



Alois Bilavčík, Olena Bobrova, Miloš Faltus, Jiří Zámečník

Metodika kryoprezervace dormantních pupenů maliníku

METODIKA



2024

Metodika je výstupem řešení projektu „Zdravé ovoce v měnících se klimatických podmínkách: vývoj nových biotechnologických postupů diagnostiky virů, studium vektorů, ozdravování a bezpečného uchovávání jahodníku a maliníku“ (TO01000295) financovaného částkou 1 477 000 Euro z fondů EHP a Technologické Agentury České republiky v rámci programu KAPPA a Institucionálního projektu VÚRV, v.v.i. č. RO0423. Metodika proběhla oponentním řízením. O uplatnění metodiky byla dne 11. 4. 2024 uzavřena smlouva č. 1/24 podle ustanovení § 1746 odst. 2 zákona č. 89/2012 Sb., občanského zákoníku. MZe, jako certifikační orgán, vydal Osvědčení č. j. MZE-40405/2024-13113 o uznání metodiky dne 20. 05. 2024.

Autoři:

RNDr. Alois Bilavčík Ph.D., VÚRV, v.v.i., Praha
Dr. Olena Bobrova, 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
Ing. Adéla Kubásková, Odd. OZE a environmentálních strategií, Ministerstvo zemědělství ČR

Metodika kryoprezervace dormantních pupenů maliníku

METODIKA

Metodika kryoprezervace dormantních pupenů maliníku

Díky rychlým změnám klimatických podmínek je v současné době vystavena produkce ovoce výzvám, které souvisejí s novými požadavky na parametry pěstovaných odrůd. V té souvislosti nabývá na významu bezpečné uchování a rozšiřování spektra odrůd a genotypů v kolekcích pro naplnění těchto požadavků. Pro uchování genových zdrojů maliníku se používají především *ex situ* kolekce, které jsou vystaveny působení rizikových biotických a abiotických činitelů. Proto je nutné vyvinout a aplikovat metody pro bezpečné uchování kolekcí. Kryoprezervace dormantních pupenů, běžně používaná u vegetativně množených ovocných dřevin, je považována za slibný přístup k efektivnímu uchování genových zdrojů rostlin. Doposud nebyl postup kryoprezervace maliníku pomocí dormantních pupenů navržen. Proto byla vyvinuta metodika pro kryoprezervaci dormantních pupenů maliníku. Výsledný metodický postup umožňuje efektivní skladování dormantních pupenů při teplotě kapalného dusíku a následné regenerace v podmínkách *in vitro* pro další použití ve šlechtění a zahradnické praxi. Uživatelem této 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: konzervace; genové zdroje; maliník; dormantní pupeny.

Methodology for dormant berry bud cryopreservation

Due to rapid changes in climatic conditions, fruit production is currently facing challenges associated with new requirements for cultivated varieties. In this context, the safe preservation and expansion of the spectrum of varieties and genotypes in collections to meet these demands are becoming increasingly important. For the conservation of raspberry genetic resources, *ex situ* collections are primarily used, which are exposed to the influence of risky biotic and abiotic factors. Therefore, it is necessary to develop and implement methods for the safe preservation of collections. Cryopreservation of dormant buds, commonly used for vegetatively propagated fruit trees, is considered a promising approach for efficient plant genetic resource preservation. So far, a procedure for cryopreserving raspberries using dormant buds has not been proposed. Hence, a methodology for cryopreserving raspberry dormant buds has been developed. The resulting procedural approach allows for the efficient storage of dormant buds at liquid nitrogen temperature and subsequent regeneration under *in vitro* conditions for further use in breeding and horticultural practice. The user of the methodology is the Ministry of Agriculture, which applies it as part of the "National Program for the Conservation and Use of Genetic Resources of Plants, Animals and Microorganisms Important for Nutrition and Agriculture".

Key words: conservation; genetic resources; raspberry; dormant buds.

Obsah:

I.	Cíl metodiky.....	6
II.	Úvod.....	6
III.	Vlastní popis metodiky.....	8
a)	Materiál.....	8
b)	Kryoprezervace.....	10
1.	Odběr a uchování dormantních pupenů.....	10
2.	Mrazová dehydratace dormantních pupenů.....	10
3.	Kryoprezervace mrazově dehydratovaných dormantních pupenů.....	13
4.	Odtátí a rehydratace dormantních pupenů.....	14
5.	Regenerace dormantních pupenů maliníku <i>in vitro</i>	14
c)	Shrnutí kryoprezervace.....	15
IV.	Srovnání novosti postupů.....	19
V.	Popis uplatnění metodiky.....	19
VI.	Ekonomické aspekty.....	19
VII.	Seznam použité související literatury.....	21
VIII.	Seznam publikací, které předcházely metodice.....	21
IX.	Dedikace.....	22
X.	Jména oponentů.....	22

I. Cíl metodiky

Cílem metodiky je vyvinout a otestovat postup kryoprezervace dormantních pupenů maliníku (*Rubus idaeus* L.) pomocí dvoustupňového kryoprezervačního postupu s regenerací v *in vitro* umožňující uchování genofondu maliníku.

