorimetru, ze kterých lze vyvodit, při jakých hodnotách dehydratace již ve vzrostných vrcholech nedochází za daných



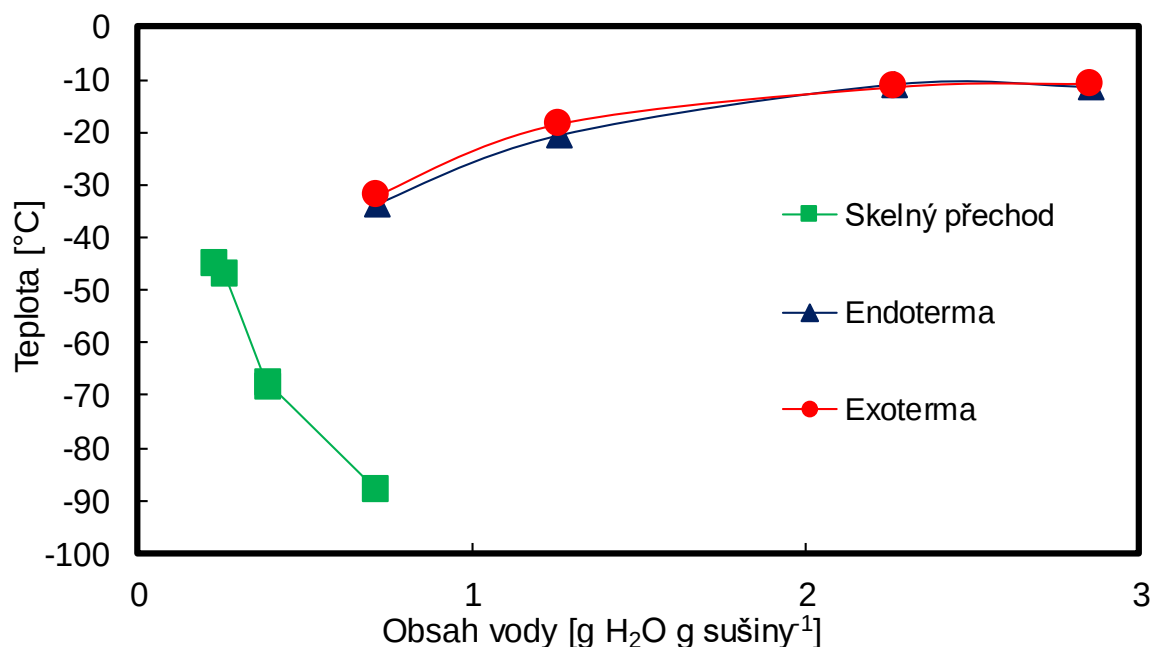
podmínek měření ke krystalizaci ledu. S narůstající dehydratací klesá podíl krystalické složky a dochází k objevení se skelného přechodu a posunu jeho teploty k vyšším teplotám, viz obr. 2.



Obr. 2 Termogramy diferenčního skenovacího kalorimetru enkapsulovaných vzrostných vrcholů jabloně 'Greensleeves' v průběhu jejich dehydratace v proudu sterilního vzduchu ve flow-boxu. Inflexní bod skelného přechodu v grafu je s indexem I. DSC TA2920.

Charakterizace biofyzikálního stavu vzrostných vrcholů *in vitro* kultur pomocí termických technik, především diferenční skenovací kalorimetrií, která umožňuje stanovit podíl krystalické a kapalně formy vody, teplotu přechodu roztoků rostlinného materiálu ve sklo a body mrznutí a tání, nám usnadňuje definovat optimální dobu dehydratace u enkapsulačně dehydratačního kryoprotokolu. Tyto hodnoty dále vypovídají o možných změnách, ke kterým může dojít u různých genotypů v průběhu otužování a působení protektivního roztoku a tím k ovlivnění jejich regenerace. Příklad stanovení vhodné oblasti vysušení - optimálního podílu krystalické vody a skelné fáze - je na obr. 3. Na obr. 3 je teplotní závislost skelného přechodu, exotermie a endotermie na obsahu vody v průběhu dehydratace enkapsulovaných vzrostných vrcholů jabloně 'Greensleeves', ze kterého vyplývá doporučená dehydratace pod úroveň přibližně 0,6 g H<sub>2</sub>O g suš<sup>-1</sup>. Pod touto hranicí dehydratace se ve sledovaném vzorku již nevyskytují ledové krystaly a naopak je zde zastoupena skelná složka. Skelný stav materiálu je pro regeneraci pletiv zásadní, neboť ve skleném stavu vodných roztoků nedochází ke zvětšení objemu, jako při krystalizaci, a tím nemůže dojít k poškození pletiv v průběhu jejich zmrazení a následném odtátí. Pro úspěšnou regeneraci kryoprezervovaných vzrostných vrcholů rostlin

