



Ing. Miloš Faltus, Ph.D.
RNDr. Alois Bilavčík, Ph.D.
Ing. Jaroslava Domkářová, Ph.D.
Ing. Vendulka Horáčková, CSc.
Ing. Jiří Ptáček, CSc.
Ing. Jiří Zámečník, CSc.

Metodika kryoprezervace pylu bramboru pro jeho využití ve šlechtitelském procesu

CERTIFIKOVANÁ METODIKA



Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i.

2023

Metodika je výstupem řešení institucionálního projektu VÚRV, v.v.i. č. MZE RO0423 a výzkumného projektu NAZV QK1910277. Metodika proběhla oponentním řízením. O uplatnění metodiky byla dne 11. 12. 2023 uzavřena smlouva (č. 10/2023) podle ustanovení § 1746 odst. 2 zákona č. 89/2012 Sb., občanského zákoníku. MZe, jako certifikační orgán, vydal Osvědčení č.j. MZE-73896/2023-13113 o uznání metodiky dne 22. 12. 2023.

Autoři: Ing. Miloš Faltus, Ph.D., VÚRV, v.v.i. Praha
 RNDr. Alois Bilavčík, Ph.D., VÚRV, v.v.i. Praha
 Ing. Jaroslava Domkářová, Ph.D., VÚB Havlíčkův Brod
 Ing. Vendulka Horáčková, CSc., VÚB Havlíčkův Brod
 Ing. Jiří Ptáček, CSc., CSc., VÚB Havlíčkův Brod
 Ing. Jiří Zámečník, CSc., VÚRV, v.v.i. Praha

Oponenti:
Ing. Přemysl Landa, Ph.D., Ústav experimentální botaniky AV ČR, Praha
Ing. Adéla Kubásková, Ministerstvo zemědělství ČR

Metodika kryoprezervace pylu bramboru pro jeho využití ve šlechtitelském procesu

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Metodika kryoprezervace pylu bramboru pro jeho využití ve šlechtitelském procesu

Metoda kryoprezervace umožňuje uchovat pyl genetických zdrojů bramboru po velmi dlouhou dobu bez jakýchkoliv změn. Prezentovaná metodika využívá termické analýzy pro identifikaci a kvantifikaci fázových přechodů, které souvisí s přítomností vody v pylu, jež ovlivňuje fertilitu pylu. Diferenční skenovací kalorimetrie je rychlou a přesnou metodou stanovení fázových přechodů a obsahu krystalické vody v pylu, a jednoznačně ukazuje na vhodnost podmínek pro kryoprezervaci pylu bramboru. Tato metodika umožňuje ušetřit náklady spojené s pěstováním otcovských genotypů bramboru pro potřeby křížení ve skleníku nebo v polních podmínkách. Metodika eliminuje nejistotu, která souvisí s ročníkovou variabilitou v produkci pylu a případné rozdíly v době kvetení rodičovských rostlin. V případě plánovaného křížení lze odtát ve vhodném termínu potřebné množství pylu vybraného genotypu bramboru bez nutnosti pěstování otcovského genotypu a využít jej ve šlechtitelském procesu.

Klíčová slova: Diferenční skenovací kalorimetrie; kryokonzervace; křížení; *Solanum tuberosum* L., termická analýza

Methodology for cryopreservation of hop germplasm collection

The cryopreservation method makes it possible to preserve the pollen of potato genetic resources for a very long time without any changes. The presented methodology uses thermal analysis to identify and quantify phase transitions that are related to the presence of water in pollen, which affects pollen fertility. Differential scanning calorimetry is a fast and accurate method for determining phase transitions and crystalline water content in pollen, and clearly indicates the suitability of conditions for cryopreservation of potato pollen. This methodology makes it possible to save costs associated with the cultivation of paternal genotypes of potato for the needs of crossing in the greenhouse or in field conditions. The methodology eliminates the uncertainty related to annual variability in pollen production and possible differences in the flowering time of the parent plants. In the case of planned crossing, the required amount of pollen of the selected potato genotype can be thawed at a suitable time without the need to grow the paternal genotype and use it in the breeding process.

Key words: cross-breeding; cryoconservation; differential scanning calorimetry; *Solanum tuberosum* L.; thermal analysis

Obsah:

I.	Cíl metodiky	8
II.	Vlastní popis metodiky.....	8
1)	Princip metody	8
2)	Materiál a metody.....	8
A.	Přístrojové vybavení	8
B.	Chemikálie.....	8
C.	Drobné pomůcky.....	9
D.	Příprava pro dehydrataci pylu	9
3)	Postup kryoprezervace pylu bramboru	9
A.	Odběr pylu.....	9
B.	Hodnocení fertility pylu	11
C.	Hodnocení termických charakteristik pylu	13
D.	Kontrola hydratace pylu	16
E.	Uchování pylu bramboru v kapalném dusíku	18
F.	Využití pylu při křížení bramboru	18
III.	Srovnání novosti postupů	19
IV.	Popis uplatnění metodiky	19
V.	Ekonomické aspekty	19
VI.	Seznam použité literatury	21
VII.	Seznam publikací předcházející metodice	21
VIII.	Dedikace	21
IX.	Jména oponentů:	21

I CÍL METODIKY

Cílem metodiky je definovat nový postup kryoprezervace pro dlouhodobé uchování pylu genetických zdrojů bramboru *Solanum tuberosum* L. s využitím termické analýzy pro identifikaci a kvantifikaci fázových přechodů.

II VLASTNÍ POPIS METODIKY

1) PRINCIP METODY

Tato metodika popisuje postup uchování pylu genetických zdrojů bramboru po dlouhou dobu při teplotě kapalného dusíku ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$). Podstatou dlouhodobého a stabilního uchování rostlinného materiálu je přítomnost tzv. skelného stavu, což je amorfni pevná fáze hmoty (Engelmann, 2004, Matsumoto 2017). Aby bylo zajištěno bezpečné uchování vzorků, je nutné zabránit tvorbě ledových krystalů, které mohou poškodit uložený materiál (Ballesteros a Waters 2007, Benelli 2021, Reed 2017). Základní hodnocení vzorků pylu spočívá ve stanovení obsahu vody, ale mnohem přesnější informace o podmínkách kryoprezervace poskytuje termická analýza, která umožňuje stanovení fázových přechodů při poklesu teploty. Termická analýza detekuje krystalizaci vody, která může poškodit materiál, nebo skelný přechod, který je předpokladem neměnnosti a stability skladovaného pylu. Obsah volné vody v pylu souvisí s krystalizací vody a jeho potenciálním poškozením. Znalost termických charakteristik umožňuje optimalizovat obsah vody ve vzorcích před kryoprezervací a umožňuje bezpečné uchování pylu bez ztráty jeho životaschopnosti.