II. Úvod

Maliník (*Rubus idaeus* L.) je oblíbenou plodinou v České republice i v jiných zemích mírného pásma díky svým vynikajícím plodům. Protože je maliník víceletou plodinou, je důležité udržovat kultivary a elitní šlechtitelské linie jako sbírku rostlin v sadu nebo v kulturách *in vitro*. Tyto metody uchování sbírky mají svá omezení, zejména kvůli virovým a jiným chorobám přenášeným do sbírek v sadu z planých malin (Tapio a kol., 1997) a nákladům a pracnosti spojeným s kulturami *in vitro*. V podmínkách *in situ* existuje mnoho dalších faktorů komplikujících uchování rozmnožovacího materiálu, vykazujícího stabilitu a dobrý zdravotní stav, jako stále častější extrémní výkyvy 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 maliníku jsou ze šlechtitelského hlediska klonové, jejichž osivo je heterozygotní, neexistuje možnost jejich souběžného uchování v semenné formě. I když je možné používat *in vitro* kultury jako záložní zdroj pro uchovávání vybraných klonů, je zde však při dlouhodobé kultivaci zvýšené riziko mutací, například díky neodhalené nepřímé organogenezi či vysoké koncentraci růstových hormonů v kultivačním médiu. *In vitro* kultury též vyžadují pravidelnou subkulturaci, při níž může častěji docházet ke ztrátám díky kontaminacím či technickým problémům (Lambardi a kol. 2006; Kovalchuk a kol., 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 a kol., 1998). Metoda kryoprezervace dormantních pupenů byla s úspěchem použita u ovocných dřevin, především z temperátního pásma, jako je například jablonoň (Stushnoff, 1987; Seufferheld a kol., 1991) či hrušeň (Bilavcik a kol. 2021). U rodu *Rubus*, byly v posledních dekádách publikovány různé způsoby kryoprezervace. Jako první úspěšně kryoprezervovali dormantní pupeny maliníku metodou pomalého mrznutí z -5 °C do -45 °C před samotným ponořením do kapalného dusíku Sakai a Nishiyama (1978). Pro kryoprezervaci vzrostných vrcholů *in vitro* kultury maliníku použili Reed a Lagerstedt (1987) kryoprotektivní roztok, který obsahoval polyetylglykol, močovinu a dimethylsulfoxid a následně pomalé přemrazení do -40 °C s ponořením do kapalného dusíku. Při tomto postupu bylo dosaženo regenerace méně než 10 %. K výraznému zvýšení regenerace kryoprezervovaných *in vitro* kultur (67 %) došlo, pokud u nich bylo aplikováno chladové otužení (Reed 1988). Nyní se kvůli zjednodušení a zrychlení metod kryoprezervace stále více uplatňuje vitifikace, což je metoda, při níž se pomocí vitrifikačních látek dosahuje skelného stavu v kryoprezervovaných tkáních (Volk a Walters, 2006; Wang a kol., 2005; Zamecnik a kol., 2021). Metody založené na vitifikaci *in vitro* kultur jsou pro rutinní zamrazování pro uchování v kryobance zpočátku relativně nákladné a

náročné na laboratorní práci a vysoce kvalifikovaný personál. Zejména z praktických důvodů je proto zajímavou možností kryoprezervace dormantních pupenů maliníku, přičemž k regeneraci pomocí *in vitro* kultur je možné přistoupit až v případě aktuální potřeby konkrétního genotypu.

Cílem této metodiky je vyvinout a otestovat postup založený na dvoustupňové kryoprezervaci dormantních pupenů s jejich regenerací v *in vitro*, jako nástroje pro rychlé a bezpečné uchování genofondu maliníku.

III. Vlastní popis metodiky

a) Materiál

1. Přístrojové vybavení

Pro využití metody kryoprezervace dormantních pupenů maliníku je třeba disponovat následujícím přístrojovým vybavením:

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

- skladovací 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, chladnička

Uchování kapalného dusíku a kryoprezervovaných vzorků:

- Dewarova nádoba na kapalný dusík
- Dewarova nádoba pro uložení vzorků v kapalném dusíku (LS4800 Taylor Wharton, USA)

Přístroje pro měření termických charakteristik, aktivity a obsahu vody:

- přístroj pro měření aktivity vody (Water Activity Meter HP23-AW, Rotronic, Switzerland)
- diferenční skenovací kalorimetr (DSC Discovery X3, TA Instruments, USA)
- analytické váhy, přesné váhy, sušárna

Vybavení pro pěstování in vitro kultur:

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

Záznamy, výpočty a tisk čárového kódu:

- PC, tiskárna čárového kódu, tiskárna, statistický SW

2. Chemikálie a kultivační prostředky

V následujícím seznamu jsou uvedeny všechny chemikálie potřebné pro kryoprezervaci dormantních pupenů maliníku.

Dehydratační prostředek:

- silikagel

Rehydratace:

- bílá rašelina

Rehydratační roztok:

- destilovaná voda

Chladicí a skladovací médium:

- kapalný dusík

Kultivační média a doplňky:

- MS typ média (Murashige a Skoog, 1962) modifikovaný dle Dziedzic a Jagla (2013)
- fytohormony (BAP, IBA)
- agar
- sacharóza
- glycerol
- destilovaná voda

3. Drobné pomůcky

Následující pomůcky jsou potřebné pro metodu kryoprezervace dormantních pupenů maliníku:

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

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

Mrazová dehydratace:

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

Kryokonzervace:

- centrifugační zkumavky 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 - práce s in vitro kulturami:

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

4. Rostlinný materiál

Výchozím materiálem pro testování kryoprezervaci maliníku byly jednoleté dormantní výhony maliníku (*Rubus idaeus* L.) odrůd 'Sanibelle'**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.** a 'Wilamette' pěstované na pařeništi Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v.v.i., původem od spolupracující firmy Jan Holub, s.r.o.. Optimální délka výhonů je 50 – 100 cm (i delší). Prýty by měly mít minimálně 5 mm v průměru, dobře vyvrálé a bez známek poškození biotickými či abiotickými činiteli. Pokud výhony přesahují průměr 10 mm je možné je použít, ale zmenšuje se tím množství nodálních segmentů, které je možné umístit do zkumavky pro zamrazení.