je proto nezbytné využití této biofyzikální techniky pro nastavení optimální dehydratační části dané metodiky.



Obr. 3 Závislost teploty skelného přechodu, začátku exotermy a endotermy na obsahu vody v průběhu dehydratace enkapsulovaných vzrostných vrcholů jabloně 'Greensleeves'.

Na základě znalostí získaných předchozími postupy a publikovanými v původních sděleních o mrazové odolnosti a vlivu ošetření rostlin před kryokonzervací, charakterizací formy typů skupenství vody a vlivu otužení byla vypracována tato optimalizovaná metodika, která umožní efektivní kryoprezervaci *in vitro* kultur ovocných dřevin, především jabloně a hrušně. Další části metodiky popisují postup **přípravy rostlinného materiálu**, vlastní **kryoprezervaci** a následnou **regeneraci rostlinného materiálu**.

## **b) Materiál a metody**

### **1. Přístrojové vybavení**

Pro využití metody kryoprezervace *in vitro* kultur je třeba disponovat následujícím přístrojovým vybavením:

#### ***Vybavení pro pěstování in vitro kultur:***

- kultivační box nastavitelný na 23 °C, 16/8 světelné periodě a 100 - 150  $\mu\text{E s}^{-2} \text{m}^{-2}$
- parní sterilizátor (autokláv)
- horkovzdušný sterilizátor
- pH-metr
- laboratorní míchačka
- mikrovlnná trouba

#### ***Vybavení pro otužení in vitro kultur před vlastním mrazením:***

- kultivační box nastavitelný na 4 °C, 8/16 světelné periodě a 25  $\mu\text{E s}^{-2} \text{m}^{-2}$

#### ***Vybavení pro extirpaci a vysoušení vzrostných vrcholů otužovaných in vitro kultur:***

- laboratorní flow-box s horizontálním proděním vzduchu

#### ***Přístroje pro měření termických charakteristik a obsahu vody:***

- diferenční skenovací kalorimetr (DSC) včetně příslušenství
- analytické váhy, sušárna

#### ***Přístroje pro odtátí vzorků z teplot kapalného dusíku:***

- temperovaná deska pro ohřev destilované vody

#### ***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
- Tabulkový SW (např. MS Excel)

### **2. Chemikálie a kultivační prostředky**

V následujícím seznamu jsou uvedeny všechny chemikálie potřebné pro kryokonzervaci *in vitro* kultur ovocných dřevin.

#### ***Kultivační média a doplňky:***

- MS typ média (Murashige a Skoog, 1962)
- fytohormony (BAP, IBA, GA3)
- agar
- sacharóza, sorbitol

- chlorid vápenatý
- kyselina alginová
- destilovaná voda

***Chladicí a skladovací médium:***

- kapalný dusík

### **3. Drobné pomůcky**

Následující pomůcky jsou potřebné pro realizaci metody kryoprezervace *in vitro* kultur ovocných dřevin:

***Práce s in vitro kulturami:***

- pinzety
- nůžky
- 100 ml Erlenmayerovy baňky, plastové kultivační nádobky
- popisovače
- Petriho misky různých velikostí (průměr cca 15 cm)

***Osmotické otužení:***

- Petriho misky (10 – 12 cm průměr)
- PE-fólie

***Kryokonzervace:***

- plastové pipety (2 ml)
- 2 ml kryoprezervační nádobky (Nalgene)
- polystyrénová nádoba
- papírové krabičky do Dewarovy nádoby
- laboratorní sklo (kádinky)
- pánvičky pro termické měření

#### 4. Rostlinný materiál

Výchozím materiálem pro kryokonzervaci *in vitro* kultur ovocných dřevin jsou *in vitro* kultury ustálené v růstu a multiplikaci. Optimální velikost prýtů *in vitro* kultur je minimálně 2 cm a samotných vzrostných vrcholů o průměru maximálně 2 mm, viz obr. 4. *In vitro* kultury nesmí být hyperhydratované, etiolizované s nekrotizujícími vzrostnými vrcholy, či kontaminací.



