



národní
úložiště
šedé
literatury

Kryokonzervace dormantních pupenů jabloně

Bilavčík, Alois; Faltus, Miloš; Zámečník, Jiří
2018

Dostupný z <http://www.nusl.cz/ntk/nusl-407839>

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

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

Datum stažení: 05.05.2024

Další dokumenty můžete najít prostřednictvím vyhledávacího rozhraní [nusl.cz](http://www.nusl.cz) .



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

Metodika kryokonzervace dormantních pupenů jableň

METODIKA



Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

2018

Metodika je výstupem řešení institucionálního projektu VÚRV, v.v.i. č. RO0418 a výzkumného projektu NAZV QJ1630301. Metodika proběhla oponentním řízením. O uplatnění metodiky byla dne 4. 12. 2018 uzavřena smlouva (č. 19/2018) podle ustanovení §269 zákon č. 513/1991 Sb., obchodního zákoníku. MZe, jako certifikační orgán, vydal Osvědčení č. j. 73085/2018-MZE-17233 o uznání metodiky dne 20. 12. 2018.

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

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha, 2018

ISBN: 978-80-7427-295-0

Metodika kryokonzervace dormantních pupenů jabloně

METODIKA

Kryokonzervace dormantních pupenů jabloně

V současnosti se v ČR používají k uchování jabloně především metody *ex situ* konzervací na stanovišti, a také *in vitro*. Vzhledem ke strategii bezpečného zajištění rozsáhlého potenciálu genetických zdrojů je nezbytné uchovávat jabloně také zamrazením do ultra nízkých teplot - kryoprezervací. Na širším spektru odrůd jabloně byl vyvinut a odzkoušen dvoustupňový kryoprezervační protokol pro dormantní pupeny. Výsledný kryoprezervační postup umožňuje meristemickým částem přežití a regeneraci z ultra nízkých teplot. Pomocí vyvinutého kryoprezervačního postupu je možné bezpečně uchovat genové zdroje jabloně. 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: jabloň; genetické zdroje; konzervace; *Malus x domestica* Borkh.

Apple dormant bud cryopreservation

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

Obsah:

I.	Cíl metodiky.....	6
II.	Úvod	6
III.	Vlastní popis metodiky	6
	a) Princip metody	6
	b) Materiál a metody.....	8
	c) Postup metody kryoprezervace dormantních pupenů jabloně	11
IV.	Srovnání novosti postupů	15
V.	Popis uplatnění Certifikované metodiky	15
VI.	Ekonomické aspekty	15
VII.	Seznam použité související literatury	16
VIII.	Seznam publikací, které předcházely metodice	17
IX.	Dedikace	17
X.	Jména oponentů:.....	17

I. Cíl metodiky

Cílem metodiky je optimalizovat postup pro dlouhodobé uchování genových zdrojů jabloně pomocí uložení dormantních pupenů při ultranízkých teplotách v životaschopném stavu.

II. Úvod

Jabloň domácí (*Malus x domestica* Borkh.) patří 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, mnohdy pro rostlinu i existenční rizika.

Uchování v podmínkách *in situ* a *ex situ* (polní kolekce) má značné prostorové nároky, zejména v případě opakování důležitých genotypů na více lokalitách pro snížení rizika jejich ztráty a uchování odrůd. Vzhledem k tomu, že odrůdy jaderovin jsou ze šlechtitelského hlediska klony, jejichž osivo je heterozygotní, neexistuje možnost jejich souběžného uchování v semenné formě. Kultury *in vitro* je možné používat jako záložní pro uchovávání vybraných klonů, je zde však zvýšené riziko mutací, například díky neodhalené nepřímé organogenezi či vysoké koncentraci růstových hormonů v kultivačním médiu. *In vitro* kultury též vyžadují pravidelnou subkultivaci, při níž může častěji docházet ke ztrátám díky kontaminacím či technickým problémům (Lambardi *et al.* 2006; Kovalchuk *et al.* 2009). Tato metoda se proto nedá považovat za dlouhodobě bezpečný způsob uchovávání genetického materiálu.

