národní
úložiště
šedé
literatury

Kultivace révy vinné v in vitro podmínkách

Faltus, Miloš; Skala, Ondřej; Bilavčík, Alois; Zámečník, Jiří
2012

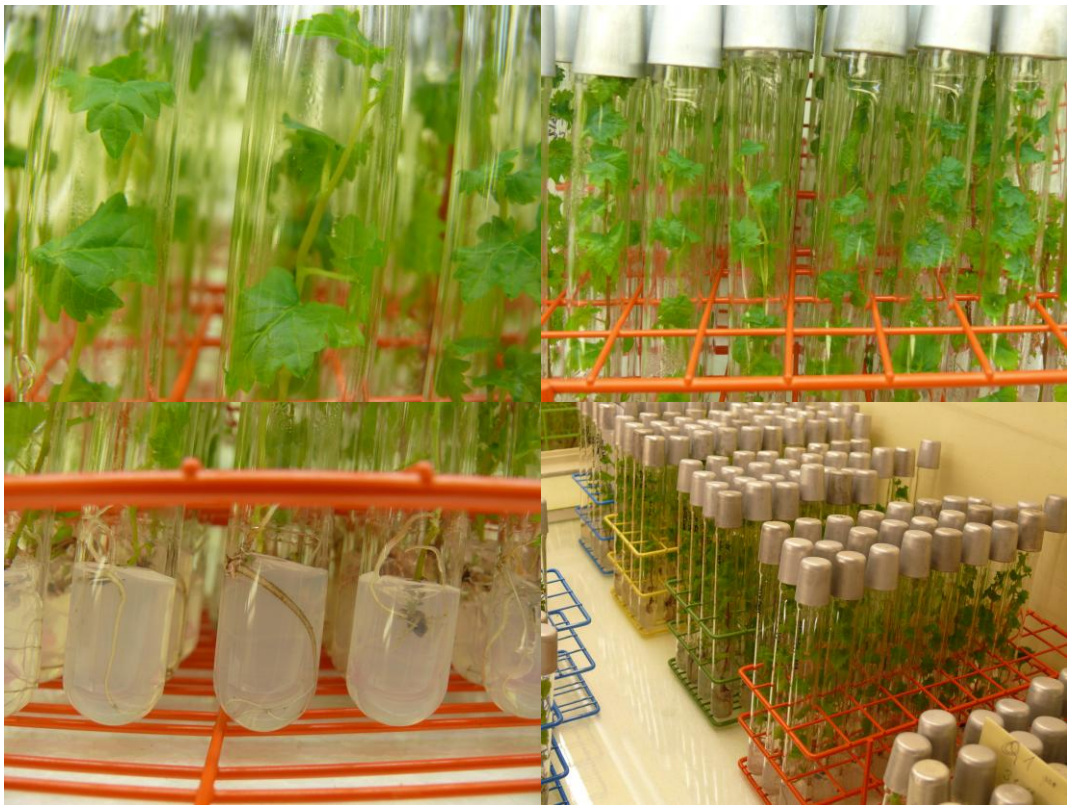
Dostupný z http://www.nusl.cz/ntk/nusl-155629

Dílo je chráněno podle autorského zákona č. 121/2000 Sb.

Tento dokument byl stažen z Národního úložiště šedé literatury (NUŠL).

Datum stažení: 17.07.2024

Další dokumenty můžete najít prostřednictvím vyhledávacího rozhraní nusl.cz .



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

Kultivace révy vinné v *in vitro* podmínkách

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

2012

Metodika je výstupem řešení výzkumného projektu NAZV QH92163 „Kryokonzervace genetických zdrojů révy vinné“. Metodika proběhla oponentním řízením. O uplatnění metodiky byla dne 22.6. 2012 uzavřena smlouva podle ustanovení §269 zákona č. 513/1991 Sb., obchodního zákoníku. MZe, jako certifikační orgán, vydal Osvědčení č.j. 119732/2012 MZE-17220 o uznání uplatněné certifikované metodiky dne 29.6.2012.

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha, 2012
ISBN: 978-80-7427-106-9

Autoři (podíl na práci): Ing. Miloš Faltus, Ph.D. (40 %)
RNDr. Ondřej Skala (20 %)
RNDr. Alois Bilavčík, Ph.D. (20%)
Ing. Jiří Zámečník, CSc. (20 %)

Název: Kultivace révy vinné v *in vitro* podmínkách

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: 250 výtisků

Vyšlo v roce 2012, první vydání

Vydáno bez jazykové úpravy

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

Autoři fotografií: Miloš Faltus (titulní strana, Obr. 3)
Alois Bilavčík (Obr. 2)

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha, 2012
ISBN: 978-80-7427-106-9

Vydal Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.
2012

Miloš Faltus a kol.