Obr. 4. *In vitro* kultura (jabloň 'Greensleeves').

##### c) Postup metody kryoprezervace *in vitro* kultur

Postup kryoprezervace *in vitro* kultur ovocných dřevin, konkrétně jabloně a hrušně, lze rozdělit do pěti postupných kroků:

- Chladové otužování
- Osmotické ošetření
- Enkapsulace vzrostných vrcholů
- Dehydratace ve flow-boxu
- Kryoprezervace
- Regenerace

##### 1. Chladové otužování *in vitro* kultury

Po 14 dnech kultivace *in vitro* kultur na multiplikačním MS médiu se Erlenmayerovy baňky utěsní polyetylenovou fólií a umístí do otužovacího kultivačního boxu do 4 °C, 8/16 světelné periodě a  $25 \mu\text{E s}^{-2} \text{m}^{-2}$ . V těchto podmínkách jsou ponechány optimálně po dobu 6 – 14 týdnů. V průběhu této doby může u *in vitro* kultury dojít k přechodu do dormance a senescenci, viz obr. 5.



Obr. 5 Chladově otužená *in vitro* kultura (jabloň 'Greensleeves').

## 2. Ošetření *in vitro* kultury protektivním roztokem

Po chladovém otužení jsou z *in vitro* rostlin extirpovány vzrostné vrcholy o velikosti 1 - 2 mm u jabloně a 2 mm u hrušně v longitudinálním směru a přibližně 1 - 2 mm v transversálním směru, viz obr. 6. Extirpované vzrostné vrcholy jsou umístěny na Petriho misku s 12 ml MS kultivačního média bez přídavku fytohormonů a přelity 12 ml protektivního roztoku 2M sacharózy s přídavkem kyseliny askorbové 100 mg l<sup>-1</sup>. Poté jsou umístěny do otužovacího kultivačního box nastaveného do 4 °C do tmy na 48 h.



Obr. 6 Extirpované vzrostné vrcholy *in vitro* kultury na MS médiu připravené pro přelití protektivním roztokem sacharózy (hrušeň 'Charneuská').

### 3. Enkapsulace vzrostných vrcholů *in vitro* kultury

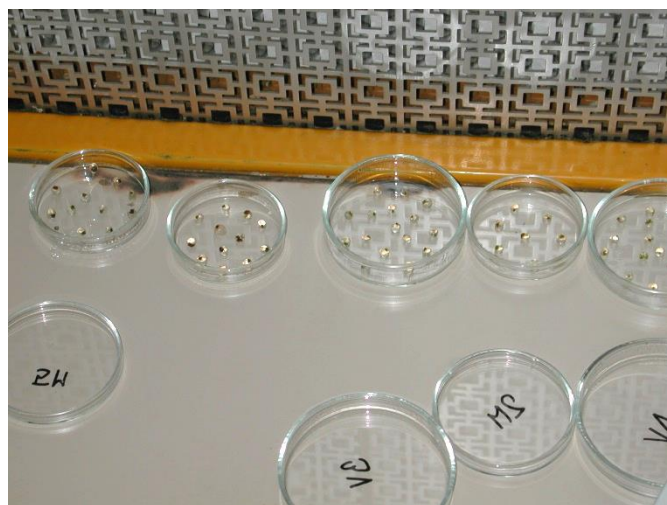
Po protektivním ošetření jsou vzrostné vrcholy enkapsulovány po 10 minutách v alginátu sodném (3% alginát sodný v 0,75M sacharóze) kapáním 2 ml pipetou do zesíťovacího roztoku  $\text{CaCl}_2$  (0,1M  $\text{CaCl}_2$  v 0,6M sacharóze) po dobu 10 minut. Enkapsulované vzrostné vrcholy jsou poté zlehka osušeny na sterilním filtračním papíru, viz obr. 7. V množství průměrně 20 kusů se umístí na Petriho misku o průměru 5 cm pro dehydrataci ve flow-boxu.