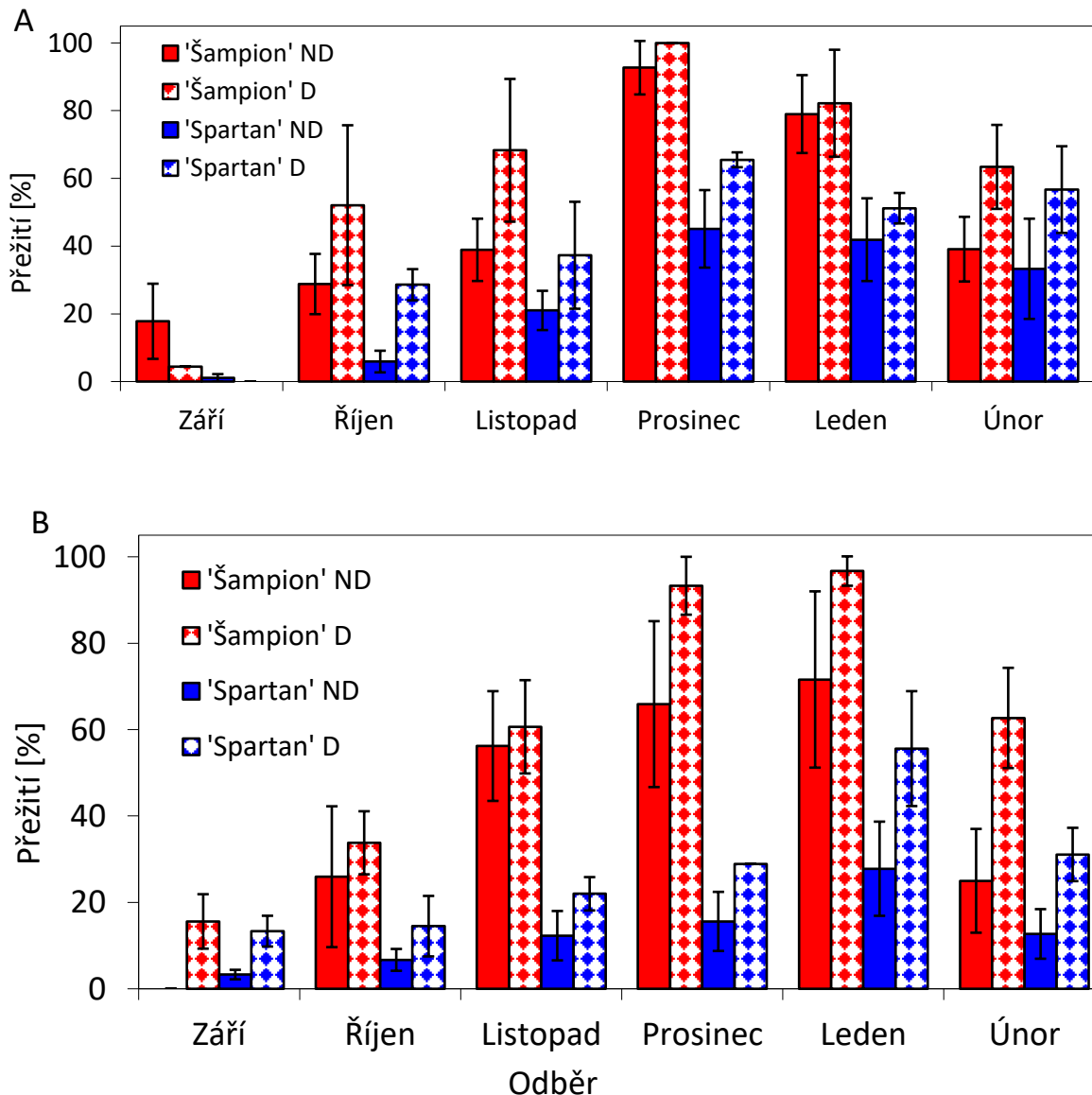
Jako vhodné řešení výše zmíněných problémů se nabízí metoda kryoprezervace. Metoda je založena na uchovávání živého materiálu při kryogenních teplotách v tekutém dusíku (-196 °C), přičemž dochází k zástavě chemických, a tedy i metabolických dějů v buňkách. Během skladování v podmínkách ultranízkých teplot nepůsobí na materiál žádné negativní vlivy okolního prostředí či patogenů, z principu nedochází v této fázi ani k mutacím. Metoda kryoprezervace je tedy velmi vhodným nástrojem pro konzervaci vegetativně množených rostlin po dlouhou dobu a to v nezměněné formě (Forsline *et al.* 1998). Co se týká rodu *Malus*, byly v posledních dekádách publikovány různé způsoby kryoprezervace *in vitro* kultur (např. Wu *et al.* 1999; Halmagyi *et al.* 2010; Feng *et al.* 2013). Tyto metody jsou však pro rutinní zamrazování pro uchování v kryobance relativně nákladné a především náročné na laboratorní práci a vysoce kvalifikovaný personál. Vyžadují například ne vždy spolehlivé převedení jabloňového explantátu do aseptických podmínek. Zejména z praktických důvodů je proto zajímavou možností kryoprezervace dormantních pupenů.