b) Kryoprezervace

Postup kryoprezervace dormantních pupenů maliníku lze rozdělit do pěti postupných kroků:

- Odběr a uchování dormantních pupenů
- Mrazová dehydratace dormantních pupenů
- Kryoprezervace mrazově dehydratovaných dormantních pupenů
- Odtátí a rehydratace dormantních pupenů
- Regenerace dormantních pupenů maliníku *in vitro*

1. Odběr a uchování dormantních pupenů

Dobře vyvrálé a nepoškozené jednoleté dormantní výhony maliníku od vybraných genotypů jsou odebírány v zimním období. Optimální doba odběru je v lednu až začátkem února, po minimálně několikadenní periodě mrazových teplot. Po odběru ze sadu jsou výhony po svázání a označení podle odrůd uloženy do PE pytle a ten vložen do skladovacího mrazicího boxu do -4 °C. Doba uchování takto připraveného materiálu se pohybuje v řádech týdnů.

2. Mrazová dehydratace dormantních pupenů

Jednoleté dormantní výhony maliníku jsou po vyjmutí z mrazicího boxu pro uchování dormantních pupenů při -4 °C stříhány na jednodánní segmenty o délce přibližně 35 mm, viz Obrázek 1.



Obrázek 1. Nastříhané jednonodální segmenty dormantních pupenů maliníku 'Sanibelle' na délku přibližně 35 mm.

Po nastříhání minimálně 160 jednonodálních segmentů 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 segmentů v síťce je zaznamenána. Po nastříhání jednonodálních segmentů je odebrán náhodný vzorek 5 segmentů pro stanovení počátečního obsahu vody. Tyto segmenty jsou zváženy ihned po nastříhání a poté vloženy ve vážence do sušárny nastavené na 105 °C a sušeny po dobu minimálně 2 dnů do konstantní hmotnosti. K takto zjištěnému obsahu vody je vztažen počáteční obsah vody všech segmentů v síťce pro dehydrataci. Síťky s jednonodálními segmenty jsou poté vloženy do košíků do mrazicího boxu pro mrazovou dehydrataci nastaveného na -4 °C, viz *Obrázek 2*, na jehož dno jsou umístěny krabičky s vysušeným silikagelem o celkovém objemu 1 litr.



Obrázek 2. Síťky s jednonodálními segmenty dormantních pupenů maliníku v košíku v mrazicím boxu pro mrazovou dehydrataci při teplotě -4 °C.

Jednonodální segmenty dormantních pupenů jsou vysoušeny do 20 – 30% obsahu vody. V průběhu vysoušení je měřena jejich aktivita vody pomocí přístroje pro měření aktivity vody, viz *Obrázek 3*, a obsah krystalické vody pomocí diferenčního skenovacího kalorimetru (DSC).



Obrázek 3. Měření aktivity vody dormantních pupenů maliníku pomocí přístroje Water Activity Meter HP23-AW (Rotronic).

Po mrazové dehydrataci na požadovanou úroveň obsahu vody je odebráno 5 segmentů na stanovení kontrolního obsahu vody. Před samotným postupem dvoustupňové kryoprezervace je provedeno měření termických charakteristik u vzorku dormantního pupene odebraného z jednonodálního segmentu. Jsou změřeny fázové přechody prvního a druhého druhu, onsety krystalizace a tání vody a podíl krystalické vody. Pro přežití a regeneraci je vhodné minimalizovat podíl krystalické vody v pupenech a zamezit (především v průběhu chlazení) výskytu exoterm. V případě, že jsou hodnoty jak dehydratace, tak podílu krystalické vody vyšší, je potřeba jednonodální segmenty dále dehydratovat pod výše uvedené hodnoty. Kontrolní dehydratované jednonodální segmenty jsou v pravidelných intervalech rehydratovány a umístěny do vlhké bílé rašeliny v PE sáčku a uloženy do +4 °C do chladničky. Po 14 dnech rehydratace se segmenty umístí do rašelinového substrátu a hodnotí se jejich schopnost regenerace rašením.

3. Kryoprezervace mrazově dehydratovaných dormantních pupenů

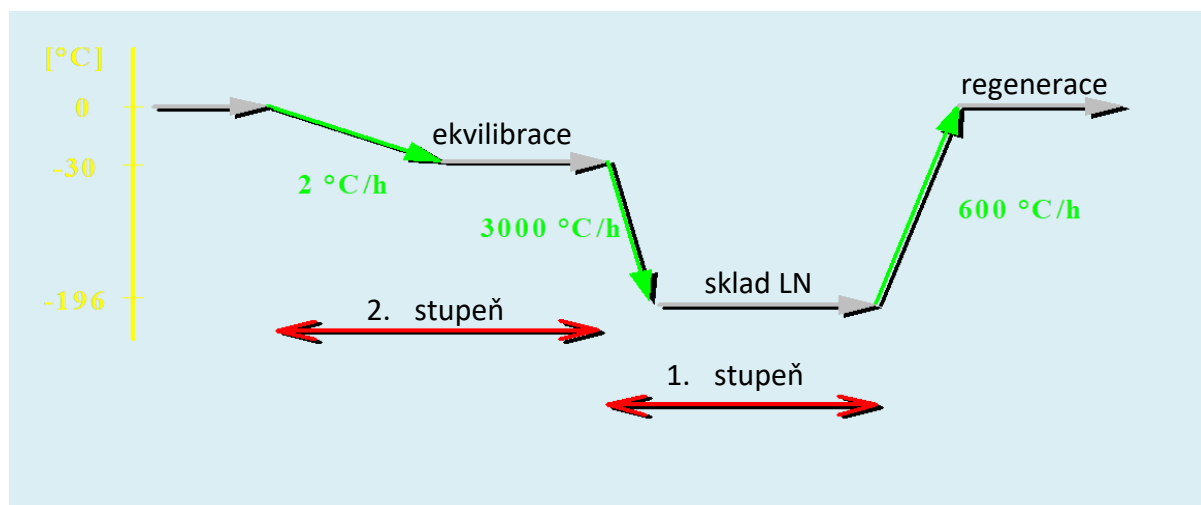
Po mrazové dehydrataci jsou jednotlivé jednonodální segmenty dormantních pupenů vloženy po 20 - 25 kusech do 50 ml centrifugačních zkumavek a zavíčkovány hliníkovým plíškem. Následně jsou centrifugační zkumavky po 7 kusech vloženy do papírové krabičky do Dewarovy nádoby a v ní vloženy do programově řízeného mrazicího box pro snižování teplot, viz *Obrázek 4*.



Obrázek 4. Laboratorně upravený programově řízený mrazicí box pro regulované snižování teploty pro dvoustupňový kryoprezervační protokol.

Po ustálení na teplotě -5 °C je dále snižovaná teplota rychlostí 1 °C hod⁻¹ do teploty -30 °C. Poté následuje 12 – 24 hodinová ekvilibrace při této teplotě. Následně 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 maliníku je schematicky znázorněn - viz *Obrázek 5*.



Obrázek 5. Schematický postup dvoustupňové kryokonzervace dormantních pupenů maliníku.

4. Odtátí a rehydratace dormantních pupenů

Minimálně po jedné hodině v kapalném dusíku je možné provést odtátí kontrolního vzorku. Odtátí se provede vyndáním požadovaného počtu centrifugačních zkumavek se vzorky z Dewarovy nádoby, slitím přebytečného kapalného dusíku, jejich vložením do polystyrenové nádoby a umístěním do +4 °C. Po 24 hodinách jsou jednonodální segmenty z centrifugační zkumavky vyjmuty a vloženy do vlhké bílé rašeliny v PE sáčku a uloženy do +4 °C do chladničky. Po 14 dnech rehydratace jsou sáčky s jednonodálními segmenty z chladničky vyndány a bezprostředně transportovány do *in vitro* laboratoře.

5. Regenerace dormantních pupenů maliníku *in vitro*

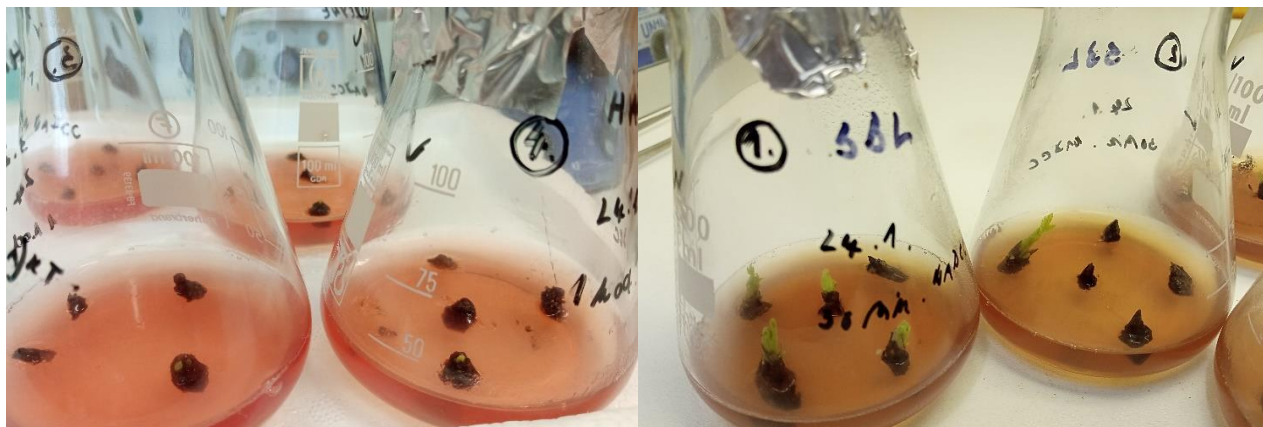
Nejprve jsou nodální segmenty podrobeny 20minutovému oplachování pod kohoutkovou vodou a poté je možné provést sterilizaci podle Válimäki a kol. (2022). Pupeny jsou vystaveny za stálého míchání 20 g l⁻¹ dichlorizokyanurátu sodného (NaDCC) po dobu 30 minut a poté ponechány v 70% EtOH po dobu 15 minut. Poté následuje trojnásobné opláchnutí nodálních segmentů sterilní destilovanou vodou a pak jsou segmenty ponechány ve vodě až do přenesení na agarové médium (dobu přípravy trvá až 1 hodinu). Pupeny s částí větvičky, přibližně 1 cm dlouhé, *Obrázek 6*, jsou umístěny na MS médium upravené podle Dziedzic a Jagla (2013); 30 g l⁻¹ sacharózy, 1 mg l⁻¹ BAP, 0,1 mg l⁻¹ IBA a 7 g l⁻¹ agaru.



Obrázek 6. Vyříznutý dormantní pupen maliníku z kryoprezervovaného nodálního segmentu.

Následně jsou umístěny v standardních podmínkách v kultivačním boxu (24 °C, 16/8 fotoperioda) pro regeneraci, viz *Obrázek 7*. Kontrolní rostliny jsou převedeny do *in vitro* podmínek stejným postupem sterilizace. Je nutná kontrola zavedených pupenů na bakteriální a houbové kontaminace a v případě napadení je optimální nekontaminované pupeny

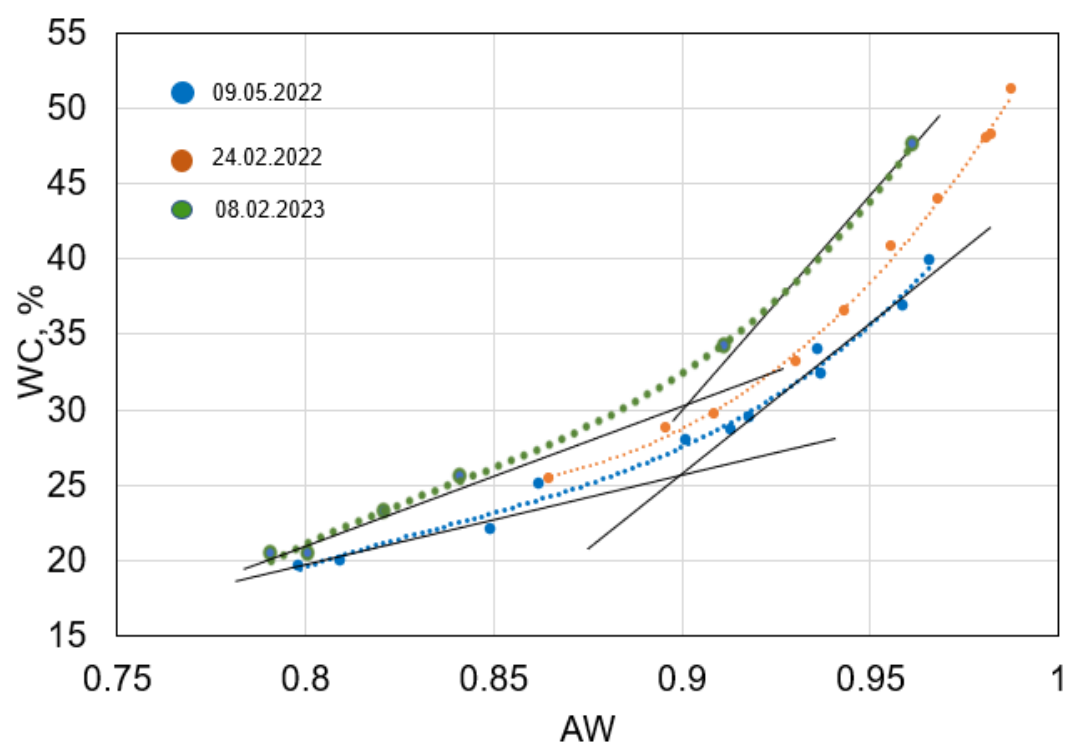
přenést na nové subkultivační médium. V případě, že je napadena většina zavedených pupenů, je vhodné u nich opět provést sterilizaci, případně použít médium s patřičným antibiotikem. Kultury regenerovaných odrůd maliníku jsou multiplikovány v intervalu 4-6 týdnů pro dostatečné namnožení a převod do *ex vitro* podmínek.



Obrázek 7. Regenerace kryoprezervovaných dormantních pupenů maliníku 'Sanibelle' v *in vitro*. Vlevo – po 10 dnech, vpravo po 13 dnech po zavádění do *in vitro* po kryoprezervaci.