Obr. 7 Enkapsulované otužené vzrostné vrcholy *in vitro* kultury v alginátových kuličkách připravené pro dehydrataci ve flow-boxu (jabloň 'Greensleeves').

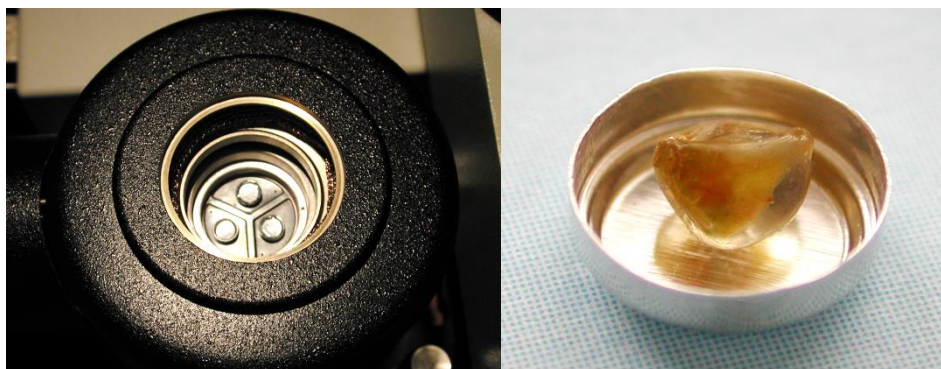
### 4. Dehydratace ve flow-boxu

Dehydratování enkapsulovaných vzrostných vrcholů probíhá proudem vzduchu ve flow-boxu s horizontálním proděním vzduchu za laboratorní teploty po dobu 4 – 6 hodin, viz obr 8. Stupeň vysušení je stanoven na konci dehydratace gravimetricky zvážení vysušeného vzorku a následným výpočtem obsahu vody. Odebere se minimálně 5 kontrolních dehydratovaných vzrostných vrcholů pro stanovení přežití po dehydrataci a několik vzrostných vrcholů pro termickou analýzu (obrázok 9).



Obr. 8. Dehydratace enkapsulovaných vzrostných vrcholů otužené *in vitro* kultury v alginátových kuličkách ve flow-boxu (jabloň 'Greensleeves').





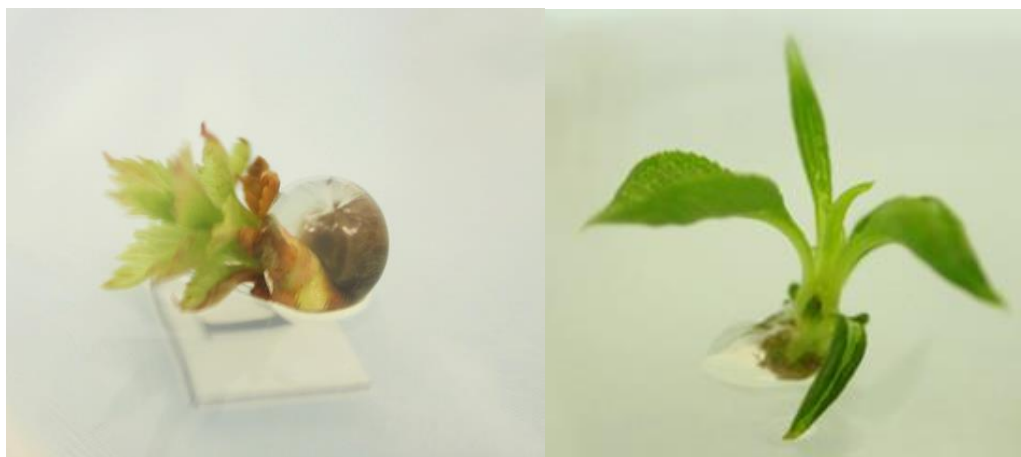
Obr. 9 Enkapsulované otužené vzrostné vrcholy v Al pánvičkách v měřící cele diferenčního skenovacího kalorimetru DSC TA-2920 připravené pro měření termických charakteristik (vlevo). Vzorek v nezavřené pánvičce (vpravo).