III. Vlastní popis metodiky

a) Princip metody

Tato metodika je založena na pomalém zmrazování otužených, mrazově dehydratovaných pupenů v dormantním stavu (Stushnoff a Seufferheld 1995). Není zde nutné dodržovat aseptické podmínky a uchovaný materiál je po zpětném rozmražení možno rovnou použít jako množící materiál (očkování). Účinnost samotné metody kryoprezervace dormantních pupenů je ovlivněna různými faktory, zejména pak **kombinací genotypu rostliny**

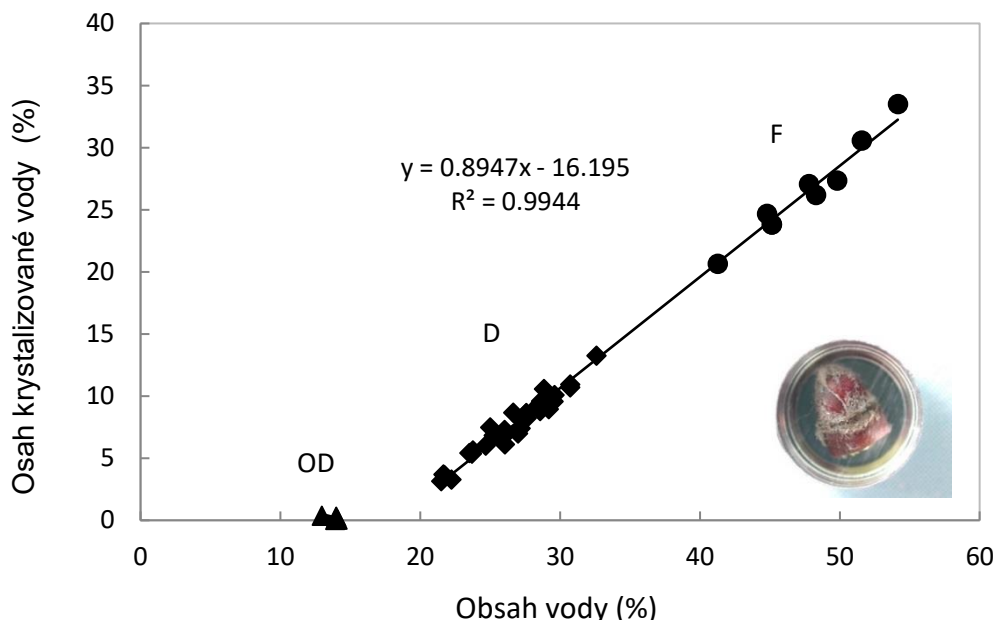
a správného načasování odběru materiálu v průběhu klidové fáze vegetační sezóny (Stushnoff a Seufferheld 1995, Towill a Ellis 2008). Klidová fáze (dormance) je velmi dynamický proces, jehož správný průběh je nezbytný pro přežití nízkých teplot pro rostliny mírného pásma. Podílí se na ní jak endogenní stav rostliny, tak exogenní vlivy, především teplota a délka světelné části dne (Cooke *et al.* 2012). Výsledkem je pak konkrétní fyziologický stav pupenů v daném čase, který je pro úspěšnou kryoprezervaci dormantních pupenů zásadní, viz Obr. 1 (Bilavčík *et al.* 2015).



Obr. 1 Průměrné přežití dormantních pupenů odrůd jabloně 'Šampion' a 'Spartan' ze tří sezón po prvním stupni kryoprezervačního protokolu, -30 °C (A) a po druhém stupni, -196 °C (B). ND - kryoprezervace pupenů bezprostředně po odběru ze sadu. D – kryoprezervace pupenů po mrazové dehydrataci při -4 °C. SD (p <0,05).