2) MATERIÁL A METODY

A. PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

Pro provedení metody kryokonzevace je třeba disponovat následujícím přístrojovým vybavením:

Přístroje pro termickou analýzu

- Diferenční skenovací kalorimetr, analytické váhy, sušárna, PC

Mikroskopie

- Laboratorní mikroskop, digitální kamera, PC

Vybavení pro stanovení sušiny vzorků

- laboratorní sušárna, analytické váhy, PC

Uchování kapalného dusíku a kryokonzevovaných 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

B. CHEMIKÁLIE

Pro aplikaci této metodiky je třeba opatřit následující seznam chemikálií:

Chladicí a skladovací medium

- Kapalný dusík

Desikant

- Silikagel, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, Mg Cl_2

Vitální barvení

- destilovaná voda
- etanol
- jod
- jodid draselný
- kyselý fuchsin

C. DROBNÉ POMŮCKY

Následující pomůcky jsou potřebné pro realizaci metody kryokonzervace bramboru:

- Hodinové sklíčko, zkumavky pro odběr pylu
- Stojánek na kryozkumavky
- Plastová stébla nebo kryozkumavky 1,8 ml
- Polystyrénový džbán 1L
- Pinzeta, skalpel, špachtle, preparační jehla

D. PŘÍPRAVA PRO DEHYDRATACI PYLU

Pro dehydrataci pylu bramboru jsou použity skleněné nádoby (200 ml) s 50 ml nasyceného roztoku $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, Mg Cl_2 nebo 50 mg dehydratovaného silikagelu.

3) POSTUP KRYOPREZERVACE PYLU BRAMBORU

Pro větší přehlednost lze celý postup kryoprezervace pylu bramboru rozdělit na šest dílčích kroků:

- A. Odběr pylu**
- B. Hodnocení fertility pylu**
- C. Hodnocení termických charakteristik pylu**
- D. Kontrola hydratace pylu**
- E. Uchování pylu bramboru v kapalném dusíku**
- F. Využití pylu při křížení bramboru**

A. ODBĚR PYLU

Rodičovské rostliny bramboru pěstujeme v prostorovém izolátu (fóliovníku nebo skleníku) v nádobách, kde máme rostliny plně pod kontrolou a můžeme zabezpečit jednotlivým rostlinám optimální růstové podmínky (Obr. 1). Výhodou je i skutečnost, že urychlíme vegetaci a můžeme získávat pyl i mimo období standardní doby kvetení jednotlivých odrůd. Je také možné použít i pyl z rostlin bramboru pěstovaných v polních podmínkách, ale je třeba počítat s tím, že rostliny jsou plně vystaveny působení vlivu abiotických i biotických stresových faktorů a doba vegetace je ovlivněna, kromě termínu sázení, významně i průběhem klimatických podmínek.

Prostorový izolát je využíván k výsadbě vybraných odrůd ke křížení „na cihle (květináč)“. Odrůdy jsou tímto způsobem přinuceny ke kvetení. Hlízy jsou přímo umístěny na cihlu (květináč) a zahrnou se substrátem. Kořeny rostou přes cihlu (květináč) do půdy. Po vniknutí kořenů do půdy je substrát odstraněn. Stolony, které se vytvářejí na spodní části rostliny a na nichž se v zemi vytvářejí hlízy je třeba čas od času ořezávat. Stonky rostlin musí být přivázány ke kolíkům, protože dorůstají vysokých výšek.



Obrázek 1. Kultivace rodičovských rostlin bramboru v technickém izolátu (vlevo) v nádobách na „cihle“ (vpravo).

V období květu provádíme postupný odběr květů bramboru (Obr. 2). Otrhané květy se zralými prašníky se nechají zaschnout v laboratorních podmínkách v přepravných či obdobných nádobách s perforovaným dnem (Obr. 3), aby mohl kolem květů proudit vzduch a nedocházelo k zapaření a hnití materiálu. Z květů se po jejich zaschnutí poklepem jehly na prašníky vyklepají pylová zrna na hodinové sklíčko.



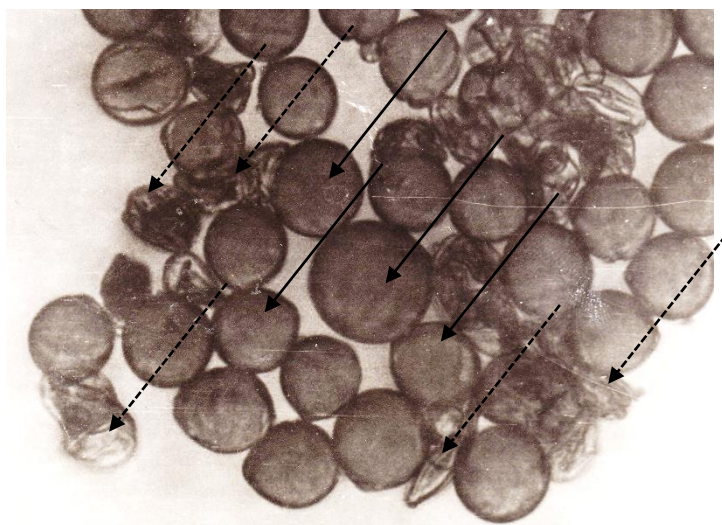
Obrázek 2. Čerstvě natrhané květy odrůd bramboru 'Valfi' (vlevo), 'Jasmína' (vpravo).



Obrázek 3. Dosoušení natrhaných květů za přirozeného proudění vzduchu v nádobách s perforovaným dnem.

B. HODNOCENÍ FERTILITY PYLU

Pro posouzení fertility pylu, podle tvaru a intenzity obarvení pylových zrn je možné použít metod vitálního barvení. Princip vitálního barvení spočívá v tom, že barvivo specificky obarví pouze živá a vitální pylová zrna. V případě poškození pylu se intenzita barvení snižuje a neživý pyl není obarvený vůbec. V tomto smyslu je možné využít např. metoda barvení pomocí jodu (Frček, 1988). Při tomto postupu jsou pylová zrna barvena roztokem 1 % jodu a jodidu draselného s příměsí stopového množství kyselého fuchsinu. Pro přípravu barvicího roztoku se nejprve rozpustí 1 g jodu v dostatečném množství 96 % etanolu, tento roztok se následně zředí destilovanou vodou na objem 100 ml. K tomu roztoku se přidává stopové množství kyselého fuchsinu. Dále se rozpustí 1 g jodidu draselného ve 100 ml destilované vody. Zásobní roztoky se uchovávali až do použití ve tmě. Až těsně před použitím k barvení pylových zrn se oba roztoky spolu smísí v poměru 1:1.