### 5. Kryoprezervace

Dehydratované enkapsulované vzrostné vrcholky se uzavřou po 10 až 20 kusech do 2 ml označené kryozkumavky a ponoří do kapalného dusíku v polystyrenové nádobě (rychlost mrazení přibližně  $200\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ). Poté jsou kryozkumavky se vzorky přemístěny do skladovací krabičky a poté do skladovacího systému Dewarovy nádoby s bezpečnostním systémem.

### 6. Regenerace

Minimálně po 1 hodině po kryoprezervaci, obvykle však po 24 hodinách, je kontrolní část vzorků odtáta ponořením do  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  teplé vody na dobu cca 1 minuty a pak jsou enkapsulované vzrostné vrcholy nasazeny na MS médium (s přidavkem fytohormonu BAP  $1\text{ mg l}^{-1}$ ). Přežití vzrostných vrcholů je hodnoceno vizuálně po 14 dnech pomocí metody hnědnutí a regenerace po dalších 14 dnech pomocí růstu (nad  $10\text{ mm}$ ). Pro stanovení úspěšné regenerace je sledováno jejich prorůstání v nové rostliny, viz obr. 10.



Obr. 10. Regenerace enkapsulovaných vzrostných vrcholů otužené *in vitro* kultury v alginátových kuličkách ve flow-boxu (vlevo jabloň 'Rubín', vpravo hrušeň 'Charneuská').

Pro stanovení úspěšnosti kryoprezervace je potřeba zhodnotit, zda počet uložených vzorků umožňuje úspěšnou regeneraci daného genotypu. Na základě regenerace rostlin kontrolního vzorku můžeme stanovit minimální počet rostlin, které lze zregenerovat z rostlin uložených v kapalném dusíku (Dussert *et al.*, 2003). Pro dosažení jistoty uchování genotypu je nezbytná regenerace minimálně tří explantátů v kontrolním vzorku z celkového počtu uložených. Při



120 uložených vzorcích a 20 vrcholech v kontrolním vzorku musí regenerace kontroly dosáhnout minimálně 40 %, aby s pravděpodobností minimálně 95 % došlo k regeneraci minimálně 14 rostlin genotypu uloženého v kryobance. Doporučený počet 120 vzorků je uložen v 6 kryozkumavkách po 20 kusech. Při třech životaschopných vrcholech v kryobance pak teoreticky po odtání dvou kryozkumavek dojde k regeneraci jedné rostliny (obnova genotypu) a ve zbývajících čtyřech kryozkumavkách budou uloženy minimálně dva vrcholy schopné regenerace. Když je regenerace kontrolního vzorku nízká, lze zvýšením rozsahu uložených vzorků 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. Výsledky přežití a regenerace širšího spektra ovocných dřevin různých odrůd jabloně a hrušně kryoprezervovaných pomocí enkapsulačně dehydratační metody jsou uvedeny v Tab. 1 a 2.

Tab. 1. Přežití a růst odrůd jabloně 'Alkmene', 'Golden Delicious', 'Greensleeves', 'Chodské', 'Idared', 'Jonagold', 'McIntosh', 'Prima', 'Rubín' a 'Zvonkové' po enkapsulačně dehydratačním kryoprotokolu (n = celkový počet vzrost. vrcholů pro stanovení regenerace).