Charakterizace fyziologického stavu dormantních pupenů pomocí termických technik, především diferenční skenovací kalorimetrií, která umožňuje stanovit podíl krystalické a kapalné formy vody, teplotu přechodu roztoků rostlinného materiálu ve sklo a body mrznutí a tání, nám usnadňuje definovat optimální kryoprezervační postup. Především hodnotu mrazové dehydratační teploty, dobu dehydratace, stupeň a rychlost poklesu teploty a

samotnou hodnotu teploty prvního kroku kryoprotokolu a následně i rychlost a teplotu ohřevu rostlinného materiálu. Příklad stanovení optimálního podílu krystalické vody je na Obr. 2, skupina dormantních pupenů D.



Obr. 2 Závislost obsahu krystalizované vody na celkovém obsahu vody u dormantních pupenů 31 odrůd jableň. F – čerstvě odebrané pupeny ze sadu, D – mrazově dehydratované pupeny v rozsahu optimálním pro kryoprezervaci, OD – mrazově přesušené, letálně poškozené, dormantní pupeny. Ve výřezu je vidět dormantní pupen jableň v měřicí pánvičce pro DSC o průměru 6,7 mm.

Na základě znalostí získaných předchozími postupy a publikovanými v původních sděleních o dormanci, vlivu ošetření rostlinného materiálu před kryokonzervací, charakterizací formy typů skupenství vody a vlivu otužení (viz část III. a) byla vypracována tato optimalizovaná metodika, která umožní efektivní kryoprezervaci dormantních pupenů jableň. 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 dormantních pupenů je třeba disponovat následujícím přístrojovým vybavením:

Vybavení pro uskladnění dormantních pupenů po jejich odběru ze sadu a před vlastním mrazením:

- mrazicí box nastavitelný na -4 °C

Vybavení pro mrazovou dehydrataci dormantních pupenů:

- mrazicí box nastavitelný na -4 °C

Přístroje pro zamrazení dormantních pupenů do požadovaných ultranízkých teplot a jejich odtátí:

- programově řízený mrazicí box pro snižování teploty, viz Obr. 3, chladnička

Přístroje pro měření termických charakteristik a obsahu vody:

- diferenční skenovací kalorimetr (DSC)
- analytické váhy, přesné váhy, sušárna

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



Obr. 3 Laboratorně upravený programově řízený mrazicí box pro regulované snižování teploty.

2. Chemikálie a kultivační prostředky

V následujícím seznamu jsou uvedeny všechny chemikálie potřebné pro kryokonzervaci dormantních pupenů jableň.

Dehydratační prostředek:

- silikagel

Rehydratace:

- bílá rašelina

Rehydratační roztok:

- destilovaná voda

Chladící a skladovací médium:

- kapalný dusík

3. Drobné pomůcky

Následující pomůcky jsou potřebné pro realizaci metody kryoprezervace dormantních pupenů jableň:

Práce s dormantními pupeny ve venkovních podmínkách a jejich uskladnění před mražením:

- zahradnické nůžky
- zahradnický nůž
- provázek
- jmenovky
- PE pytlíky
-

Mrazová dehydratace:

- zahradnické nůžky
- sítky pro dehydrataci pupenů
- košíky pro uložení sítěk do mrazicího boxu
- nůžky
- pinzety
- váženky
- PE sáčky

Kryokonzervace:

- centrifugační tuby 50 ml (CLP, Biologix)
- hliníkové plíšky (20 x 6 x 0,05 mm)
- polystyrénová nádoba
- papírové krabičky do Dewarovy nádoby

Odtání vzorků:

- PE -pytlíky
- jmenovky

Regenerace:

- očkovací nůž
- zahradnické nůžky
- roubovací páska či gumička
- jmenovky

4. Rostlinný materiál

Výchozím materiálem pro kryokonzervaci dormantních pupenů jabloní jsou jednoleté dormantní prýty. Optimální délka prýtů je 40 – 70 cm (i delší). Prýty by měly mít minimálně 5 mm v průměru, dobře vyzrálé a bez známek poškození biotickými či abiotickými činiteli. Podnožový materiál jsou v sadu vysazené dvouleté podnože jabloně v míze, připravené na očkování Forkertovou metodou. Je možné použít například podnož MM106.

c) Postup metody kryoprezervace dormantních pupenů jabloně

Postup kryoprezervace dormantních pupenů jabloně bramboru lze rozdělit do pěti postupných kroků:

- Odběr a uchování dormantních pupenů jabloně
- Mrazová dehydratace dormantních pupenů jabloně
- Kryoprezervace mrazově dehydratovaných dormantních pupenů jabloně
- Odtátí a rehydratace dormantních pupenů jabloně
- Očkování a hodnocení regenerace rostlin

1. Odběr a uchování dormantních pupenů jabloně

Dobře vyzrálé a nepoškozené jednoleté dormantní prýty jabloně od požadovaných genotypů jsou odebírány v zimním období. Optimální doba odběru je v lednu až únoru, po minimálně několikadenní periodě mrazových teplot. Po odběru ze sadu jsou prýty po svázání a označení podle odrůd uloženy do PE pytle a ten vložen do mrazicího boxu do -4 °C. Doba uchování takto připraveného materiálu je možná v řádech týdnů až několika měsíců.

2. Mrazová dehydratace dormantních pupenů jabloně

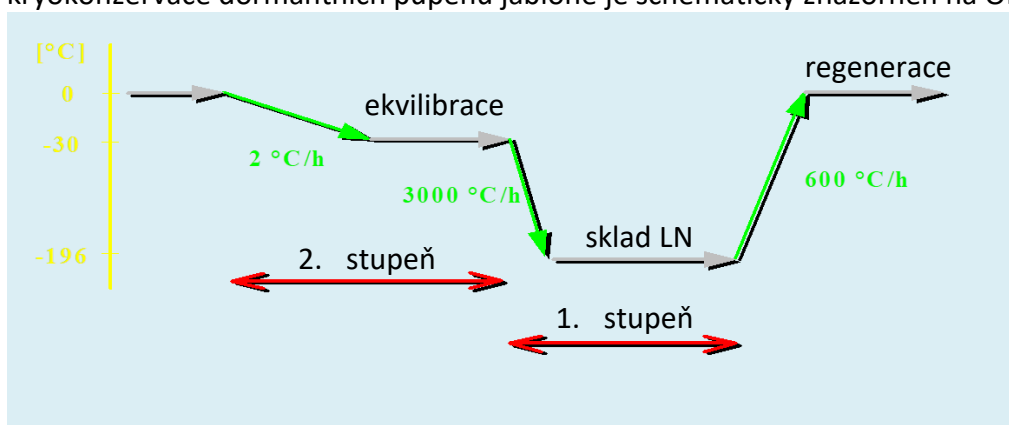
Jednoleté dormantní prýty jabloně jsou po vyndání z mrazicího boxu pro uchování dormantních pupenů při -4 °C stříhány na jednonodální řízky o délce přibližně 35 mm. Po nastříhání minimálně 160 jednonodálních řízků jsou tyto umístěny do sítěk pro dehydrataci do mrazicího boxu. Síťky jsou předem zváženy na přesných vahách a poté jsou zváženy i s dormantními pupeny. Celková hmotnost jednonodálních řízků v síťce je zaznamenána. Po nastříhání jednonodálních řízků je odebrán náhodný vzorek 5 řízků pro stanovení počátečního obsahu vody. Tyto řízky jsou zváženy ihned po nastříhání a poté vloženy ve váženice do sušárny nastavené na 85 °C a sušeny po dobu 5 dnů do konstantní hmotnosti. K takto zjištěnému obsahu vody je vztažen počáteční obsah vody všech řízků v síťce pro dehydrataci. Síťky s jednonodálními řízků jsou poté vloženy do košíků do mrazicího boxu pro mrazovou dehydrataci nastaveného na -4 °C, viz Obr. 4, na jehož dno jsou umístěny krabičky s vysušeným silikagelem o celkovém objemu 1 litr. Jednonodální řízky dormantních pupenů jsou vysušeny do obsahu vody 26 – 32 % obsahu vody. Po mrazové dehydrataci na tuto úroveň je odebráno 5 řízků na stanovení kontrolního obsahu vody. Před samotným postupem dvoustupňové kryoprezervace je provedeno měření termických charakteristik u vzorku dormantního pupene odebraného z jednonodálního řízku. Jsou změřeny fázové přechody prvního a druhého druhu, onsety krystalizace a tání vody a podíl krystalické vody. Je žádoucí, aby se podíl krystalické vody pohyboval v rozmezí od 5 do 15 %. V případě, že jsou hodnoty jak vysušení, tak podílu krystalické vody vyšší, je potřeba jednonodální řízky ještě dále dosušit pod tyto výše uvedené hodnoty.



Obr. 4 Síťky s jednodálními řízký v košíku v mrazicím boxu pro mrazovou dehydrataci.

3. Kryoprezervace mrazově dehydratovaných dormantních pupenů jableň

Po mrazové dehydrataci jsou jednotlivé jednodální řízký dormantních pupenů vloženy po 20 - 25 kusech do 50 ml centrifugačních tub a zavíčkované hliníkovým plíškem. Následně jsou po 7 kusech vloženy do papírové krabičky do Dewarovy nádoby a v ní vloženy do programově řízeného mrazicího box pro snižování teplot. Po ustálení na teplotě $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ je dále snižovaná teplota rychlostí $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ do teploty $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté následuje 12 – 24 hodinová ekvilibrace na této teplotě. Poté jsou krabičky z mrazicího boxu vyjmuty a ponořeny do kapalného dusíku v polystyrenové nádobě. Po nejméně 15 minutách jsou krabičky umístěny do skladovací Dewarovy nádoby. Je důležité dbát na rychlé přemístění krabičky do Dewarovy nádoby, aby nedošlo k samovolnému odtátí po odpaření kapalného dusíku. Postup kryokonzervace dormantních pupenů jableň je schematicky znázorněn na Obr. 5.



Obr. 5 Postup dvoustupňové kryokonzervace dormantních pupenů jableň.

4. Odtátí a rehydratace a očkování

Po minimálně hodině v kapalném dusíku je možné provést odtátí kontrolního vzorku. Odtátí se provede vyndáním požadovaného počtu centrifugačních tub se vzorky z Dewarovy nádoby, slitím přebytečného dusíku, jejich vložení do polystyrenové nádoby a umístěním

do +4 °C. Po 24 hodinách jsou jednonodální řízky z tuby vyjmuty a vloženy do vlhké bílé rašeliny v PE sáčku a uloženy do +4 °C do chladničky. Po 14 dnech rehydratace jsou sáčky s řízkami z chladničky vyndány a bezprostředně transportovány do sadu s připravenými podnožemi. V sadu jsou řízky vyjmuty ze sáčku, opláchnuta z nich bílá rašelina a z každého řízku je odebráno po očku pro běžné očkování Forkertovým okováním, viz Obr 6. Je možné očkovat dvě oka na jednu podnož s tím, že štítky s očky jsou alespoň 3 cm vzdáleny. Po naočkování jsou podnože ošetřovány jako po standardním očkování. Optimální datum očkování závisí na konkrétních venkovních podmínkách, důležité je, aby podnože byly v míze, což je obvykle na přelomu května a června.

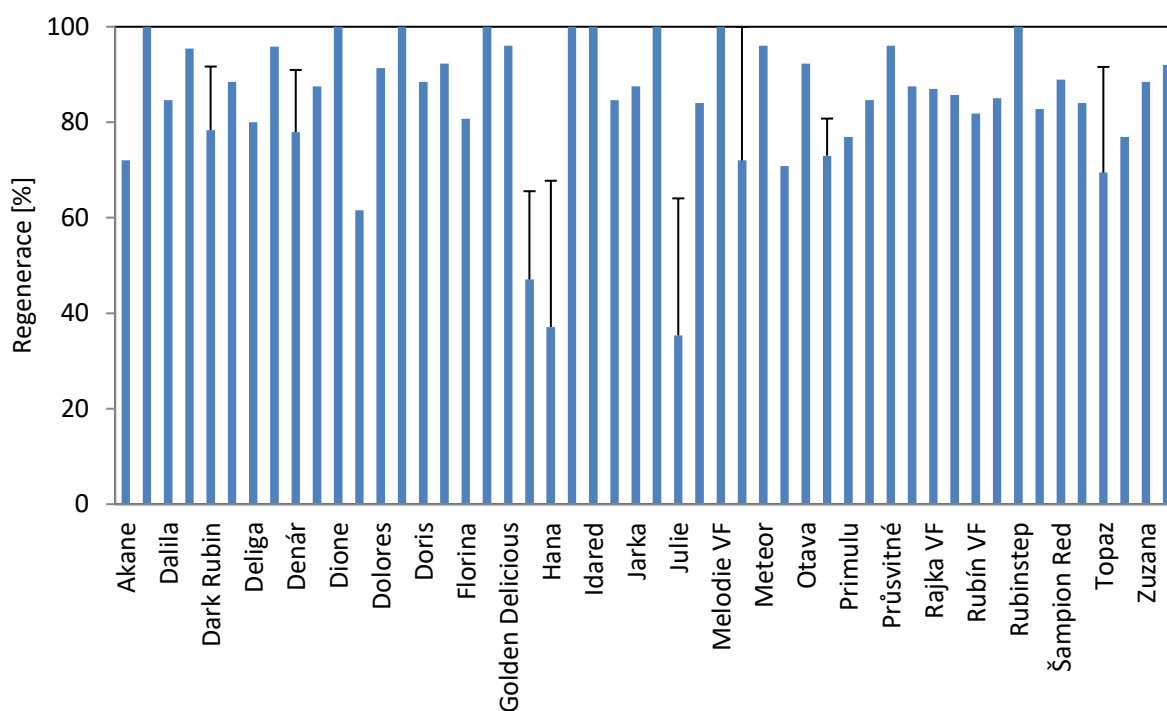


Obr. 6. Očkování kryoprezervovaných dormantních pupenů jablek Forkertovým způsobem (vlevo). Prorůstající očkovaní (vpravo).

5. Hodnocení regenerace rostlin

Po 7 týdnech od očkování je možné hodnotit regeneraci, životnost oček. Očka, u kterých prorostl nový výhonek, jsou hodnocena jako živá a očka, u kterých nedošlo k prorašení výhonku, jsou hodnocena jako mrtvá. Pro stanovení úspěšnosti kryoprezervace je potřeba zhodnotit, zda počet vzorků uložených v kapalném dusíku 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 vzorků daného genotypu. Při 120-ti dormantních pupenech uložených v kapalném dusíku a 20-ti pupenech v kontrolním vzorku musí regenerace kontroly dosáhnout minimálně 40 %, aby s pravděpodobností minimálně 95 % došlo k regeneraci minimálně 14 rostlin jablek daného genotypu uloženého v kryobance. Doporučený počet 120 explantátů je uložen v 6-ti tubách po 20-ti kusech. Při třech životaschopných pupenech v kryobance pak teoreticky po odtání dvou tub dojde k regeneraci jedné rostliny (obnova genotypu) a ve zbývajících čtyřech tubách budou uloženy minimálně dva pupeny schopné regenerace. 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. Výsledky regenerace dormantních pupenů širšího spektra odrůd jabloně kryoprezervovaného pomocí dvoustupňové metody jsou uvedeny na Obr. 7. Průměrná regenerace byla $84,3 \pm 14,71 \%$.



Obr. 7. Regenerace dormantních pupenů širšího spektra odrůd jabloně kryoprezervovaného pomocí dvoustupňové metody.

d) Evidence a uložení vzorků při kryokonzervaci

Každou tubu 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 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 GIRN Czech, interní identifikátor
<u>Množství:</u>	počet kryoprezervovaných pupenů, 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 dormantních pupenů, 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 dormantních pupenů jabloně. Doposud nebyl podobný komplexní metodický postup uchování genotypů ovocných dřevin založený na kryoprezervaci dormantních pupenů v České republice publikován. Bezpečnostní duplikaci genofondu jabloně primárně uchovávaného v sadu lze provádět pomocí *in vitro* kultur či jejich kryoprezervací. Kryoprezervace pomocí *in vitro* kultur je založena principiálně na jiném způsobu kryoprezervace – na ultrarychlém mrznutí velmi malých částí rostli, vzrostných vrcholů, které jsou ovlivňovány kryoprotektivními roztoky a pro vlastní zamrazení se nepoužívá řízeného poklesu teploty. Kryokonzervace jabloně pomocí *in vitro* kultur je materiálově, personálně a především časově podstatně náročnější a proto je využití nově navržené metody kryoprezervace pomocí dormantních pupenů pro uchování širokého spektra genotypů jabloně významné.

V. 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 bezpečně a rychle kryokonzervovat dormantní pupeny rozsáhlého spektra genotypů jabloně.

VI. Ekonomické aspekty

Kalkulace nákladů na zavedení kryoprezervačního postupu uvedeného v metodice závisí na tom, zda se zavádí nově celý provoz pro kryoprezervaci nebo se pouze implementuje tato metodika kryokonzervace do stávajícího provozu kryoprezervační laboratoře. V případě, že laboratoř již postup kryokonzervace dormantních pupenů používá, jsou náklady na zavedení nové metodiky prakticky nulové. Pro bezpečné uchování genotypů jabloně, jakožto zálohy ke kolekcím v sadu, lze používat *in vitro* kultury. Z dlouhodobého hlediska je však finančně i z hlediska stability genotypu výhodnější metodou 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 u metody kryoprezervace dormantních pupenů nejsou nutné. Jedinou finančně nákladnější položkou u navrhované metody je potřeba programovatelného mrazícího zařízení pro regulovaný pokles teploty dormantních pupenů pohybující se řádově od 200 do 500 tis. Kč. Toto zařízení je však často v laboratořích zabývajících se kryoprezervací běžné. Dále je potřeba relativně větších skladovacích prostor v Dewarových nádobách, protože uchované dormantní pupeny zabírají řádově 10 x více místa než *in vitro* kultury. Tento poměr však lze

snížit, protože podle hodnot regenerace, které jsou u dormantních pupenů vyšší než u *in vitro* kultur, je možné skladovat menší počet vzorků. Cena jedné skladovací Dewarovy nádoby pro uložení minimálně 50 - 100 genotypů jabloně, v závislosti na úspěšnosti regenerace, pomocí kryoprezervace dormantních pupenů je přibližně 130 tis. Kč. V případě uchování 100 genotypů v jedné Dewarově nádobě vychází materiálová cena za zavedení jednoho genotypu přibližně 1500 Kč, včetně tub, krabičky a kapalného dusíku na zamrazení, a personální přibližně 1000/2000 Kč (při zamrazení 100/50 odrůd při kapacitě 2 měsíců 2 x 0,5 úvazku). Celkové náklady na zamrazení 100 genotypů ročně lze odhadovat na 300 tis. Kč. Především je však metoda kryoprezervace dormantních pupenů ekonomicky výhodná možností v relativně krátkém období kryoprezervovat značné množství genotypů. Podle doposud provedených experimentů lze hovořit v řádech několika desítek, výhledově do 100 genotypů za rok. 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

- Bilavcik A, Zamecnik J, Faltus M (2015) Cryotolerance of apple tree bud is independent of endodormancy. *Frontiers in plant science*, 6:13p.
- Cooke J, Eriksson M, Junttila O (2012) The dynamic nature of bud dormancy in trees: environmental control and molecular mechanisms. *Plant, Cell and Environment* 35:1707–1728.
- 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, p. 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.
- Forsline PL, McFerson JR, Lamboy WF, Towill LE, (1998) Development of base and active collections of *Malus* germplasm with cryopreserved dormant buds. *Acta horticulturae*, 484:75–78.
- Kovalchuk I, Lyudvikova Volgina M, Reed BM (2009) Medium, container and genotype all influence *in vitro* cold storage of apple germplasm. *Plant Cell Tissue Org Cult* 96:127–136.
- Lambardi M, Rocncasaglia R, Previati A, De Carlo A, Dradi G, Da Re F (2006) *in vitro* slow growth storage of fruit rootstocks inside gas-tight or gas-permeable containers. *Acta Hort* 725:483–488.
- Stushnoff C, Seufferheld M (1995) Cryopreservation of apple (*Malus* species) genetic resources. In: Bajaj YPS (ed) *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol 32., *Cryopreservation of plant germplasm* ISpringer Verlag, Berlin, pp 87–101.

Towill LE, Ellis DD (2008) Cryopreservation of dormant buds. In: Reed BM (ed) Plant cryopreservation—a practical guide. Springer, Science Business Media, LLC, pp 421–426.

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(4):1181-1192.

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, pp. 333-357.

IX. Dedikace

Metodika je výstupem řešení projektu NAZV QJ1630301 a institucionálního projektu VÚRV, v.v.i. č. RO0418.

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 dormantních pupenů jabloně
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

Náklad: 40 výtisků

Vyšlo v roce 2018, první vydání

Vydáno bez jazykové úpravy

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

Autor fotografií: Alois Bilavčík