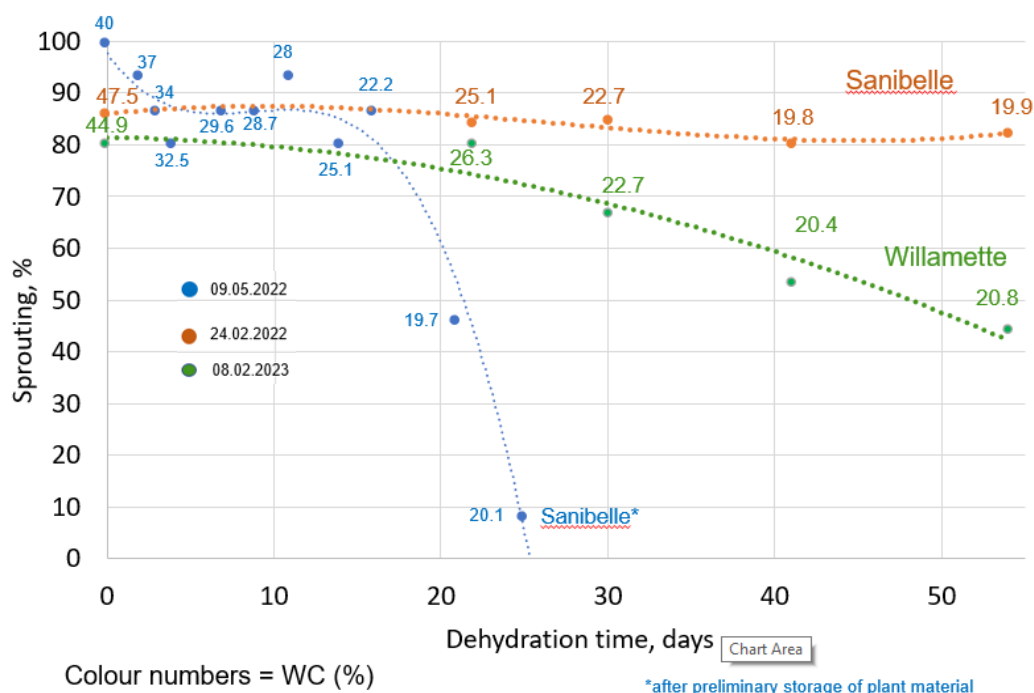
c) Shrnutí kryoprezervace

U jednonodálních segmentů byl nejprve testován průběh snižování obsahu vody během mrazové dehydratace. Na *Obrázek 8*, je znázorněn průběh změny obsahu vody na aktivitě vody ve vzorcích dormantních pupenů. Byly testovány dormantní pupeny maliníku 'Sanibelle' ve dvou termínech skladování (24. 2. 2022 a 9. 5. 2022) a maliníku 'Willamette' v jednom termínu (8. 2. 2023). U maliníku 'Sanibelle' byly dormantní pupeny skladovány v druhém experimentu (9. 5. 2022) přibližně 74 dní po odběru. Z průběhu křivek změny obsahu vody je zřejmé, že při dehydrataci u pupenů obou odrůd dochází k podobnému průběhu a při snížení aktivity vody přibližně pod hodnotu 0,9 dochází k poklesu rychlosti dehydratace. Odrůda 'Sanibelle' obsahuje při dané aktivitě vody oproti odrůdě 'Willamette' celkově nižší obsah vody. Při porovnání regenerace dormantních pupenů v průběhu jejich mrazové dehydratace je patrné, že u odrůdy 'Sanibelle' z odběru po delší době uskladnění (9. 5. 2022) klesá jejich regenerace, i když se obsah vody stále pohybuje na hodnotách přibližně 20 %, při kterých je u dřívějšího termínu experimentu (24. 2. 2022) regenerace stále na vysoké úrovni (více než 80 %), viz *Obrázek 9*.



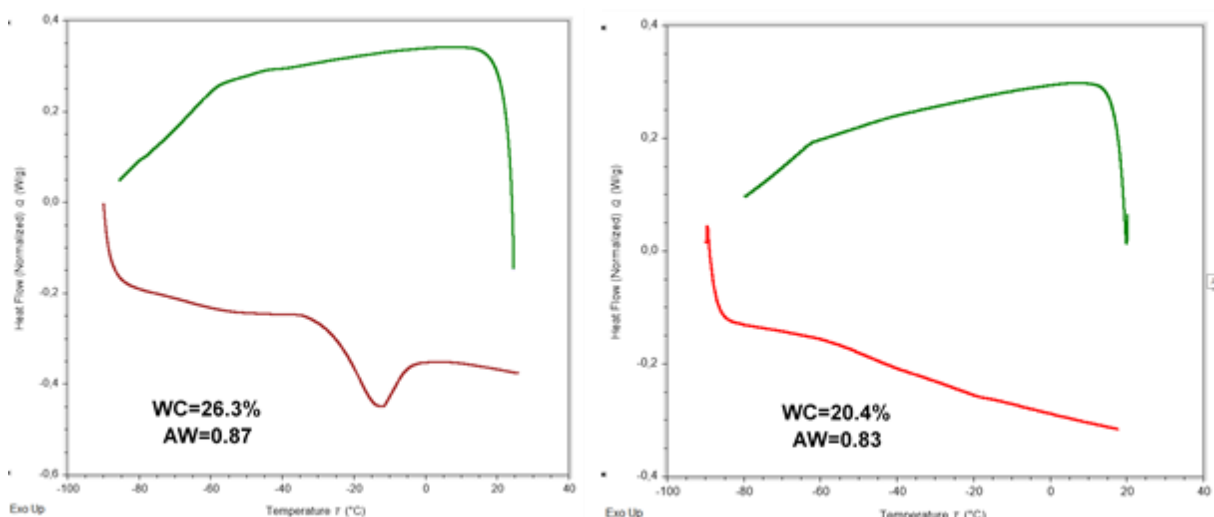
Obrázek 8. Průběh dehydratace dormantních pupenů maliníku 'Sanibelle' (24.2.2022 a 9.5.2022) a 'Willamette' (8.2.2023). Data jednotlivých experimentů

jsou proložena přímkami pro vizuální orientaci. WC – obsah vody (%), AW – aktivita vody.



Obrázek 9. Průběh rašení dormantních pupenů maliníku 'Sanibelle' a 'Willamette' v závislosti na dehydrataci v časově různých experimentech. Čísla u bodů uvádějí obsah vody (WC).

Z termických charakteristik dormantních pupenů měřených pomocí DSC je zřejmé, že při hodnotě aktivity vody přibližně 0,9 je stále ještě možné detekovat krystalizaci – exotermní pík, zatímco při nižších hodnotách již exotermní pík odpovídající krystalizaci detekován není, viz *Obrázek 10*. Na *Obrázek 11* je ukázka rašení kontrolních kryoprezervovaných dormantních pupenů 'Willamette' a 'Sanibelle' (24. 2. 2022) po jejich mrazové dehydrataci k hodnotám obsahu vody přibližně 20 %. Takto dehydratované dormantní pupeny maliníku byly použity pro regeneraci v *in vitro* kultuře. Závěrem lze doporučit provést kryoprezervační postup mrazové dehydratace s následným dvoustupňovým zamrazením bez dlouhodobějšího skladování v mrazícím skladovacím boxu při -5 °C a dormantní pupeny mrazově dehydratovat přibližně k hodnotám 20% obsahu vody.



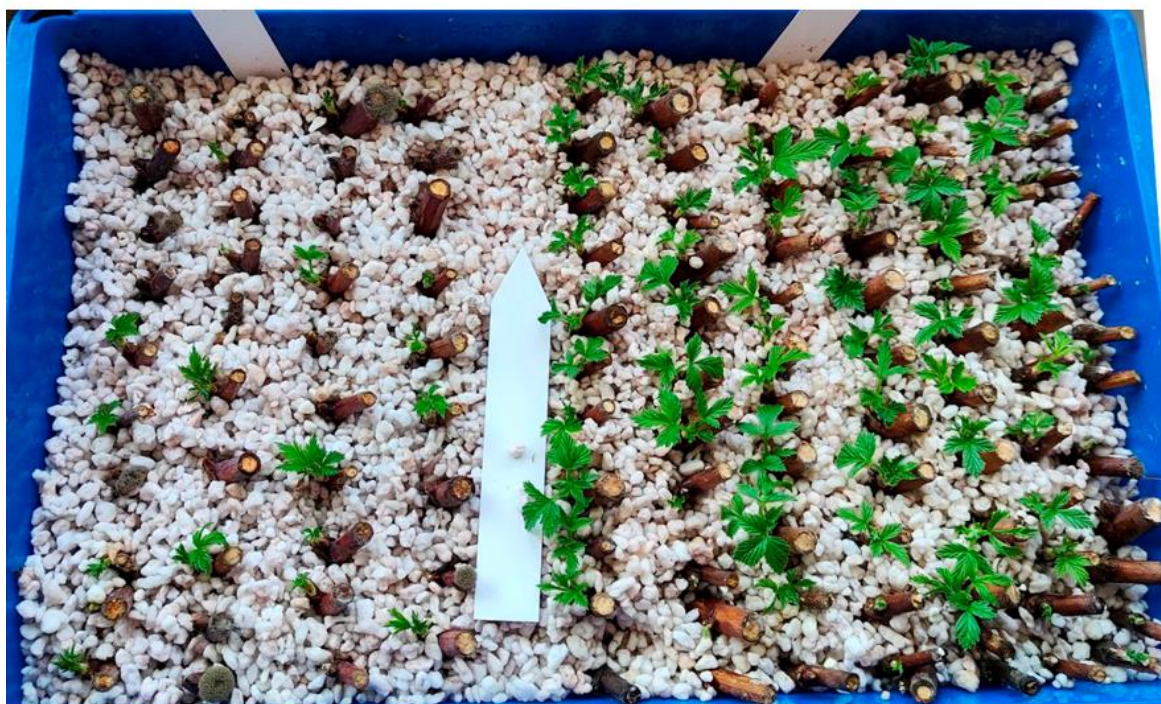
Obrázek 10. Termogramy dormantních pupenů maliníku odrůdy 'Willamette' během mrazové dehydratace. Horní křivky představují chlazení – žádná viditelná exoterma, dolní křivky představují ohřev - během ohřevu je viditelný exotermní pík pouze při vyšší hydrataci/aktivitě vody (vlevo).

Willamette

WC=20.8%

Sanibelle

WC=19,9%



Obrázek 11. Kontrolní rašení do *in vitro* nezaváděných dormantních pupenů maliníku odrůdy 'Willamette' a 'Sanibelle' po kryoprezervaci dvoustupňovou metodou.

IV. Srovnání novosti postupů

Navržená metodika přináší nový postup, který umožňuje uchování maliníku pomocí kryoprezervace dormantních pupenů s jejich následnou regenerací v *in vitro* kultuře. Doposud nebyl podobný komplexní metodický postup kryoprezervace dormantních pupenů maliníku v České republice publikován. Aplikací uvedeného postupu je možné bezpečně uchovat sbírkový materiál při ultranízké teplotě v kapalném dusíku v kryobance vegetativně množených plodin ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby, v.v.i. v Praze Ruzyni.

V. Popis uplatnění metodiky

Uživatelem této metodiky bude Ministerstvo zemědělství České republiky a to prostřednictvím „Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin, zvířat a mikroorganismů významných pro výživu a zemědělství“. Tato metodika umožní bezpečně uchovat vybrané genotypy maliníku.

VI. Ekonomické aspekty

Genové kolekce ovocných plodin jsou uchovávány především ve venkovních sbírkách. Tyto jsou vystaveny mimo jiné nepříznivým abiotickým a biotickým podmínkám, které mohou sbírky ohrozit. V současnosti je tendence tyto sbírky hodnotit z hlediska zdravotního stavu a alespoň sbírkově významné genotypy ozdravit a bezpečně uchovat. Význam uchování bezpečné zálohy konkrétního genotypu maliníku lze reálně těžko ocenit, protože odhadnout, zda v budoucnu bude z daného genotypu plynout ekonomický přínos, je nereálné. Z toho důvodu se ve světě zavádí bezpečná záloha co nejširšího sortimentu kolekcí ovocných plodin, aby byl efekt statisticky nejvíce pravděpodobný. Náklady na zavedení kryoprezervačního postupu dormantních pupenů maliníku uvedené v metodice odpovídají tomu, zda je zaváděn nově celý provoz pro kryoprezervaci či se jen tato metodika implementuje do stávajícího provozu kryoprezervační laboratoře. V případě, že laboratoř již postup kryoprezervace používá, jsou náklady na zavedení nové metodiky, především v části investic do technologie mrazení, prakticky nulové. Z dlouhodobého hlediska konzervace genových zdrojů maliníku je ideální jejich uchování pomocí ozdravených *in vitro* kultur. Tento způsob je však zdlouhavý a pracovně i finančně náročný. Proto je postup, kdy je nejdříve provedeno zamrazení dormantních pupenů s relativně nízkými náklady a v případě aktuální potřeby je možné v budoucnu převod do *in vitro* podmínek, ekonomicky i pracovně efektivní. V případě, kdy není na pracovišti zavedena metoda kryoprezervace pomocí pomalého mrznutí tvoří hlavní položku při zavedení této metodiky investice do programovatelného mrazícího zařízení pro regulovaný pokles teploty dormantních pupenů pohybující se řádově od 200 do 500 tis. Kč. V kryolaboratořích je však toto zařízení zpravidla běžné. Dále je potřeba investice do skladovacích prostor v Dewarových nádobách. I když kryoprezervované dormantní pupeny zabírají řádově 10 x více místa v Dewarově nádobě než *in vitro* kultury, lze tento poměr snížit díky tomu, že hodnoty regenerace jsou u dormantních pupenů vyšší a tudíž je možné skladovat menší počet vzorků než u *in vitro* kultur. Cena jedné skladovací Dewarovy nádoby pro uložení přibližně 100 genotypů maliníku pomocí kryoprezervace dormantních pupenů je v závislosti na úspěšnosti regenerace přibližně 150 tis. Kč.