| Odrůda<br>Jabloně  | Přežití<br>[%]    | SD   | Růst<br>[%]        | SD   | n  | Počet<br>zamrazení |
|--------------------|-------------------|------|--------------------|------|----|--------------------|
| 'Alkmene'          | 6 <sup>a</sup>    | 0,4  | 6 <sup>a</sup>     | 0,4  | 32 | 2                  |
| 'Golden Delicious' | 75 <sup>bc</sup>  | 27,9 | 55 <sup>bcd</sup>  | 24,7 | 39 | 3                  |
| 'Greensleeves'     | 75 <sup>bc</sup>  | 15,0 | 53 <sup>bcd</sup>  | 7,5  | 30 | 2                  |
| 'Chodské'          | 63 <sup>bc</sup>  | 17,6 | 46 <sup>abcd</sup> | 13,8 | 84 | 5                  |
| 'Idared'           | 34 <sup>abc</sup> | 13,5 | 34 <sup>abc</sup>  | 13,5 | 45 | 2                  |
| 'Jonagold'         | 63 <sup>bc</sup>  | 13,4 | 44 <sup>abcd</sup> | 26,2 | 50 | 3                  |
| 'McIntosh'         | 85 <sup>c</sup>   | 15,0 | 85 <sup>d</sup>    | 15,0 | 20 | 2                  |
| 'Prima'            | 28 <sup>ab</sup>  | 15,0 | 21 <sup>ab</sup>   | 8,0  | 20 | 2                  |
| 'Rubín'            | 78 <sup>bc</sup>  | 11,0 | 78 <sup>cd</sup>   | 11,0 | 32 | 2                  |
| 'Zvonkové'         | 44 <sup>abc</sup> | 18,7 | 4 <sup>a</sup>     | 5,4  | 56 | 4                  |
| Průměr             | 75                | 21,7 | 43                 | 21,2 | 41 | 3                  |

<sup>a-d</sup> průměry následované stejným indexem se signifikantně neliší na hladině  $P < 0,5$  (analýza variance - Duncan test)

Tab. 2. Přežití a růst odrůd hrušně 'Ananaska česká', 'Clappova', 'Charneuská', 'Koporečka', 'Lucasova' a 'Solanka' po enkapsulačně dehydratačním kryoprotokolu (n = celkový počet vzrostných vrcholů pro stanovení regenerace).

| Odrůda<br>Hrušně | Přežití<br>[%]   | SD   | Růst<br>[%]      | SD   | n  | Počet<br>zamrazení |
|------------------|------------------|------|------------------|------|----|--------------------|
| 'Ananaska česká' | 29 <sup>a</sup>  | 9,0  | 15 <sup>a</sup>  | 10,0 | 30 | 2                  |
| 'Clappova'       | 21 <sup>a</sup>  | 8,1  | 14 <sup>a</sup>  | 12,6 | 55 | 3                  |
| 'Charneuská'     | 54 <sup>ab</sup> | 12,8 | 43 <sup>ab</sup> | 18,5 | 32 | 3                  |
| 'Koporečka'      | 68 <sup>b</sup>  | 18,0 | 67 <sup>b</sup>  | 4,0  | 15 | 2                  |
| 'Lucasova'       | 44 <sup>ab</sup> | 16,8 | 42 <sup>ab</sup> | 18,6 | 48 | 5                  |
| 'Solanka'        | 28 <sup>a</sup>  | 11,9 | 16 <sup>a</sup>  | 6,8  | 39 | 3                  |
| Průměr           | 41               | 14,7 | 33               | 17,7 | 37 | 3                  |

<sup>a-b</sup> průměry následované stejným indexem se signifikantně neliší na hladině  $P < 0,5$  (analýza variance - Duncan test)

#### **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 kryozkumavky 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 kryoprezervovaných vzorcích a o metodě kryoprezervace a jejím výsledku. Tyto informace můžeme v případě potřeby doplnit dalšími údaji, které přesněji definují podmínky kryoprezervace a vlastnosti kryoprezervovaných vzorků.

##### **Základní údaje:**

|                  |                                                                           |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| <u>Materiál:</u> | plodina, genotyp, identifikátor GERN Czech, 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 kryoprezervace                                                     |
| <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

#### **IV. Srovnání novosti postupů**

Navržená metodika přináší nový postup, který umožňuje bezpečné uchování *in vitro* kultur ovocných dřevin, jabloně a hrušně. Doposud nebyl podobný komplexní metodický postup uchování genotypů ovocných dřevin založený na kryoprezervaci *in vitro* kultur v České republice publikován. Bezpečnostní duplikaci genofondu ovocných dřevin primárně uchovávaného vsadu lze provádět pomocí *in vitro* kultur či jejich kryoprezervací. Kryokonzervaci ovocných dřevin lze provádět jak pomocí *in vitro* kultur, tak u druhů schopných otužení také pomocí dormantních pupenů. Ačkoliv je kryoprezervace pomocí dormantních pupenů materiálově, personálně a především časově méně náročná než kryoprezervace pomocí *in vitro* kultur, tak ne u všech genotypů sledovaných druhů lze tento postup využít. V případě, že pracoviště disponuje již zavedeným zázemím pro nakládání s *in vitro* kulturami a samotné disponování *in vitro* kulturami tuto metodu kompetitivně využít umožňují. V neposlední míře má metoda kryoprezervace *in vitro* kultur oproti dormantním pupenům nezanedbatelnou výhodu v možnosti uchování ozdraveného materiálu, či okamžité využití rostlin po regeneraci v dalších biotechnologiích založených na *in vitro* kultuře. Je nutné zvážit