Kultivace révy vinné v *in vitro* podmínkách

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Vydal Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.
2012

Kultivace révy vinné v *in vitro* podmínkách

Réva vinná je stará, významná plodina, jejíž pěstování má u nás, především na jižní Moravě, dlouhou tradici. Je to vegetativně množená rostlina a její uchování v polních podmínkách je ovlivněno působením řady abiotických i biotických stresů. V závislosti na ročníku a lokalitě hrozí riziko vymrzání révy a rostliny bývají napadány celou řadou škodlivých patogenů. Kultivace explantátů révy vinné v aseptických podmínkách *in vitro* tato rizika eliminuje. Širší uplatnění tohoto postupu je však limitováno problémy s růstem explantátů révy vinné v *in vitro* podmínkách a častá genotypová závislost růstu explantátů. Tato metodika popisuje postup převodu materiálu do *in vitro* podmínek, postup multiplikace materiálu v *in vitro* podmínkách a podmínky pomalého růstu *in vitro* kultur révy vinné. 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“ kde metodika nahradí stávající metodiku.

Cultivation of grapevine in conditions *in vitro*

Grapevine is a traditional crop in the Czech Republic, especially in the South Moravia region. It is a vegetatively propagated crop; hence vineyards are endangered by abiotic and biotic stress influence. The risk of plant damage due to frost and pest influence occurs in the field conditions according to season and locality. Cultivation of grapevine in conditions *in vitro* eliminates the risk. Higher utilization of the method is limited by sensitivity of some genotype to *in vitro* conditions. This methodology solves these problems and describes material introduction into *in vitro* conditions, explants multiplication and slow growth condition establishment. 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”.

Vydal Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.
2012

Obsah:

I. Cíl metodiky 8
II. Vlastní popis metodiky 8
a) Princip metody 8
b) Materiál a metody 8
c) Převod rostlin révy vinné do podmínek *in vitro* 10
d) Kultivace rostlin révy vinné v podmínkách *in vitro* 12
III. Srovnání novosti postupů 16
IV. Popis uplatnění Certifikované metodiky 17
V. Ekonomické aspekty 17
VI. Seznam použité související literatury 19
VII. Seznam publikací, které předcházely metodice 19
VIII. Dedikace 19
IX. Jména oponentů: 19

I. *Cíl metodiky*

Cílem metodiky je stanovit postup pro introdukci, multiplikaci a uchování rostlin révy vinné v *in vitro* podmínkách.

II. *Vlastní popis metodiky*

a) Princip metody

Principem nové metodiky kultivace révy vinné v *in vitro* podmínkách je jednak přesné definování rostlinného materiálu pro převod do *in vitro* podmínek i pro následnou multiplikaci explantátů a také definování optimálních podmínek růstu tohoto materiálu. Vhodná velikost řízků při multiplikaci rostlin je stejně významných faktorem jako omezení dehydratace materiálu při práci v laminárním boxu, složení kultivačního média či světelné a teplotní podmínky růstu. Právě teplota v kombinaci se složením kultivačního média má rozhodující vliv na snížení nákladů při kultivaci explantátů révy vinné v podmínkách pomalého růstu.

b) Materiál a metody

1. Přístrojové vybavení

Pro využití metody kultivace explantátů révy vinné 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

2. Chemikálie

V následujícím seznamu jsou uvedeny všechny chemikálie potřebné pro aplikaci nové metodiky *in vitro* kultivace révy vinné.

Detergent (smáčedlo):

- Tween 20

Desinfekční činidlo:

- SAVO (5% chlornan sodný + 2% hydroxid sodný)

Kultivační médium:

- 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 indol-3-octová, 6-benzylaminopurin
- sacharosa (P.A.)
- agar (Sigma Aldrich)

Úprava pH média:

- hydroxid - hydroxid draselný
- kyselina - kyselina chlorovodíková

Seznam použitých chemických vzorců a zkratek chemických látek je uveden v Tab. 1 a složení makroelementů, mikroelementů a vitamínů v původní a nové metodice je prezentováno v Tab. 2. Protože jsou uvedená kultivační média dostupné komerčně, použijeme tyto předem namíchané směsi. Příprava roztoků se tak značně zjednodušuje, protože stačí rozpustit připravenou směs v destilované vodě podle údajů na balení a přidat sacharózu, agar, podle potřeby fytohormony a upravit pH v rozmezí 5,5-5,9 pomocí hydroxidu draselného, případně kyseliny chlorovodíkové. Tento způsob přípravy roztoků eliminuje riziko chyb při přípravě kultivačních médií.

Tab. 1: Seznam použitých zkratek chemických sloučenin. Řazeno v abecedním pořadí zkratek.

Chemický vzorec/zkratka	**Název látky**
BAP	6-benzylaminopurin
$Ca(NO_3)_2$ bezvodý	dusičnan vápenatý, bezvodý
$CoCl_2.6H_2O$	chlorid kobaltnatý, hexahydrát
$CuSO_4.5H_2O$	síran měďnatý, pentahydrát
FeNaEDTA	železito-sodná sůl kyseliny etylendiaminotetraoctové
H_3BO_3	kyselina boritá
IAA	kyselina indol-3-octová
KH_2PO_4	dihydrogenfosforečnan draselný
KI	Jodid draselný
KNO_3	dusičnan draselný
$MgSO_4$	síran hořečnatý
$MnSO_4.H_2O$	síran manganatý, monohydrát
$Na_2MoO_4.2H_2O$	molybdenan disodný, dihydrát
NH_4NO_3	dusičnan amonný
$ZnSO_4.7H_2O$	síran zinečnatý, heptahydrát

3. Drobné pomůcky

Následující pomůcky jsou potřebné pro realizaci metody kultivace explantátů révy vinné:

Příprava roztoků a médií:

- Erlenmeyerova baňka 500 ml
- odměrný válec 1000 ml
- Pasteurova pipeta 3 ml
- střička
- váženky
- dávkovač
- magnetické míchadlo
- kopisťka
- pipety a špičky

Práce se sterilním materiálem:

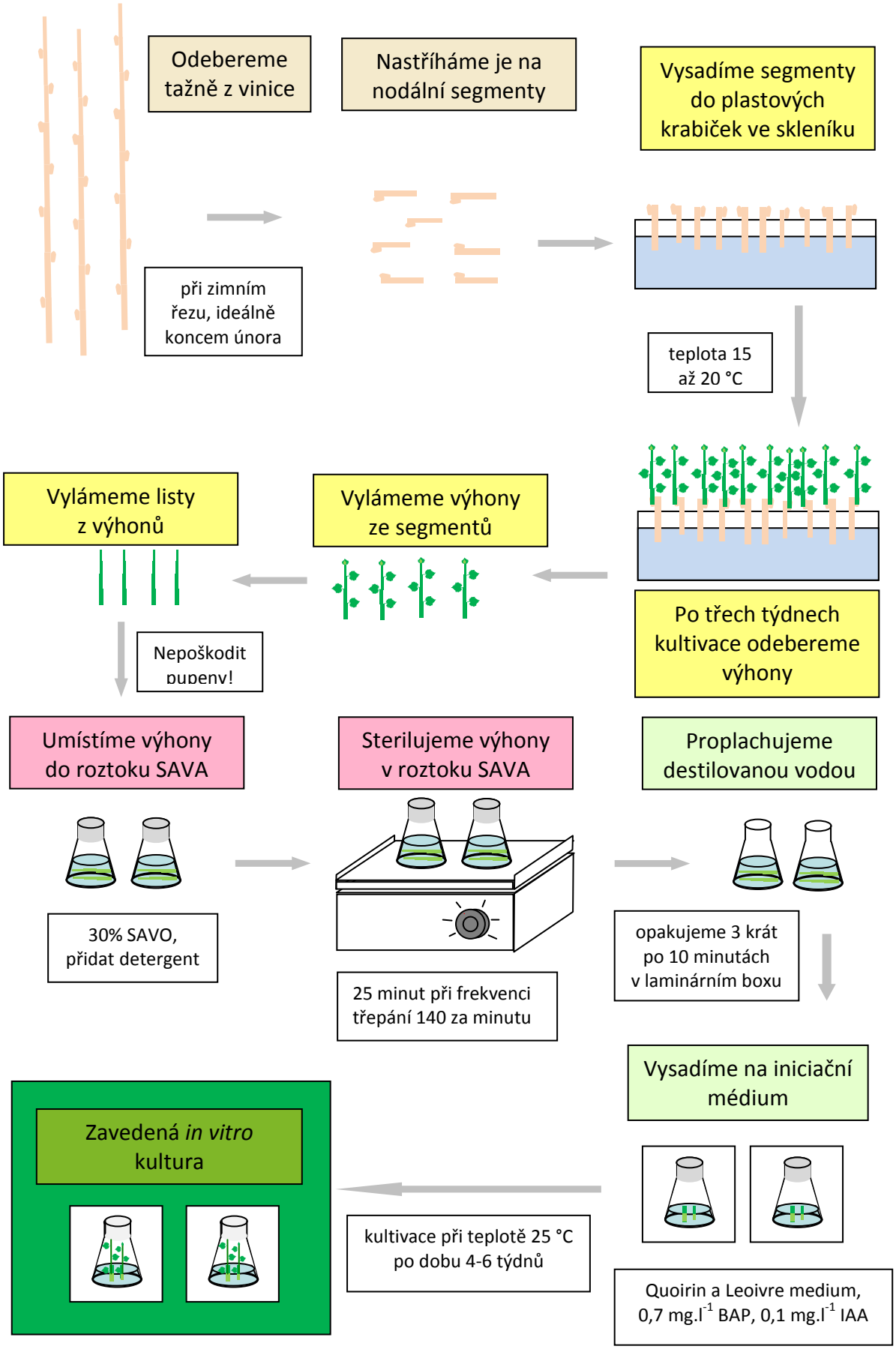
- skalpel, nůžky, pinzety, stojánek na nástroje, hliníková folie

Kultivace rostlin:

- kultivační zkumavky s hliníkovým uzávěrem (rozměry 16 x 1,7 cm)
- stojánek na zkumavky
- Erlenmeyerovy baňky (obsah 100 ml)
- skleněné Petriho misky (průměr 15 cm)

c) Převod rostlin révy vinné do podmínek *in vitro*

Postup převodu rostlin révy vinné je schematicky zobrazen na Obr. 1. Odběr rostlinného materiálu pro převod do podmínek *in vitro* provádíme v zimním období při řezu vinice. Ideálním termínem je konec února po odeznění velkých mrazů. Odstraněné tažně z vinice použijeme jako výchozí materiál pro iniciaci explantátových kultur. Z tažňů nastříháme nodální segmenty (Obr, 2A), které umístíme do vody do plastových vaniček potažených fólií s otvory na fixaci nodálních segmentů (Obr. 2B). Rostliny umístíme do skleníku, případně do kultivačního boxu s teplotou 15 až 20 °C. Vyšší teplota urychluje prorůstání pupenů na segmentech, a tím relativně zkracuje čas pro rozvoj patogenů na odebraných výhonech. Obvykle po 3 týdnech od počátku rašení provádíme první odběry nových výhonů (genotypy raší různě rychle). Odebírané výhony musí být minimálně 2 cm dlouhé s několika vyvinutými listy (Obr. 2C). Výhony vylomíme z nodálních segmentů tažňů a opatrně je zbavíme všech listů vylomením, včetně nejvrchnějšího nevyvinutého listu tak, abychom poškodili vzrostný vrchol. Takto upravené výhony umístíme do Erlenmeyerových baněk a zalijeme je 30% vodným roztokem SAVA s přídavkem detergentu (Tween 20). Baňky uzavřeme alobalovými uzávěry a umístíme na třepačku (frekvence třepání 140/min.) na dobu 25 minut. Od této chvíle materiál považujeme za sterilní. V dalším kroku přeneseme výhony pomocí sterilní pinzety, za účelem odstranění sterilizačního roztoku, v laminárním boxu do Erlenmeyerovy baňky naplněné sterilní destilovanou vodou. Po deseti minutách vodu z baňky slijeme a celý postup proplachování destilovanou vodou ještě dvakrát opakujeme. Baňky s výhony při proplachování ponecháme otevřené v laminárním boxu. Po posledním propláchnutí výhony vyjmeme sterilní pinzetou z vody a vysázíme po dvou kusech do Erlenmeyerových baněk s iniciačním médiem Quoirin a Lepoivre (1977), s přídavkem 6 $g.l^{-1}$ agaru, 3,4 $g.l^{-1}$ sacharózy a fytohormonů (0,7 $mg.l^{-1}$ BAP a 0,1 $mg.l^{-1}$ IAA).



Obr. 1. Postup iniciace in vitro kultury révy vinné.

Obr. 2. Nastříhání tažňů na nodální segmenty (A), kultivace nodálních segmentů v plastových krabičkách (B) a odběr výhonů pro před sterilizací do *in vitro* podmínek (C)

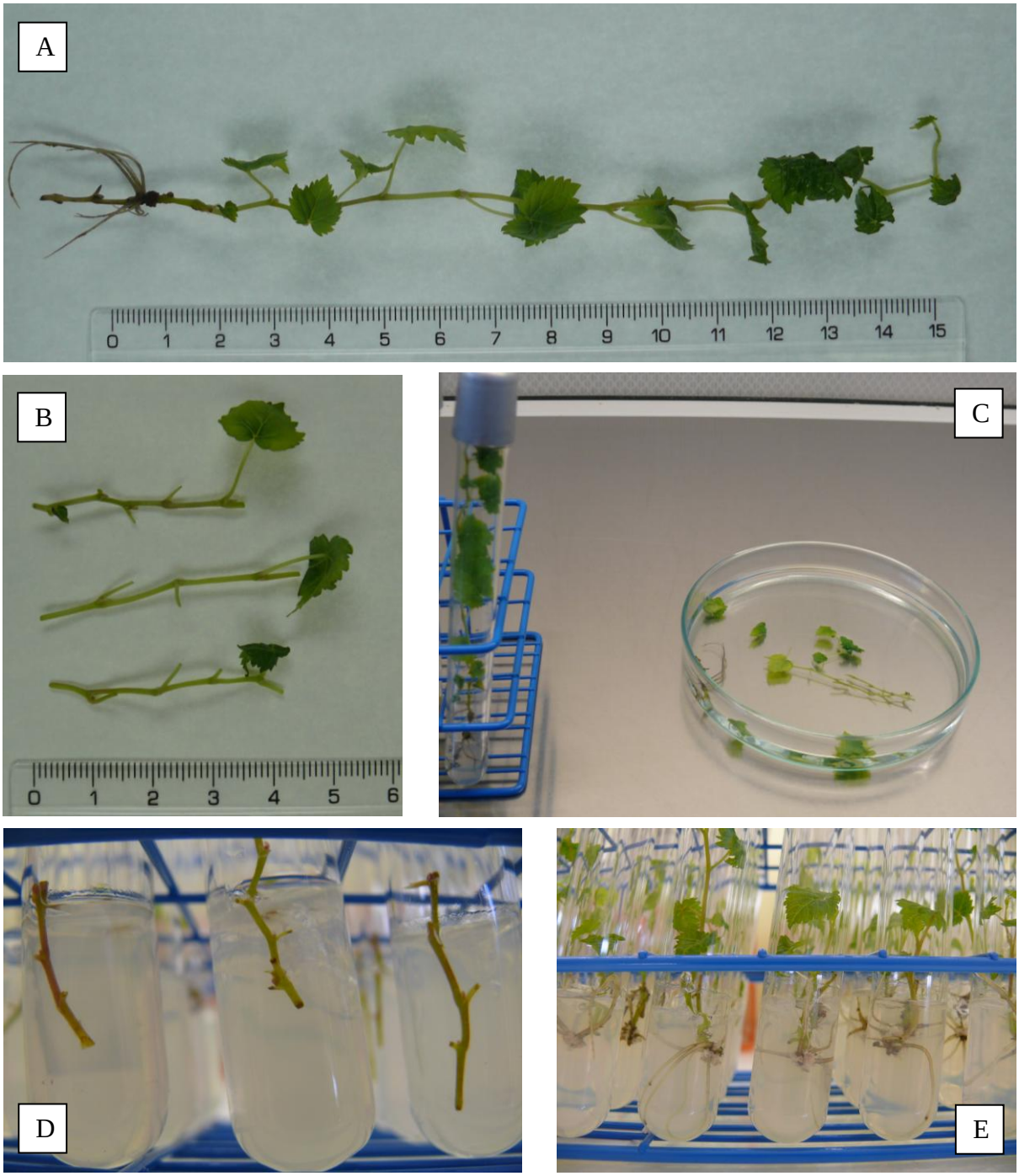
d) Kultivace rostlin révy vinné v podmínkách *in vitro*

1) Zásady multiplikace explantátů révy vinné

Při práci s explantáty révy vinné postupujeme podle zásad práce v aseptickém prostředí. Kromě toho musíme vzít v úvahu, že explantáty révy vinné jsou poměrně citlivé na poškození dehydratací během manipulace v laminárním boxu. Proto musíme pracovat rychle a nevyjímat z kultivačních nádob více materiálu, než je v daný okamžik potřeba, jinak dochází v proudu sterilního vzduchu k rychlé dehydrataci explantátů. S tím souvisí regulace teploty v místnosti, kterou za tímto účelem udržujeme optimálně do hodnoty 22 °C. Pro maximální omezení rizika poškození explantátů révy vinné v důsledku dehydratace při práci v laminárním boxu umístíme explantáty do nádoby s destilovanou vodou, nejlépe Petriho misky, ve které segmenty upravujeme.

Multiplikaci explantátů révy vinné provádíme prostřednictvím stonkových segmentů (Obr. 3). Jistou zvláštností přitom je, že musíme použít, na rozdíl od řady jiných rostlin, vícenodální stonkové segmenty, protože jednonodální segmenty vykazují nízkou regenerační schopnost. Minimální počet nodů na stonkovém segmentu je 2 až 3, přičemž rozhodujícím kritériem je délka segmentu, která musí být vždy větší než 2 cm. Poloha stonkového segmentu v médiu je vertikální, což vede obvykle k regeneraci jednoho až dvou výhonů. Pokud dochází

k prorůstání více výhonů a jejich následnému větvení, jsou takové výhony velmi tenké s velice krátkými nodálními segmenty a jejich použití pro další multiplikaci není vhodné z důvodu špatného růstu. Ponecháním listu na horní části segmentu urychlíme proces regenerace nových rostlin.



Obr. 3: Postup multiplikace révy vinné. Rostlinu vyjmeme ze zkumavky (A) a nařízkujeme na vícenodální stonkové segmenty (B). Celý postup multiplikace provádíme v aseptických podmínkách v laminárním boxu, přičemž vyjmeme pouze takové množství materiálu, které jsme schopni zpracovat a vlastní řízkování provádíme ve vodní lázni (C). Stonkové segmenty umístíme po jednom kusu do zkumavek (D) s médiem a zkumavky umístíme do kultivačního boxu, kde dojde k regeneraci nových rostlin (E).

Z hlediska kvality explantátů jsou pro kultivaci nejvýhodnější skleněné zkumavky, do kterých umístíme po jednom stonkovém segmentu. Pokud umístíme do kultivační nádoby více rostlin (skleněné baňky, plastové krabičky), dochází ke vzájemné kompetici, což vede k vyšší variabilitě ve velikosti a růstu explantátů.

2) Složení kultivačního média

Kultivační médium, respektive jeho složení, zásadním způsobem ovlivňuje růst explantátů révy vinné v podmínkách *in vitro*. Nejvýznamnějšími složkami jsou obsah a zastoupení jednotlivých živin, přítomnost fytohormonů a obsah sacharózy v kultivačním médiu. Reakce explantátů révy vinné na složení kultivačního média je často závislá na genotypu.

Pro kultivaci révy vinné v podmínkách *in vitro* použijeme médium podle Quoirin a Lepoivre (1977), které je komerčně dostupné (katalog Duchefa) jako předem namíchaná směs makroelementů, mikroelementů a vitamínů (Tab. 2), kterou rozpustíme v destilované vodě a dodáme ostatní složky (sacharóza, agar, fytohormony) a nakonec upravíme pH na 5,5-5,9. Použitím komerčně dostupné směsi eliminujeme riziko chyb při přípravě média z jednotlivých solí prostřednictvím zásobních roztoků. Médium podle Quoirin a Lepoivre (1977) má pozitivní vliv na růst explantátů révy vinné, a proto nahradilo původně používané médium podle Chée a Pool (1987), které mělo negativní vliv na růst některých genotypů révy vinné. Příčinou této genotypové citlivosti na toto médium je nevyvážený poměr živin; hlavně vysoký podíl dusíku a především jeho amonné formy (Tab. 2).

Kromě živin jsou významnou součástí kultivačních médií fytohormony, které významně ovlivňují růst i vývoj explantátů. Růst explantátů v podmínkách *in vitro* je pozitivně ovlivňován přítomností prorůstajících kořínků; naopak přítomnost kalusu v bazální zóně segmentu ovlivňuje růst explantátů negativně. Tvorbu a růst kořínků můžeme ovlivnit fytohormonovým složením média. V tomto ohledu je reakce explantátů révy vinné poměrně typická. Přidáním auxinu (IAA) stimulujeme tvorbu kořínků, naopak přidáním cytokininu (BAP), ať už samotného nebo i v kombinaci s auxinem, indukujeme tvorbu kalusu v bazální zóně segmentu. Proto pro indukci a růst kořínků révy vinné aplikujeme auxin do kultivačního média v koncentraci 0,2 $mg.l^{-1}$ IAA.

Sacharóza je složkou kultivačního média, která ovlivňuje růst explantátů dvojím způsobem. Předně je využívána jako zdroj uhlíku, který umožňuje heterotrofní výživu rostlin (nezávislou na intenzitě světla). Zároveň je však sacharóza osmoticky aktivní látkou, která může při zvýšeném obsahu v kultivačním médiu způsobit relativní nedostatek vody – osmotický stres. Původní metodika používala koncentraci sacharózy 3,1 $g.l^{-1}$. Zjistili jsme, že mírně zvýšená koncentrace obsahu sacharózy ovlivňuje pozitivně růst explantátů révy vinné. Proto pro multiplikaci explantátů révy vinné do kultivačního média přidáváme 3,4 $mg.l^{-1}$ sacharosy. Dalším zvýšením koncentrace sacharózy na 5,1 $g.l^{-1}$ v kultivačním médiu omezíme růst explantátů révy vinné. Vedlejším efektem dlouhodobého působení zvýšené koncentrace sacharózy v kultivačním médiu je dřevnatění stonků kultivovaných rostlin, které má pozitivní vliv na délku uchování kultur bez nutnosti časté multiplikace explantátů. Toho můžeme využít při kultivaci explantátů révy vinné v tzv. podmínkách pomalého růstu, při dlouhodobém uchovávání explantátových kultur.

Tab. 2: Obsah makroelementů, mikroelementů a vitamínů a jejich procentické zastoupení v médiích připravených podle původní a nové metodiky na základě informací v katalogu Duchefa v komerčně dostupných předpřipravených směsích.

	Zastoupení jednotlivých složek v kultivačním médiu (mg.l^{-1})			
MÉDIUM	Chée a Pool (původní metodika)	zastoupení složky v médiu %	Quoirin a Lepoivre (nová metodika)	zastoupení složky v médiu %
MAKROELEMENTY				
$Ca(NO_3)_2$ bezvodý	492,3	11	578,92	17
KH_2PO_4	170	4	270	8
KNO_3	1900	43	1800	53
$MgSO_4$	180,54	4	175,79	5
NH_4NO_3	1650	37	400	12
MIKROELEMENTY				
$CoCl_2.6H_2O$	0,025	0,001	0,025	0,001
$CuSO_4.5H_2O$	0,025	0,001	0,025	0,001
FeNaEDTA	36,7	1	36,7	1
H_3BO_3	6,2	0,1	6,2	0,2
KI			0,08	0,02
$MnSO_4.H_2O$	0,85	0,02	0,76	0,02
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,25	0,01	0,25	0,01
$ZnSO_4.7H_2O$	8,6	0,2	8,6	0,3
VITAMÍNY				
myo-inositol*	10	0,2	100	3
kyselina nikotinová	1	0,02		
pyridoxin	1	0,02		
thiamin	1	0,02	0,4	0,01
Celkový obsah živin	4458,5	100	3377,8	100

* *I když myo-inositol nepatří mezi vitamíny, je v katalogu Duchefa zařazen do této kategorie*

3) Teplota kultivace a intenzita osvětlení

Réva vinná je rostlina poměrně náročná na teplotu. Všeobecně se uznává teplota 10 °C jako vegetační nula pro evropskou vinnou révu, a proto kultivace révy vinné v podmínkách *in vitro* vyžaduje poměrně vysokou teplotu. Pro multiplikaci révy vinné v podmínkách *in vitro* udržujeme teplotu 25 °C. Další zvyšování teploty může vést k předčasnému vysychání kultivačního média a zhoršení kvality explantátů. Pokud naopak snížíme teplotu pod 25 °C, dosáhneme zpomalení růstu explantátů. Toho můžeme využít pro uchování genofondu v podmínkách pomalého růstu při teplotě 15 °C, kdy dochází k výraznému zpomalení růstu, ale nedochází k poškození explantátů nízkou teplotou.

Vzhledem k již uvedenému faktu, že kultivační médium umožňuje heterotrofní výživu rostlin, ztrácí intenzita osvětlení primární význam jako zdroj energie pro fotosyntézu, ale zachovává si úlohu při fotomorfogenezi. Je známo, že nízká intenzita osvětlení stimuluje růst rostlin. Pro růst explantátů révy vinné proto použijeme intenzitu osvětlení rostlin 40 µmol m^{-2} s^{-1}. Jako zdroj záření použijeme zářivkové trubice s upraveným spektrem pro pěstování rostlin (Fluora).

4) Multiplikace a dlouhodobé uchování explantátů

Pro multiplikaci révy vinné v podmínkách *in vitro* použijeme médium založené na komerčně dostupné (katalog Duchefa) směsi makroprvků, mikroprvků a vitamínů podle Quiorin a Lepoivre (1977), do níž přidáme 3,4 $g.l^{-1}$ sacharózy, 6 $g.l^{-1}$ agaru a 0,2 $mg.l^{-1}$ IAA a nakonec upravíme pH na 5,5-5,9. Toto médium bylo úspěšně otestováno autory této metodiky při kultivaci explantátů 30 genotypů révy vinné. Pro kultivaci explantátů použijeme zkumavky s kovovým uzávěrem, do kterých vložíme jeden stonkový segment o délce minimálně 2 cm s minimálně dvěma nodálními segmenty. Segmenty připravíme v laminárním boxu ve vodní lázni pro eliminaci rizika dehydratace. V kultivačním boxu udržujeme teplotu 25 °C s intenzitou osvětlení 40 µmol m^{-2} s^{-1} a 16 hodinovou světelnou periodu. Subkultivační interval udržujeme v rozmezí 6-8 týdnů.

Pro podmínky pomalého růstu použijeme rovněž kultivační médium založené na komerčně dostupné (katalog Duchefa) směsi makroprvků, mikroprvků a vitamínů podle Quiorin a Lepoivre (1977), do níž přidáme 5,1 $g.l^{-1}$ sacharózy, 6 $g.l^{-1}$ agaru a 0,2 $mg.l^{-1}$ IAA a nakonec upravíme pH na 5,5-5,9. Tím, že použijeme vyšší koncentraci sacharosy v médiu, dojde ke zpomalení růstu již při teplotě 25 °C. Po nárůstu explantátů do ¾ velikosti nádoby, explantáty přeneseme do kultivačního boxu s teplotou 15 °C, tj. do podmínek tzv. pomalého růstu. Intenzitu osvětlení ponecháme 40 µmol m^{-2} s^{-1} a fotoperiodu 16 hodin světla jako při multiplikaci explantátů révy. Subkultivační interval tímto prodloužíme v závislosti na genotypu na 16-20 týdnů.

III. Srovnání novosti postupů

I když je metoda kultivace révy vinné v *in vitro* podmínkách známá a používaná řadu let v různých zemích světa, stále je tento postup doprovázen problémy s odrůdovou citlivostí na podmínky kultivace, především pak na složení kultivačního média. To byl také hlavní důvod vytvoření nové metodiky. Nově navržená metodika oproti metodice původně používané v rámci „Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin, zvířat a mikroorganismů významných pro výživu a zemědělství“ pro převod a uchování kolekce révy vinné v *in vitro* podmínkách přináší několik změn. Tyto změny se týkají způsobu převodu rostlin do *in vitro* podmínek, složení kultivačních médií, použitých kultivačních nádob a osvětlení rostlin.

Původní metodika používala pro desinfekci výhonů k jejich převodu do *in vitro* podmínek vysoce toxický chlorid rtuťnatý. Nová metodika nahradila chlorid rtuťnatý roztokem SAVA, které je pro životní prostředí a zdraví člověka výrazně nižší zátěží. Původní metodika využívala rovněž médium, které bylo založeno na obsahu živin podle Chée a Pool (1987). Bylo

však zjištěno, že toto médium není příliš vhodné pro kultivaci explantátů révy, zvláště pak některých citlivých genotypů jako Müller Thurgau či Portugal modrý. Původní metodika používala jako zdroj světla rtuťové výbojky, jejichž nevýhodou byl velký příkon, velký výdej tepelné energie a tím vyšší nároky na chlazení a horší, nehomogenní distribuce osvětlení explantátů. Nová metodika využívá zářivkové trubice, které mají nižší spotřebu elektrické energie, nižší nároky na prostor a umožňují homogenní distribuci světla v kultivačním boxu.

Nová metodika kultivace révy vinné v podmínkách *in vitro* odstraňuje tyto nedostatky a navíc přesně specifikuje podmínky multiplikace explantátů. Doporučené využití zkumavek pro kultivaci explantátů přináší vyšší kvalitu rostlin a zároveň nižší riziko ztráty genotypu v případě náhodné kontaminace. Nová metodika přesně specifikuje zejména teplotní podmínky růstu a zároveň umožňuje, pomocí zvýšené koncentrace sacharosy v médiu, uchovat explantáty v podmínkách pomalého růstu i v případě zachování běžné růstové teploty. V případě využití snížené teploty kultivace explantátů je možné významným způsobem snížit pracnost i cenu za uchování genotypů révy vinné v *in vitro* podmínkách.

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“. Využitím této metodiky v „Národním programu“ dojde k vytvoření bezpečnostní zálohy nejcennějších genotypů révy vinné, a tím dojde k eliminaci rizik ztráty cenných genotypů v polních podmínkách, které hrozí především v důsledku vymrzání.

V. Ekonomické aspekty

Náklady na zavedení metody

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 implementují metodické zásady a postupy kultivace explantátů révy vinné do stávajících provozů tkáňových kultur. V případě, že laboratoř již postup kultivace explantátů používá, jsou náklady na zavedení postupu dané pouze nákupem chemikálií pro kultivaci rostlin, pokud nejsou již k dispozici.

Náklady na zavedení celého aseptického provozu lze rozdělit do několika oblastí:

<u>Vybavení pro sterilizaci materiálu a kultivačních médií:</u>

autokláv	od 105 tis. Kč (repasovaný do 40 tis. Kč)
horkovzdušný sterilizátor	od 34 tis. Kč
třepačka	od 38 tis. Kč
Celkem	**od 177 tis. Kč (112 tis. Kč)**

<u>Práce s tkáňovými kulturami rostlin v *in vitro* podmínkách:</u>

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)**

Spotřební materiál

Sklo	cca 10 tis. Kč
Plasty	cca 10 tis. Kč
Chemikálie	cca 20 tis. Kč
Pinzety, nůžky, skalpely	cca 5 tis. Kč
Celkem	**cca 40 tis. Kč**

Cena za zavedení celého provozu 769 tis. Kč (584 tis. Kč)

Z uvedeného přehledu je patrné, že zavedení celého provozu kultivace révy vinné v *in vitro* podmínkách začíná na částce přibližně 600 tis. Kč, která je odvozena od nákladů za vybavení laboratoře přístroji pro práci s materiálem v aseptických podmínkách. Pokud laboratoř již využívá metodu kultivace révy vinné v podmínkách *in vitro*, jsou náklady na zavedení nového postupu víceméně nulové, protože pro novou metodiku není třeba žádné nové vybavení. Ceny různých předpřipravených kultivačních médií v rámci jednoho dodavatele se mezi sebou významně neliší a tak změna kultivačního média neznamená významnou změnu nákladů.

Ekonomický přínos pro uživatele

Ekonomický přínos pro uživatele souvisí s vyšší kvalitou explantátů a s vyšším množitelským koeficientem. Hlavní ekonomický přínos je však dosažen v případě uchování genofondu v podmínkách pomalého růstu díky úspoře chemikálií a pracovní síly.

Náklady na jednu pasáž jedné odrůdy (10 rostlin):

Médium	80 Kč
Pracovní síla	120 Kč
Režie	80 Kč
Odpisy	20 Kč
Celkem	**300 Kč**

Náklady na udržení jedné odrůdy révy vinné za rok je v podmínkách pomalého růstu (3 pasáže) v průměru 900 Kč. Ve srovnání s předchozí metodikou se jedná o úsporu až 2700 Kč. To vychází z předpokladu, že náklady na multiplikaci rostlin v normálních růstových

podmínkách jsou 1800 Kč za rok při 6 pasážích za rok a horší kvalita rostlin při využití původní metodiky vyžadovala vyšší objem zpracovávaného materiálu v průměru dvakrát, což činí částku 3600 Kč pro udržení jedné odrůdy révy vinné za rok. Zavedení nové metodiky tedy ušetří až 18 tis. Kč za rok pro uchování 10 genotypů révy vinné.

VI. Seznam použité související literatury

Duchefa, Catalogue 2010-2012, Plant Cell and Tissue Culture, Phytopathology, Biochemicals, Duchefa Biochemie B.V., Haarlem, The Netherlands, 192 pp.

Chée R., Pool, R.M., 1987, Improved Inorganic Media Constituents for *In Vitro* Shoot Multiplication of Vitis, Scientia Horticulturae 32, s. 85-95.

Quoirin, M., Lepoivre P., 1977, Improved medium for *in vitro* culture of Prunus sp. Acta. Hort. 78, s. 437-442.

VII. Seznam publikací, které předcházely metodice

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.

VIII. Dedikace

Metodika je výstupem řešení výzkumného projektu NAZV QH92163 „Kryokonzervace genetických zdrojů vinné révy“.

IX. Jména oponentů:

Odborný oponent:
Ing. Břetislav Křižan, Ph.D.
Mendelova univerzita v Brně, Zahradnická fakulta, Valtická 337, 691 44 Lednice

Oponent ze státní správy:
Ing. Jitka Potměšilová, CSc.
Odbor zemědělských komodit, Mze, Těšnov 65/17, 117 05 Praha 1