V případě uchování 100 genotypů v jedné Dewarově nádobě vychází materiálová cena za zavedení jednoho genotypu přibližně 2000 Kč, včetně zkumavek, krabičky a kapalného dusíku na zamrazení, a personální náklady přibližně 1500/2500 Kč (při zamrazení 100 odrůd při kapacitě 2 měsíců 2 x 0,5 úvazku). Celkové náklady na zamrazení 100 genotypů ročně lze tedy odhadovat na 400 tis. Kč. Metoda kryoprezervace dormantních pupenů maliníku je však především 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 maliníku 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., Faltus, M., Zamecnik, J., (2021). The survival of pear dormant buds at ultra-low temperatures. *Plants*, 10(11), 2502.
- Dziedzic, E., Jagla, J., (2013). Micropropagation of *Rubus* and *Ribes* spp. *Methods Mol Biol* 11013, 149-160.
- Reed, B.M. (1988). Cold acclimation as a method to improve survival of cryopreserved *Rubus* meristems. *Cryoletters*, 9, 166– 171.
- Reed, B.M., Lagerstedt, H.B. (1987). Freeze preservation of apical meristems of *Rubus* in liquid nitrogen. *Hortic Sci*, 22, 302–303.
- Sakai, A., Nishiyama, Y. (1978). Cryopreservation of winter vegetative buds of hardy fruit trees in liquid nitrogen. *Hortic Sci*, 13, 225– 227.
- Seufferheld, M.J., Fitzpatrick, J., Walsh, T.M., Stushnoff, C. (1991). Cryopreservation of dormant buds from cold tender taxa using a modified vitrification procedure. In proceedings: 28th Annual Cryobiology Meeting, *Cryobiology*, 28, 576.
- Stushnoff C. (1987). Cryopresearavtion of apple genetic resources. *Can J Plant Sci*, 67, 1151-1154.
- Tapio, E., Bremer, K., Valkonen, J.P.T. (1997). Viruses and their significance in agricultural and horticultural crops in Finland. *Agric Food Sci Finl*, 6, 323–336.
- Volk, G.M., Walters, C., (2006). Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behavior in shoot tips during cryoprotection. *Cryobiology*, 52(1), 48-61.
- Wang, Q., Laamanen, J., Uosukainen, M., Valkonen, J.P.T. (2005). Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of raspberry (*Rubus idaeus* L.) by encapsulation–vitrification and encapsulation–dehydration. *Plant Cell Reports*, 24(5), 280-288.
- Zamecnik, J., Faltus, M., Bilavcik, A. (2021). Vitrification solutions for plant cryopreservation: Modification and properties. *Plants*, 10(12), 2623.

VIII. Seznam publikací, které předcházelý metodice

- Bilavcik, A., Faltus, M. and Zamecnik, J., (2021). The survival of pear dormant buds at ultra-low temperatures. *Plants*, 10(11), 2502.
- Zamecnik, J., Faltus, M., Bilavcik, A. (2021). Vitrification solutions for plant cryopreservation: Modification and properties. *Plants*, 10(12), 2623.
- 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.
- 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 "Zdravé ovoce v měnících se klimatických podmínkách: vývoj nových biotechnologických postupů diagnostiky virů, studium vektorů, ozdravování a bezpečného uchovávání jahodníku a maliníku" (TO01000295) financovaného částkou 1 477 000 Euro z fondů EHP a Technologické Agentury České republiky v rámci programu KAPPA a Institucionálního projektu VÚRV, v.v.i. č. RO0423.

X. Jména oponentů

Odborný oponent:

Mgr. Petr Maršík, Ph.D.

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

Oponent ze státní správy:

Ing. Adéla Kubásková

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

Název: Metodika kryoprezervace dormantních pupenů maliníku
METODIKA

Autoři (podíl na práci): RNDr. Alois Bilavčík Ph.D. (50 %)
Dr. Olena Bobrova, Ph.D. (30 %)
Ing. Miloš Faltus, Ph.D. (15 %)
Ing. Jiří Zámečník, CSc. (5 %)

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: 60 výtisků

Vyšlo v roce 2024, první vydání

Vydáno bez jazykové úpravy

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

Titulní fotografie: Alois Bilavčík
Fotografie v textu: Alois Bilavčík

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha, 2024
ISBN: 978-80-7427-429-9