výhody obou metod na konkrétním pracovišti a podle toho přizpůsobit strategii bezpečného uchování genofondu ovocných plodin.

## **V. Popis uplatnění 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 bezpečně a efektivně kryokonzervovat *in vitro* kultury rozsáhlého spektra genotypů jabloně a hrušně.

## **VI. Ekonomické aspekty**

Kalkulace nákladů na zavedení kryoprezervačního postupu *in vitro* kultur uvedeného v metodice závisí na tom, zda se zavádí nově celý provoz pro *in vitro* laboratoř a kryoprezervaci nebo se pouze implementuje tato metodika kryokonzervace do stávajícího provozu *in vitro* laboratoře. V případě, že laboratoř již technologii *in vitro* kultur používá, jsou náklady na zavedení nové metodiky prakticky pouze v pořízení Dewarovy nádoby pro skladování vzorků a kapalného dusíku, pomineme-li zařízení pro termickou analýzu. Zařízení pro termickou analýzu (DSC) je nezbytné především při optimalizaci kryoprotokolu u nových druhů či odrůd, které vykazují nízkou regenerační schopnost. Pro bezpečné uchování genotypů ovocných dřevin, jakožto zálohy ke kolekcím v sadu, lze používat *in vitro* kultury. Z dlouhodobého hlediska je však finančně i z hlediska stability genotypu výhodnější metoda kryoprezervace. V případě kryoprezervace pomocí *in vitro* kultur jsou významné náklady na práci s tkáňovými kulturami v aseptických podmínkách; vybavení pro sterilizaci (autoklávy, horkovzdušné sterilizátory), kultivační boxy, laminární boxy, laboratorní přístroje pro přípravu kryoprotektivních roztoků. Tyto náklady se pohybují v případě nového zařízení řádově kolem 500 tis. Kč. Toto zařízení je však často v laboratořích zabývajících *in vitro* kulturami již přítomno. Dále je potřeba skladovací prostor v Dewarových nádobách, který je např. oproti metodice kryoprezervace dormantními pupeny z prostorového hlediska méně náročný, protože uchované dormantní pupeny zabírají řádově 10 x více místa než *in vitro* kultury. Cena jedné skladovací Dewarovy nádoby pro uložení 500 - 800 genotypů ovocných dřevin, v závislosti na úspěšnosti regenerace, pomocí kryoprezervace *in vitro* kultur je přibližně 130 tis. Kč. V případě uchování 500 genotypů v jedné Dewarově nádobě vychází materiálová cena za zavedení jednoho genotypu přibližně 2000 Kč, včetně kryozkumavek, krabičky a kapalného dusíku na zamrazení. Personální náklady jsou přibližně 10000 Kč na jednu položku. Při zamrazení maximálně technologicky zvládnutelných 30 genotypů při kapacitě 12 měsíců (1,0 úvazku) lze celkové náklady ročně odhadovat na 300 tis. Kč. V případě plné naplněnosti Dewarovy skladovací nádoby počtem 4800 vzorků je při 6 kryozkumavkách na odrůdu při udržovacím provozu roční spotřeba kapalného dusíku přibližně 20 tis. Kč, tedy 30 Kč na genotyp. Metoda kryoprezervace *in vitro* kultur je ekonomicky výhodná především při dlouhodobé strategii uchování, kdy např. oproti metodě dormantních pupenů šetří skladové kapacity a uchovává ozdravený materiál, který je možné nadále přímo využít v biotechnologických aplikacích. Samotné bezpečné uchování širokého spektra genotypů jabloně je významné snížením rizika ztráty jedince s potenciálně cennými šlechtitelskými vlastnostmi, což je hlavním přínosem této metodiky pro uživatele.