Obrázek 4. Příklad hodnocení vitality pylových zrn bramboru. Obarvená jsou fertilní (←—), neobarvená sterilní (←-----) pylová zrna. Preparáty byly prohlíženy pod mikroskopem Jenalumar při zvětšení 500x.

Pro stanovení procenta fertility se hodnotí u každého vzorku pylu počet pylových zrn na pěti podložních sklíčkách, přičemž se z každého sklíčka hodnotí čtyři zorná pole mikroskopu z různých míst na preparátu při stejném zvětšení. Počet okrouhlých, světle hnědě zbarvených pylových zrn (fertilních) a zrn nezbarvených, svraštělých, deformovaných a zrn černohnědě zbarvených se vyjádří procentuálně a vypočítá se aritmetický průměr vyjadřující průměrnou fertilitu pylu na jednom preparátu (Obr. 4). Z těchto průměrů se počítá průměrná fertilita z pěti preparátů. Následně se průměrná fertilita v procentech převede do devítibodové bonitační stupnice (Tab. 1). Pyl vybraných odrůd pro kryoprezervaci se obarví pomocí vitálního barvení a vyhodnotí na základě stanovené stupnice (Tab. 2).

Z uvedených hodnot vyplývá (Tab.2), že fertilita čerstvého pylu po jeho odběru silně kolísá a pohybuje se v rozmezí 10–100 %, respektive 2–9 vyjádřené bonitační stupnicí; fertilita se u různých vzorků pylu pohybuje v celém rozsahu míry fertility od velmi nízké do velmi vysoké. Pokles fertility pylu se projevuje změnami fyzikálních vlastností – pyl hrudkovatí a mění barvu do tmavších odstínů. Tento poznatek je třeba vzít v úvahu při uchovávání a využívání pylu pro křížení. Znamená to, že kvalita a fertilita pylu jsou velice významně ovlivněny odrůdou, a především podmínkami prostředí, tj. počasím při sběru světů, teplotou a vzdušnou vlhkostí při jejich sušení a dobou a teplotou skladování pylu před jeho kryoprezervací či využitím ke křížení.

Tabulka 1. Bonitační stupnice hodnocení fertility pylu.

Bonitační stupeň	Procento fertilního pylu	Slovní vyjádření fertility
1	0	velmi nízká
2	0,1 – 12,5	
3	12,6 – 25,0	
4	25,1 – 37,5	nízká
5	37,6 – 50,0	
6	50,1 – 62,5	
7	62,5 – 75,0	střední
8	75,1 – 87,5	
9	87,6 - 100	

Tabulka 2. Příklad stanovení fertility pylu odrůd bramboru.

Odrůda	Fertilita pylu v bonitačním stupni
Bohemia	9
Magda	9
Nancy	9
Primarosa	9
Jindra	8
Karo	8
Mariannka	8
Suzan	8
Troja	8
Westamyl	8
Barbora	7
David	7
Granola	7
Jasmína	7
Stilleto	7
Terka	7
Valfi	7
Vysočina	7
Katy	6
Starne	6

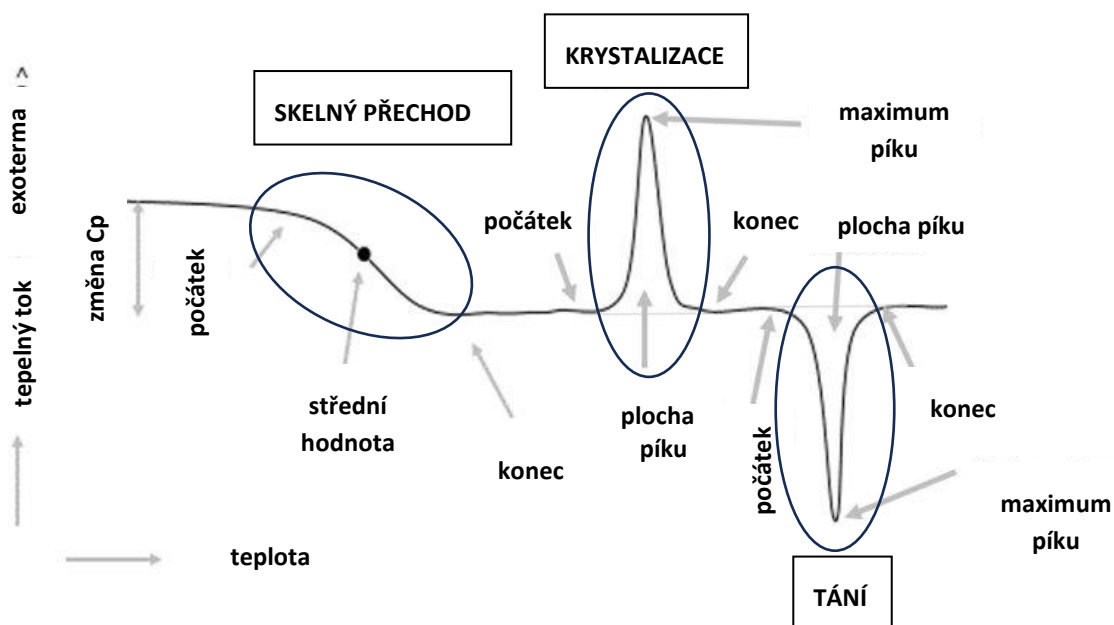
Vlasta	6
Red Anna	5
Alice	3
Bella	3
Borek	3
Dominika	3
Dominátor	2
Lydia	2
Monika	2
Nafida	2
Verne	2

C. HODNOCENÍ TERMICKÝCH CHARAKTERISTIK PYLU

Diferenční skenovací kalorimetrie

Diferenční skenovací kalorimetrie (DSC) je experimentální metoda termické analýzy, kterou lze využít ke studiu termických jevů fyzikálních dějů probíhajících v materiálu. Tyto termické procesy lze studovat jako funkci teploty nebo času během definovaného teplotního programu (Obr. 6).

Hodnocení termogramu DSC



Obrázek 6. Hodnocení termických efektů z diferenčního skenovacího kalorimetru. Termogram je záznamem změn tepelného toku v závislosti na teplotě. Změny hodnot tepelného toku indikují změny tepelné kapacity (C_p), spojené s fázovými přechody. U jednotlivých fázových přechodů – skelný přechod, krystalizace, tání – jsou označeny základní měřené parametry – počátek, střední hodnota/maximum, konec a plocha píku.

V měřených vzorcích může dojít k fázovým přechodům spojených se změnou skupenství hmoty, které jsou doprovázeny buď uvolňováním (exotermická reakce) nebo spotřebou tepla (endotermická reakce). Fázové transformace prvního druhu jsou spojeny s přijetím nebo přenosem tepla, což se projevuje jako vrchol (pík) v záznamu experimentu DSC (Obr. 6). Transformace druhého druhu nejsou spojeny s přijetím ani odevzdáváním tepla fázového přechodu, ale tepelná kapacita materiálu se skokově mění, což se v DSC projevuje jako náhlá změna základní linie záznamu (Obr. 6). V DSC experimentu se měří rozdíly mezi množstvím tepla dodaného vzorku a referenčnímu vzorku během předem definovaného teplotního programu. Jako referenční se používá inertní materiál, obvykle prázdná hliníková pánvička, který nevykazuje fázové změny ve zvoleném teplotním režimu. Pro měření vzorků se využívá standardní metoda DSC bez teplotní modulace při standardní rychlosti ohřevu a chlazení 10 °C/min.

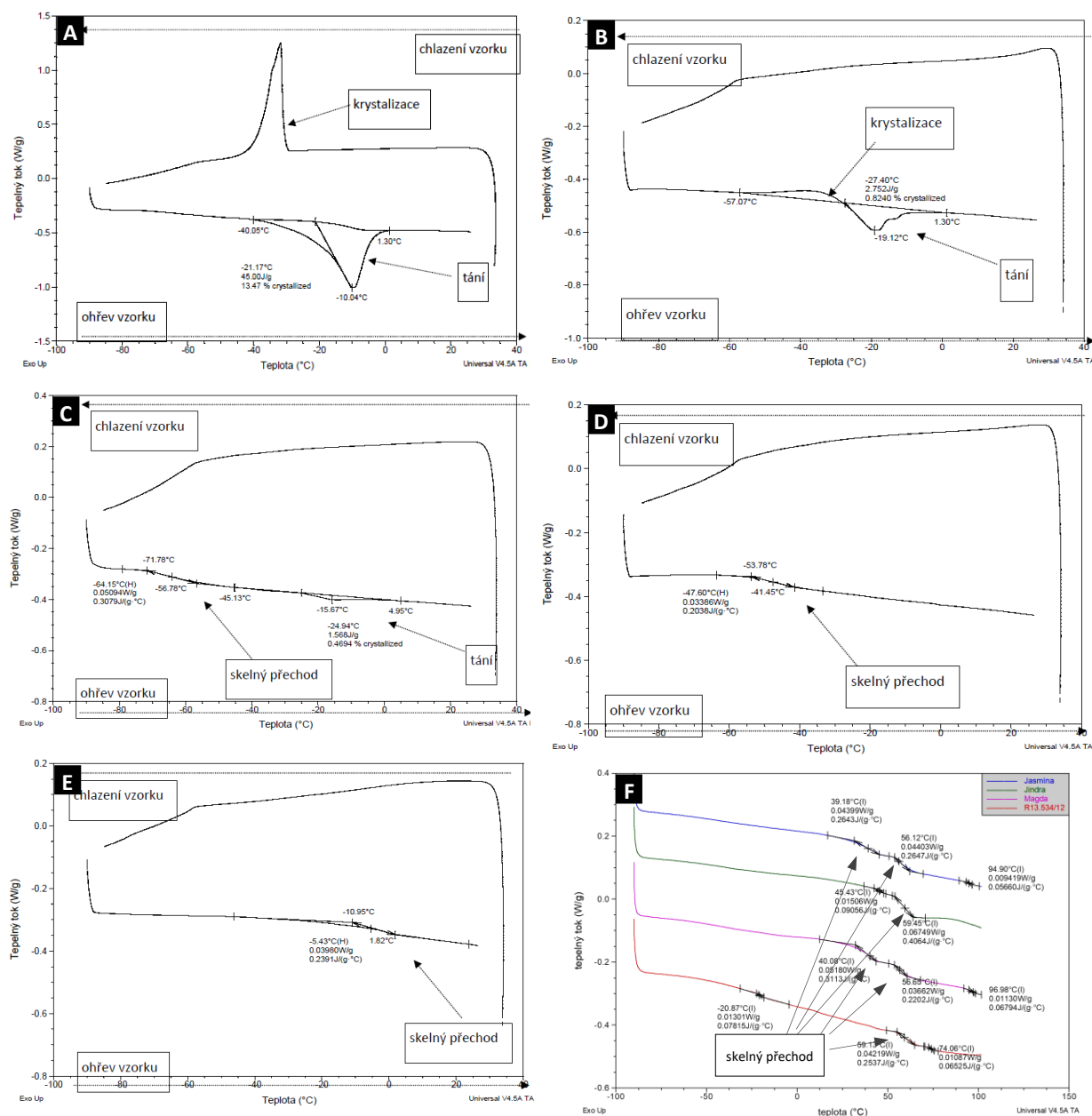
Měření termických charakteristik pylu

Pro měření pylu používáme zásadně hermeticky uzavřené pánvičky, aby nedocházelo ke ztrátám obsahu vody před nebo v průběhu DSC měření. Pyl se přenáší do měřicí pánvičky pomocí malé špachtle. Množství měřeného pylu závisí na citlivosti přístroje a množství vody v pylu. Protože je obsah vody v pylu poměrně nízký, doporučuje se spíše vyšší navážka, a to 15-20 mg pylu na jedno měření. Teplotní rozsah DSC měření závisí na pozici termických efektů, které jsou ovlivněny charakteristikami měřeného materiálu a množstvím vody. Na základě zjištěných parametrů lze konstatovat, že není nutné měřit vzorky pylu do teploty -80 °C a dostačující je zařízení s elektrickým chlazením měřicí cely bez nutnosti chlazení kapalným dusíkem (Tab. 3).

Tabulka 3. Příklad hodnocení termických charakteristik u vybraných vzorků pylu bramboru. Byla stanovena teplota skelného přechodu (T_g), teplota tání (T_m) a podíl krystalické fáze v % čerstvé hmoty (krystalizace). Hodnoty jsou průměrem tří opakování, chyba představuje standardní chybu průměru.

genotyp	T_g (°C)	St. chyba	T_m (°C)	St. chyba	Krystalizace (%)	St. chyba
Bohemia			-28,9	0,34	3,8	1,55
Bohemia II			-28,1	0,20	1,0	0,06
Jasmína			-28,0	0,82	1,7	0,24
Jasmína II			-28,8	0,27	1,2	0,13
Jasmína III	-49,3	1,05				
Jindra	-65,9	0,25	-23,0	0,35	0,1	0,03
Jindra II	-17,8	1,82				
Magda I			-22,0	0,38	14,3	0,06
Magda II			-26,0	1,01	7,9	0,45
Nancy	-66,4	0,16	-23,8	0,10	0,3	0,01
Nancy II	-64,0	0,51				
Nautilus	-5,2	0,88				
Red Anna	-42,5	0,30				
Vlasta	-27,8	0,35				
Vlasta II			-27,7	0,11	0,9	0,14

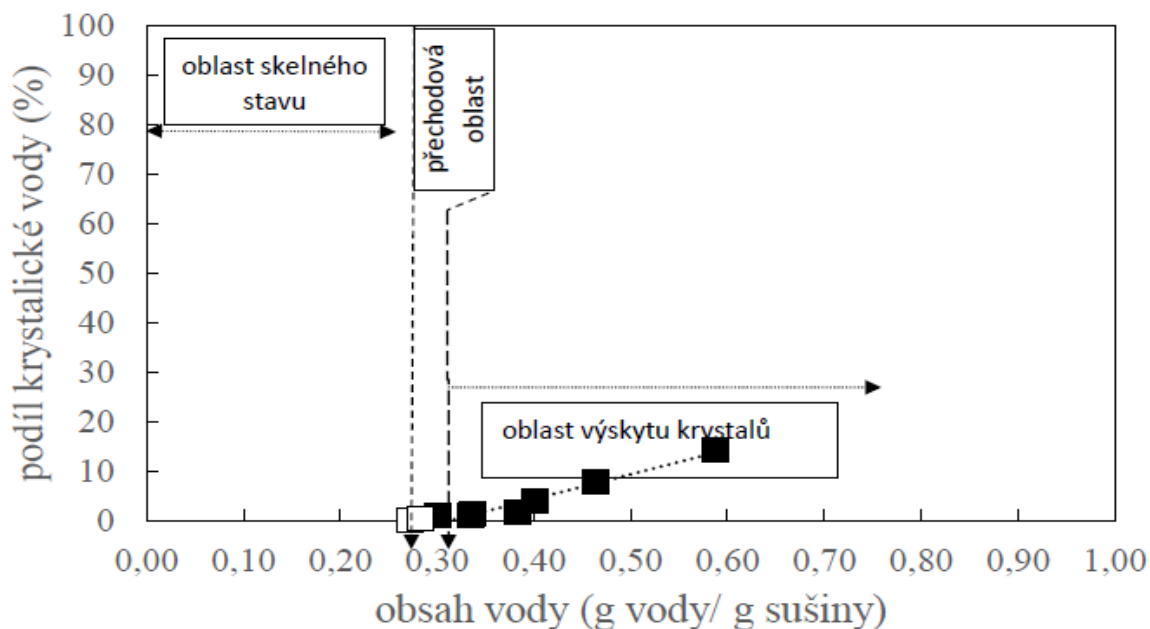
Na získaném termogramu se vyhodnocuje přítomnost exotermických a souvisejících endotermických efektů, popřípadě skelného přechodu. Stanovuje se především počáteční hodnota píků, která se obvykle označuje jako tzv. onset. Následný výpočet plochy píků se používá k výpočtu podílu vody, u které došlo ke krystalizaci/tání. V případě absence zmíněných píků lze očekávat detekci tzv. skelných přechodů, které jsou definované především střední hodnotou a dále počátkem a koncem efektu. Zkušenosti z měření pylu v několika ročnících ukázaly na poměrně vysokou variabilitu termických charakteristik pylu bramboru v závislosti na genotypu, ročníku a termínu odběru (Obr. 7). Vzorky pylu bramboru často vykazují přítomnost exotermických a endotermických efektů s podílem krystalické fáze (ledu) do 14 %. Poměrně vysoká variabilita existuje i v případě teploty skelného přechodu pylu bramboru. Hodnoty se pohybují v rozsahu teplot od -80 °C do nefyziologických teplot přes 40 °C.



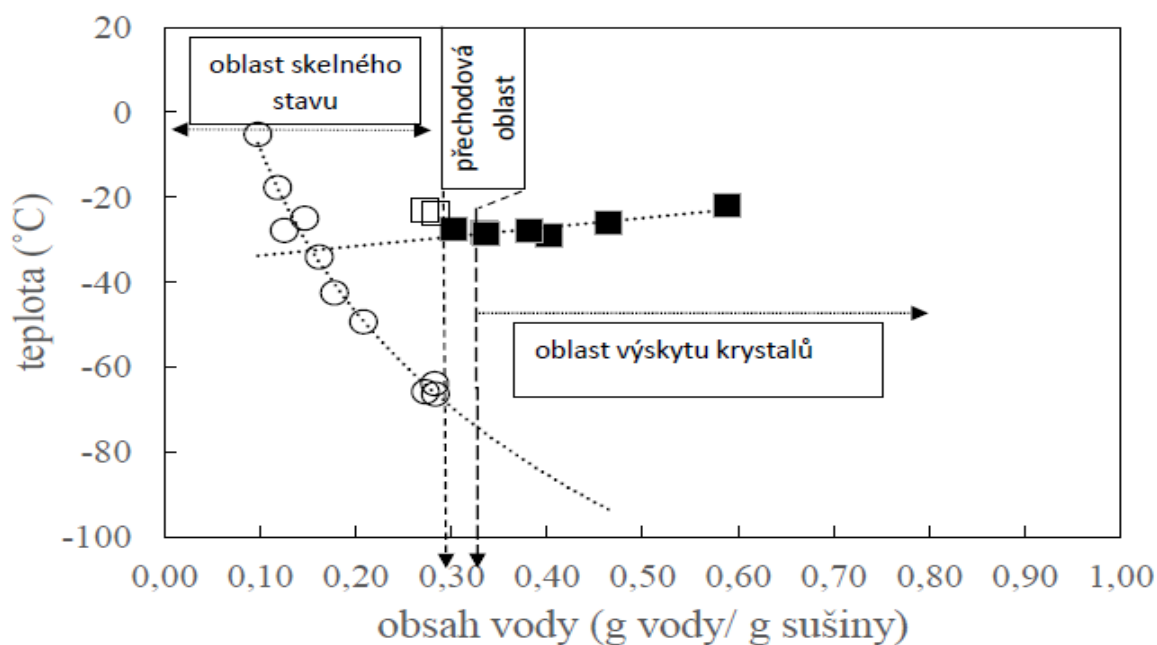
Obrázek 7. Příklady hodnocení termogramů pylu bramboru odrůd (A) Magda, (B) Vlasta, (C) Nancy, (D) Jasmína, (E) Nautilus a (F) genotypů Jasmína, Jindra, Magda a novošlechtění R13.534/12. Standardní hodnocení píku endotermie (tání) při ohřevu vzorku. Na křivkách jsou vyznačeny termické efekty: krystalizace, tání a skelný přechod.

D. KONTROLA HYDRATACE PYLU

Obsah vody ve vzorcích pylu se stanoví gravimetricky. Před měřením DSC se stanoví čerstvá hmotnost pylu, po měření se vzorky vloží do sušárny nastavené na teplotu 105 °C po dobu 5-7 dní. Pak se vzorky přemístí do exikátoru s vysušeným silikagelem pro vytemperování vzorku a následně se provede zvážení sušiny vzorků.

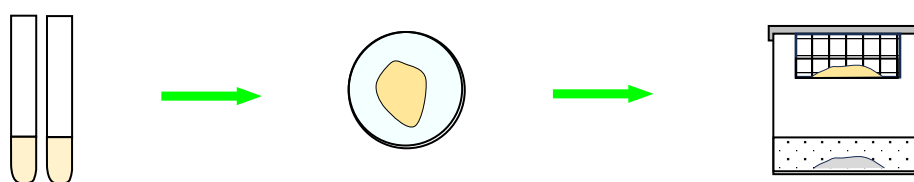


Obrázek 8. Přítomnost krystalické vody (■□) v pylu bramboru, (■) bez přítomnosti a (□) při současné přítomnosti skelného přechodu v závislosti na obsahu vody.

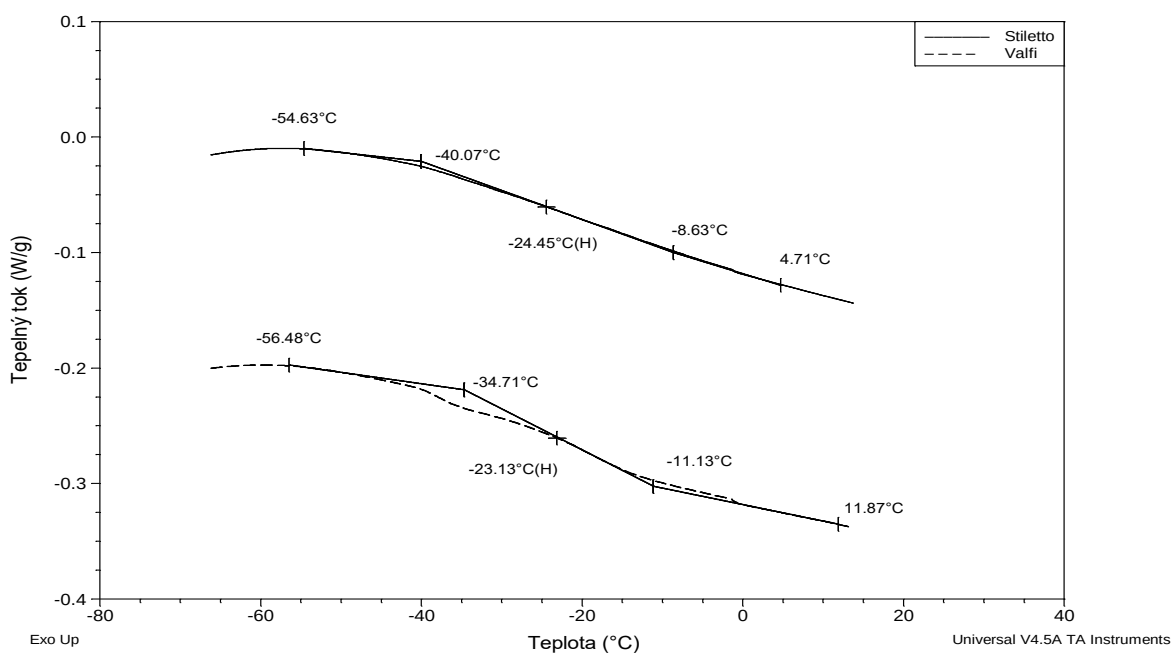


Obrázek 9. Přítomnost skelného přechodu (o) a teploty tání (■□) ve vzorcích pylu, (■) bez přítomnosti a (□) při současné přítomnosti skelného přechodu v závislosti na obsahu vody.

Z rozdílu hodnot hmotnosti čerstvého pylu a pylu vysušeného v sušárně se stanoví původní obsah vody ve vzorcích pylu. Obsah vody v pylu bramboru se pohybuje v rozmezí 0,1 až 0,6 g vody na 1 g sušiny. Kolísání obsahu vody v jednotlivých vzorcích pylu bramboru vysvětluje rovněž variabilitu ve fertilitě čerstvě sklizeného pylu. Pokud je obsah vody vyšší než 0,28 dochází při poklesu teploty ke krystalizaci vody (Obr. 8), což se projeví přítomností exotermie při měření DSC. Při nižším obsahu vody než 0,28 je detekován skelný přechod (Obr. 9). Při vysokém obsahu vody, který je indikován při měření DSC přítomností izoterm, je nutné snížit obsah vody pomocí jejich vysušení nad nasyceným roztokem $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (46% RH) nebo MgCl_2 (33% RH) při 23 °C (Obr. 10). Doba do dosažení rovnovážného stavu (nedochází ke změnám hmotnosti vzorku) trvá několik hodin až několik dní podle počátečního obsahu vody a množství vzorku. Po dehydrataci je nutné ověřit měření termických charakteristik pomocí DSC pro detekci exotermie nebo naopak skelného přechodu (Obr. 11).



Obrázek 10. Dehydratace pylu nad nasyceným roztokem soli.



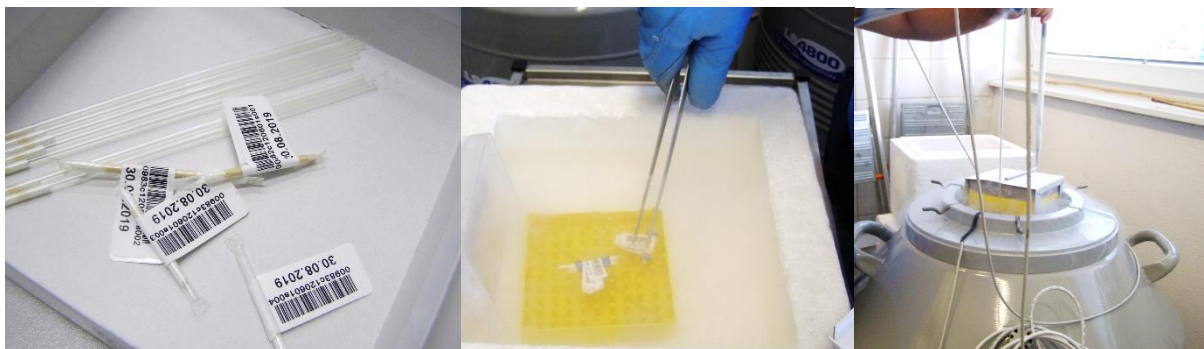
Obrázek 11: Příklad termogramu vhodně připraveného pylu bramboru pro jeho kryoprezervaci (odrůdy 'Stiletto', 'Valfi'). Na každé křivce při ohřevu vzorku jsou vyznačeny (zleva doprava) teploty charakterizující počátek skelného přechodu, tzv. onset, střední hodnota definovaná jako střední výška efektu (H), dále tzv. endset a konec skelného přechodu.

E. UCHOVÁNÍ PYLU BRAMBORU V KAPALNÉM DUSÍKU

Kryoprezervace pylu

Vzorky pylu lze uchovávat v podmínkách kryoprezervace ve dvou typech nádob: ve stéblech nebo v kryozkumavkách. V případě bramboru je obvykle k dispozici poměrně malé množství pylu, a tak je poměrně efektivní uchování pylu ve stéblech, ale není vyloučeno ani jeho uchování v kryozkumavkách. Za pomoci vývěvy se pyl naseje do stébel a následně se stéblo uzavře na obou stranách zatavením, aby nedocházelo ke kontaktu pylu s kapalným dusíkem. Při výběru kryozkumavek je nutné vybírat ty se silikonovým těsněním, aby dostatečně těsnily a nedocházelo k pronikání kapalného dusíku do kryozkumavek nebo naopak k uvolňování pylu do okolí nádobek, kdy by mohlo dojít ke kontaminacím skladovaných vzorků pylu získaných od jiných genotypů.

Při práci s kapalným dusíkem je nutné zároveň dodržovat pravidla bezpečnosti a používání ochranných pomůcek, protože hrozí riziko popálení v případě kontaktu kapalného dusíku s pokožkou, riziko exploze kryozkumavky při náhlé změně tlaku způsobené změnou skupenství dusíku nebo riziko hypoxie při poklesu podílu kyslíku ve vzduchu v důsledku odparu velkého množství kapalného dusíku.



Obrázek 12: Příprava vzorků pylu bramboru pro jejich kryoprezervaci. Pyl je umístěn do plastových stébel (vlevo), zataví se u nich oba konce a patřičně označí (zde s využitím čárového kódu). Připravené vzorky se vloží do kapalného dusíku (uprostřed) a poté se uloží do Dewarovy nádoby (vpravo).

Odtání pylu a desikace vzorků

K odtátí pylu z podmínek kryoprezervace dochází tak, že kryozkumavky s pylem jsou vyjmuty z kapalného dusíku a umístěny do exikátoru s dehydratovaným silikagelem na přibližně 60 minut. Během této doby se kryozkumavky a jejich obsah ohřejí na pokojovou teplotu, čímž se eliminuje riziko kondenzace vzdušné vlhkosti na površích a znehodnocení pylu. Pyl je poté uchováván v chladu v uzavřeném obalu až do jeho dalšího využití.

F. VYUŽITÍ PYLU PŘI KŘÍŽENÍ BRAMBORU

Křížením se rozumí záměrné opylení rostlin mateřského genotypu pylem vybraného otcovského genotypu. V květenství se odstraní všechny rozkvetlé květy. A ponechá se 5–7 poupat, ostatní se odstraní. Kastrace květů není nutná u genotypů, o kterých se bezpečně ví, že jsou úplně bez pylu anebo, že mají pyl sterilní. Pro jistotu ve všech případech raději provádíme kastraci všech prašníků z poupat určených ke křížení. U rostlin mateřských genotypů

je třeba provést kastraci prašníků v květech před jejich zráním, aby nedošlo k nekontrolovanému opylení. Na blizny se preparační jehlou nanese pyl.

Vytvořené bobule jsou vloženy do sáčku ze silonového úpletu, aby v případě odlomení nedošlo k jejich ztrátě. Po vytvoření bobulí je izolát odstraněn. Brambor je heterozygotní rostlina, proto potomstva vykazují širokou variabilitu. Ze semen jsou po ukončení jejich dormance na jaře následujícího roku ve skleníkových podmínkách vypěstovány mladé rostliny bramboru. V potomstvech jsou vybírány nejlepší rostliny, které jsou namnoženy a hodnoceny.



Obrázek 13: Odstranění prašníků z květů bramboru pro zabránění samoopylení (vlevo). Bobule bramboru v sáčku ze silonového úpletu (uprostřed). Semena bramboru vzniklá z křížení připravená pro výsev semenáčků (vpravo).

III SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Nově navržená metodika kryoprezervace je originálním postupem, který dosud nebyl dříve popsán ani využíván u kulturních plodin v České republice. Nová metodika kryoprezervace pylu bramboru přináší aktuální poznatky výzkumu a lépe a přesněji definuje hodnocení pylu bramboru před jeho kryoprezervací. Tato nová metoda umožňuje mnohem lépe a operativněji pracovat s genetickými zdroji při šlechtění bramboru. Kromě vyšší operativnosti při křížení odrůd bramboru s odlišnou dobou kvetení, tato metoda zajišťuje vyšší jistotu a lepší plánování šlechtitelského procesu. To je důležité vzhledem k variabilitě při získání dostatečného množství kvalitního pylu pro křížení, jenž je při použití klasických postupů křížení silně ovlivněn průběhem ročníku s ohledem na průběh vegetace a metodologických podmínek. Termická analýza umožňuje stanovit naprosto exaktně přítomnost fázových přechodů v pylu, souvisejících se změnou skupenství z kapalné do pevné fáze. Lze tak jednoznačně detekovat přítomnost volné vody, u které je enormní riziko tvorby ledových krystalů při kryoprezervaci nebo dokonce i při odtávání pylu z kapalného dusíku. Tento obsah volné vody lze pomocí termické analýzy i přesně kvantifikovat na základě množství energie související s fázovým přechodem. Tato informace je velmi důležitá pro posouzení stavu pylu a pro navržení následujícího postupu dehydratace pylu a pro dosažení optimálních podmínek pro dlouhodobé bezpečné skladování pylu v kapalném dusíku.

IV POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Budoucím uživatelem nové metodiky kryokonzevace pylu bramboru je Vesa Velhartice a.s., soukromá firma zabývající se šlechtěním nových odrůd bramboru. Tato nová metoda umožňuje efektivnější využití genetických zdrojů bramboru při šlechtění nových odrůd. Výhodou této metody je především omezení ročníkové variability v produkci pylu bramboru u některých odrůd a také překonání bariéry ve šlechtění při využití rodičů s rozdílnou dobou kvetení. Nová metodika umožňuje bezpečnější způsob uchování pylu bramboru za přesně definovaných podmínek, bez rizika jakýchkoliv změn v uchovávaném materiálu, včetně stárnutí a ztráty životnosti. Tato metoda může být využita i na zahraničních pracovištích, které se zabývají obdobnou problematikou (Ballesteros a Waters 2007).

V EKONOMICKÉ ASPEKTY

Náklady na zavedení postupů uvedených v metodice závisí na tom, jestli se zavádí nově celý provoz nebo se pouze implementuje tato metodika do stávajícího provozu. V případě, že laboratoř již postup diferenční skenovací kalorimetr a metodu kryokonzervace využívá, jsou náklady na zavedení nové metodiky nulové.

Náklady na zavedení celého provozu jsou následující:

Diferenční skenovací kalorimetrie

Diferenční skenovací kalorimetr	2 000 tis. Kč
Analytické váhy	120 tis. Kč
Horkovzdušná sušárna	30 tis. Kč
Celkem	2 150 tis. Kč

Mikroskopie

Laboratorní mikroskop	40 tis. Kč
Digitální kamera	10 tis. Kč
Celkem	50 tis. Kč

Kryoprezervace

Dewarova nádoba na kapalný dusík	27 tis. Kč
Dewarova nádoba na uchování vzorků v kapalném dusíku	120 tis. Kč
Celkem	147 tis. Kč

Spotřební materiál

Sklo	cca 10 tis. Kč
Plasty	cca 12 tis. Kč
Chemikálie	cca 35 tis. Kč
Pinzety apod.	cca 5 tis. Kč
Celkem	cca 62 tis. Kč
Celková cena za zavedení metodiky	2 409 tis. Kč

Z uvedeného přehledu je patrné, že zavedení nové metodiky kryokonzervace pylu bramboru přesahuje 2 000 tis. Kč, pokud se zavádí celý nový postup, ale pokud se využije stávající zařízení v některé ze zavedených laboratoří, tak jsou náklady spojené pouze se spotřebním materiálem, tj. provozem diferenčního skenovacího kalorimetru – měřicí pánvičky, plyný dusík, dále barvičky pro vitální barvení a spotřeba kapalného dusíku v Dewarových nádobách a osobní náklady v řádech několika tis. Kč na genotyp za rok, v závislosti na množství uchovávaného materiálu.

Ekonomický přínos pro uživatele

Ekonomický přínos spočívá zejména v tom, že díky této metodice není nutné každoročně pěstovat otcovské genotypy bramboru pro potřeby křížení, což vede k úspoře nákladů spojených se zakládáním kultur a kultivací otcovských genotypů bramboru včetně příslušných agrotechnických zásahů. V jednom roce lze s využitím této metodiky napěstovat otcovské rostliny, sklídit veškerý pyl a po kontrole jeho kvality jej uložit do kapalného dusíku. V případě potřeby lze odtát jen potřebné množství pylu vybraného genotypu ve vhodném termínu a tento postup lze opakovat dle potřeby v různých letech až do spotřebování celého objemu skladovaného pylu od příslušného genotypu. V závislosti na intenzitě křížení a vlastnostech otcovského genotypu lze snížit frekvenci kultivace otcovských genotypů v polních podmínkách a tím i příslušné náklady přibližně na jednu desetinu. I když je stále nezbytné otcovské genotypy udržovat například pomocí *in vitro* kultur nebo kryoprezervace, náklady na jejich uchování jsou přibližně v úrovni 50 % s jejich kultivací v polních podmínkách.

VI SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Ballesteros, D., & Walters, C. (2007). Water properties in fern spores: sorption characteristics relating to water affinity, glassy states, and storage stability. *Journal of Experimental Botany*, 58(5), 1185-1196.
- Benelli, C., 2021, Plant cryopreservation: A look at the present and the future. *Plants*, 10(12), 2744.
- Engelmann, F. 2004, "Plant cryopreservation: progress and prospects." In *Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 40: 427-433.
- Matsumoto, T., 2017, Cryopreservation of plant genetic resources: conventional and new methods. *Reviews in Agricultural Science*, 5, 13-20.
- Reed, B. M., 2017, Plant cryopreservation: a continuing requirement for food and ecosystem security. In *Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 53, 285-288.

VII SEZNAM PUBLIKACÍ PŘEDCHÁZEJÍCÍ METODICE

- Faltus, M., Svoboda P., Domkářová, J., Horáčková, V., Zámečník, J., Nesvadba, V., Bilavčík, A. Využití metody kryoprezervace ve šlechtitelském procesu bramboru a chmele. *Úroda*. 2019, 67. (12), 15-22. ISSN 0139-6013.
- Faltus M., Svoboda P., Domkářová J., Bilavčík A., Zámečník J. Vliv dehydratace na obsah vody a termické vlastnosti pylu bramboru a chmele. *Úroda*. 2020, 68. (12), 41-48. ISSN 0139-6013.

VIII DEDIKACE

Metodika je výsledkem řešení podpory na rozvoj výzkumné organizace (VÚRV, v.v.i.) č. MZE RO0423 a výzkumného projektu NAZV QK1910277 s názvem: „Využití metody kryoprezervace pro zefektivnění šlechtitelského procesu hospodářsky významných zemědělských plodin a uchování lesních dřevin“.

IX JMÉNA OPONENTŮ:

Odborný oponent:

Ing. Přemysl Landa, 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 kryokonzervace genetických zdrojů bramboru

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Autoři (podíl na práci): Ing. Miloš Faltus, Ph.D. (30 %)
RNDr. Alois Bilavčík, Ph.D. (10 %)
Ing. Jaroslava Domkářová, Ph.D. (20 %)
Ing. Vendulka Horáčková, CSc. (15 %)
Ing. Jiří Ptáček, CSc., CSc. (10 %)
Ing. Jiří Zámečník, CSc. (15 %)

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 2023, první vydání

Vydáno bez jazykové úpravy

Kontakt na autory: faltus@vurv.cz
bilavcik@vurv.cz
domkarova@vubhb.cz
horackova@vubhb.cz
ptacek@vubhb.cz
zamecnik@vurv.cz

Autor fotografií: Jaroslava Domkářová