## **VII. Seznam použité související literatury**

- Anonym 2018, Výsledky sklizní ovoce dle odrůd - skutečnost (2015-2017) a odhad (2018)  
[http://eagri.cz/public/web/file/570720/Vysledky\\_sklizni\\_skutecnost\\_2015\\_2016\\_2017\\_a\\_odhadu\\_sklizni\\_k\\_15.\\_6.\\_2018\\_dle\\_odrud.pdf](http://eagri.cz/public/web/file/570720/Vysledky_sklizni_skutecnost_2015_2016_2017_a_odhadu_sklizni_k_15._6._2018_dle_odrud.pdf)
- Borkowska B, 1981. Dormancy and development of apple axillary buds investigated *in vitro*. Acta Hort. (ISHS) 120:161-166.
- Dussert S, Engelmann F, Noirot M, 2003. Development of probabilistic tools to assist in the establishment and management of cryopreserved plant germplasm collections. CryoLetters 24:339–350.
- Feng CH, Cui ZH, Li BQ, Chen L, Ma YL, Zhao YH, Wang QC, 2013. Duration of sucrose preculture is critical for shoot regrowth of *in vitro*-grown apple shoot-tips cryopreserved by encapsulation-dehydration. Plant Cell Tissue Org Cult 112:369–378.
- Halmagyi A, Deliu C, Isac V, 2010. Cryopreservation of Malus cultivars: comparison of two droplet protocols. Scientia horticulturae, 124:387-392.
- Murashige T, Skoog F, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473-479.
- Reed B, Denoma J, Luo J, Chang Y, Towill L, 1998. Cryopreservation and long-term storage of pear germplasm. *In vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant, 34:256-260
- Towill LE, Forsline PL, Walters C, Waddell JW, Laufmann J, 2004. Cryopreservation of Malus germplasm using a winter vegetative bud method: results from 1915 accessions. Cryo Letters. 25:323-334.
- Tyler NJ, Stushnoff C, 1988. Dehydration of dormant apple buds at different stages of cold acclimation to induce cryopreservability in different cultivars. Can J Plant Sci. 68, 1169-1176.

## **VIII. Seznam publikací, které předcházely metodice**

- Bilavcik A, Zamecnik J, Faltus M, 2015. Cryotolerance of apple tree bud is independent of endodormancy. Frontiers in plant science, 6:13.
- Bilavčík A, Zámečník J, Grospietsch M, Faltus M, Jadrná P, 2012. Dormancy development during cold hardening of *in vitro* cultured Malus domestica Borkh. plants in relation to their frost resistance and cryotolerance. Trees, 26:1181-1192.
- Faltus M, Zámečník J, Bilavčík A, 2007. Odolnost „*in vitro*“ rostlin chmele k desikaci ve vztahu k jejich kryoprezervaci, ISBN 978-80-87011-00-3, In: Vliv abiotických a biotických stresů na vlastnosti rostlin 2007, Praha 21.3.2007, 558-562.

Faltus M, Zamecnik J, 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, 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, 333-357.

## ***IX. Dedikace***

Metodika je výstupem řešení institucionálního projektu VÚRV, v.v.i. č. RO0418 a Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agro-biodiversity (č.j.: 51834/2017-MZE-17253).

## ***X. Jména oponentů***

Odborný oponent:

Mgr. Petr Maršík, 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 *in vitro* kultur ovocných dřevin  
*METODIKA*

Autoři (podíl na práci): RNDr. Alois Bilavčík, Ph.D. (50 %)  
Ing. Miloš Faltus, 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](http://www.vurv.cz)

Náklad: 40 výtisků

Vyšlo v roce 2020, první vydání

Vydáno bez jazykové úpravy

Kontakt na autory: [bilavcik@vurv.cz](mailto:bilavcik@vurv.cz)  
[faltus@vurv.cz](mailto:faltus@vurv.cz)  
[zamecnik@vurv.cz](mailto:zamecnik@vurv.cz)

Autor fotografií: Alois Bilavčík

Poznámky:

