



Ing. Miloš Faltus, Ph.D.
Ing. Petr Svoboda, CSc.
RNDr. Alois Bilavčík, Ph.D.
Ing. Vladimír Nesvadba, Ph.D.
Ing. Jiří Zámečník, CSc.

Metodika kryoprezervace pylu chmele 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. 11/2023) podle ustanovení § 1746 odst. 2 zákona č. 89/2012 Sb., občanského zákoníku. MZe, jako certifikační orgán, vydal Osvědčení č.j. MZE-73890/2023-13113 o uznání metodiky dne 22. 12. 2023.

Autoři: Ing. Miloš Faltus, Ph.D., VÚRV, v.v.i. Praha
 Ing. Petr Svoboda, CSc., CHI Žatec
 RNDr. Alois Bilavčík, Ph.D., VÚRV, v.v.i. Praha
 Ing. Vladimír Nesvadba, Ph.D., CHI Žatec
 Ing. Jiří Zámečník, CSc., VÚRV, v.v.i. Praha

Oponenti:
doc. Ing. František Hnilička, Ph.D., Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, ČZU
Ing. Adéla Kubásková, Ministerstvo zemědělství ČR

Metodika kryoprezervace pylu chmele pro jeho využití ve šlechtitelském procesu

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Metodika kryoprezervace pylu chmele pro jeho využití ve šlechtitelském procesu

Metodika definuje nový postup kryoprezervace pro dlouhodobé uchování pylu genetických zdrojů chmele *Humulus lupulus* L. s využitím termické analýzy pro identifikaci a kvantifikaci fázových přechodů. Přítomnost a typ fázových přechodů souvisí s přítomností vody v pylu, a především s podílem frakce tzv. volné vody, která může krystalizovat při kryoprezervaci a potenciálně způsobit poškození skladovaného pylu. Přesnější informace o stavu pylu a jeho vhodnosti pro kryoprezervaci umožňuje diferenční skenovací kalorimetrie, která umožňuje stanovení přítomnosti fázových přechodů prvního či druhého řádu, a teploty těchto termických efektů. Vitalita pylu je stanovena pomocí vitálního barvení a fertilita prostřednictvím testu fertility pylu po kryoprezervaci na samičích rostlinách. Přínosy metodiky souvisí s ukončením udržování otcovských genotypů chmele pro potřeby křížení v polních podmínkách, čímž dojde k úspoře, která souvisí se zakládáním kultur a kultivací otcovských genotypů chmele včetně příslušných agrotechnických zásahů. 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 chmele bez nutnosti pěstování otcovského genotypu a využít jej ve šlechtitelském procesu.

Klíčová slova: Diferenční skenovací kalorimetrie; *Humulus lupulus*, L.; kryokonzervace; křížení; termická analýza

Methodology for cryopreservation of hop germplasm collection

The methodology defines a new cryopreservation procedure for the long-term preservation of pollen of the genetic resources of the hop *Humulus lupulus* L. using thermal analysis for the identification and quantification of phase transitions. The presence and type of phase transitions is related to the presence of water in the pollen, and above all to the share of the so-called free water fraction, which can crystallize during cryopreservation and potentially cause damage to the stored pollen. More precise information about the state of the pollen and its suitability for cryopreservation is made possible by differential scanning calorimetry, which enables the determination of the presence of phase transitions of the first or second order, and the temperature of these thermal effects. Pollen vitality is determined using vital staining and fertility using a pollen fertility test after cryopreservation on female plants. The benefits of the methodology are related to the fact that it is not necessary to grow paternal hop genotypes every year for the needs of crossing, which results in savings related to the establishment of cultures and the cultivation of paternal hop genotypes, including the relevant agrotechnical interventions. In addition, annual variability in pollen production and possible differences in the flowering time of the parent plants are eliminated. In the case of planned crossing, the necessary amount of pollen of the selected hop 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; *Humulus lupulus* 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 silikagelu pro dehydrataci pylu	9
3)	Postup kryoprezervace pylu chmele	9
A.	Samčí rostliny chmele a odběr pylu	10
B.	Hodnocení kvality pylu chmele	11
C.	Uchování pylu chmele v kapalném dusíku	16
D.	Využití pylu při křížení chmele	16
III.	Srovnání novosti postupů	19
IV.	Popis uplatnění metodiky	19
V.	Ekonomické aspekty	20
VI.	Seznam použité literatury	21
VII.	Seznam publikací, které předcházely 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 chmele *Humulus lupulus* L. s využitím termické analýzy pro identifikaci a kvantifikaci fázových přechodů.

II VLASTNÍ POPIS METODIKY

1) PRINCIP METODY

Podstatou této metodiky je uchování pylu při teplotě bodu varu kapalného dusíku (-196 °C), kdy se rostlinný materiál nachází v tzv. skelném stavu (Benson 2008). Skelný stav je amorfni pevná fáze hmoty, která umožňuje uchování rostlinného materiálu ve stabilním a funkčním stavu. Další důležitou podmínkou bezpečného uchování vzorků je zamezení tvorby ledových krystalů, které letálně poškozují uložený materiál (Day *et al.* 2008). Prvním krokem, kterým lze kontrolovat bezpečné uchování pylu při teplotě kapalného dusíku je stanovení obsahu vody. Přesněji lze podmínky kryoprezervace kontrolovat s využitím termické analýzy, která umožňuje měření fázových přechodů při poklesu teploty. Lze detekovat krystalizaci vody, která materiál poškozuje, nebo skelný přechod, který zachovává originální uspořádání a funkci živého rostlinného materiálu. Krystalizace vody a tvorba ledu vždy souvisí s přítomností tzv. volné vody, která není vázána na buněčné struktury. Na základě informací získaných z termické analýzy lze upravit obsah vody ve vzorcích tak, aby byly navozeny optimální podmínky pro kryoprezervaci, umožňující 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

Samotná metoda není příliš náročná na potřebné chemikálie:

Chladicí a skladovací medium

- Kapalný dusík

Desikant

- Silikagel

Vitální barvení

- Fyziologický roztok
- Destilovaná voda
- Etanol
- Lugolův roztok
- Neutrální červeň

C. DROBNÉ POMŮCKY

Následující pomůcky jsou potřebné pro realizaci metody kryokonzervace chmele:

- Zkumavky pro odběr pylu
- Stojánek na kryozkumavky
- Kryozkumavky 1,8 ml
- Polystyrénový džbán 1L
- Pinzeta, skalpel, špachtle, preparační jehla

D. PŘÍPRAVA SILIKAGELU PRO DEHYDRATACI PYLU

Pro dehydratace pylu chmele jsou použity skleněné nádoby (200 ml) s 50 mg vysušeného sterilního silikagelu. Silikagel je sušen dva dny v horkovzdušném sterilizátoru při teplotě 170 °C.

3) POSTUP KRYOPREZERVACE PYLU CHMELE

Pro větší přehlednost lze celý postup kryoprezervace pylu chmele rozdělit na čtyři fáze anebo podrobněji na devět dílčích kroků:

A. Samčí rostliny chmele a odběr pylu

1. Samčí rostliny chmele
2. Odběr pylu

B. Hodnocení kvality pylu chmele

3. Termická analýza pylu
4. Stanovení obsahu vody v pylu
5. Hodnocení vitality pylu

C. Uchování pylu chmele v kapalném dusíku

6. Kryoprezervace pylu
7. Odtání pylu a desikace vzorků

D. Využití pylu při křížení chmele

8. Opylování samičích rostlin chmele
9. Hodnocení fertility pylu

A. SAMČÍ ROSTLINY CHMELE A ODBĚR PYLU

1) Samčí rostliny chmele

Výskyt samčích rostlin (Obr. 1) v blízkosti produkčních chmelnic způsobuje jejich opylení a tím vznik nežádoucích semen v samičích hlávkách. Semena obsahují velké množství lipidů, které negativně ovlivňují pěnivost piva. V současné době pivovary preferují chmelové hlávky bez semen. Proto v největších chmelařských oblastech na světě jsou samčí rostliny systematicky z porostů odstraňovány. Pro šlechtění nových odrůd jsou však samčí rostliny nepostradatelné, je však nutné je pěstovat odděleně od produkčních chmelnic.



Obrázek 1. Kvetoucí samčí rostlina chmele.

2) Odběr pylu

Z vybraných samčích rostlin je odebrán pyl odstříhnutím pazochů a jejich ponecháním v nádobě s vodou do druhého dne. Pod pazochy je umístěna papírová podložka, na kterou se druhý den pyl opatrně vyklepe (Obr. 2). Štětečkem jsou odstraněny nečistoty a pyl je následně uchováván ve zkumavce v chladu (Obr. 3).



Obrázek 2. Pazochy samčí rostliny chmele.



Obrázek 3. Čerstvě získaný pyl chmele a připravený na další použití či uchování.

B. HODNOCENÍ KVALITY PYLU CHMELE

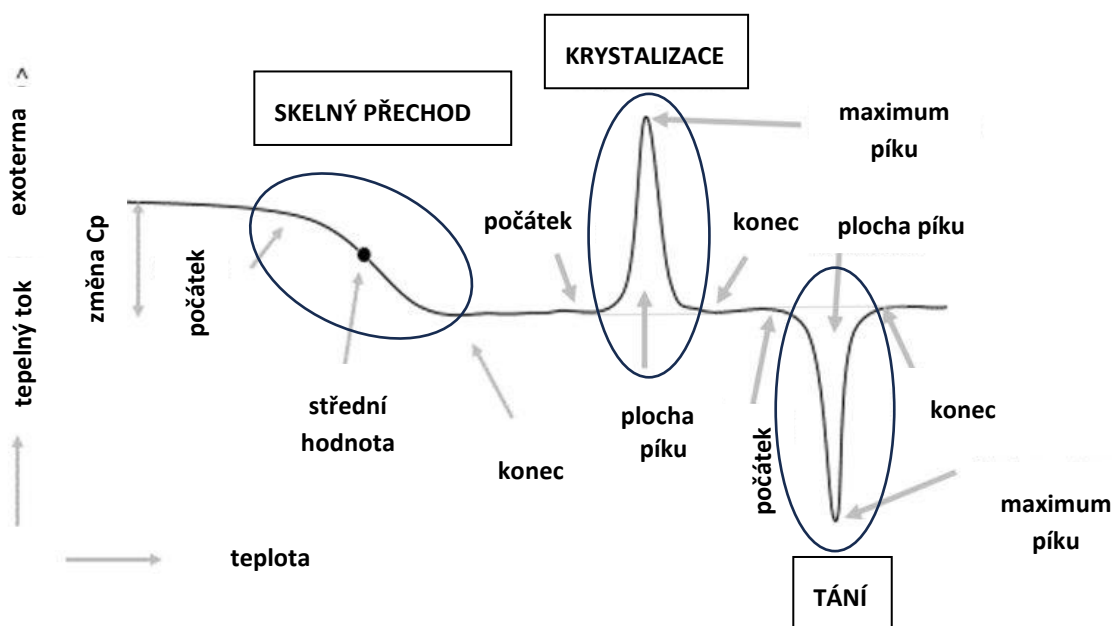
3) Termická analýza pylu

Diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC) je experimentální metoda termické analýzy (Obr. 4), kterou lze využít ke studiu tepelných projevů fyzikálních dějů probíhajících v materiálu. Tyto tepelné procesy lze studovat jako funkci teploty nebo času během definovaného teplotního programu. V materiálech může dojít k mnoha fázovým změnám, 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 v experimentu DSC. 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. V DSC experimentu se měří rozdíly mezi množstvím tepla dodaného vzorku a referenčnímu vzorku během předem definovaného teplotního programu (Obr. 5). Jako referenční se používá inertní materiál (tj. materiál, ve kterém nedochází k fázovým změnám ve zvoleném teplotním režimu), obvykle prázdná hliníková pánvička.



Obrázek 4. Diferenciální skenovací kalorimetr. Vlevo TA2920, uprostřed Q2000 a vpravo Multi-Sample X3 DSC od firmy TA Instruments/WATERS (USA).

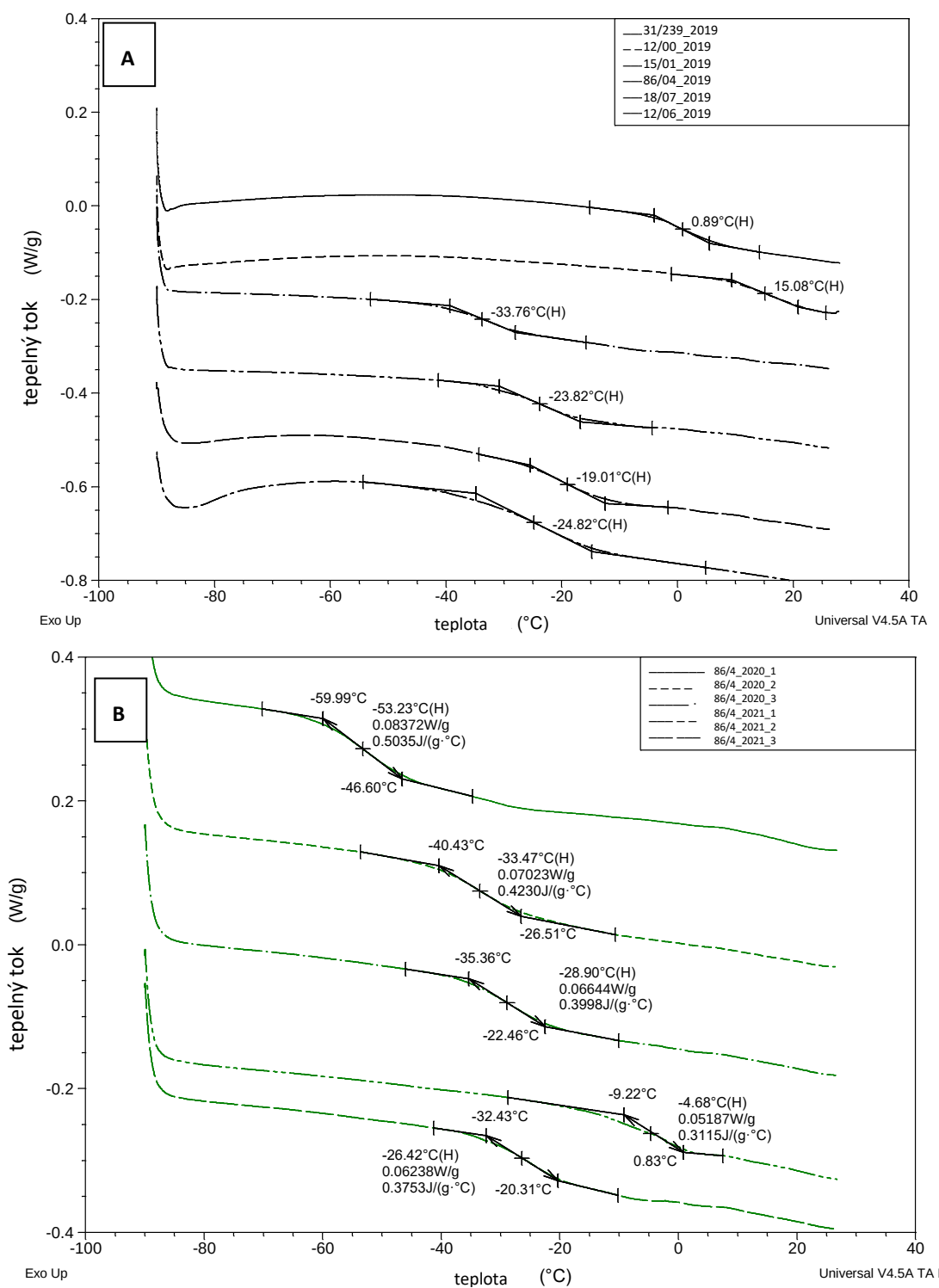
Hodnocení termogramu DSC



Obrázek 5. 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.

Odebraný pyl se pomocí malé špachtle vloží do měřicí pánvičky. Množství měřeného pylu závisí na citlivosti přístroje a množství vody v pylu. Protože je obsah vody v pylu obvykle velice nízký, lze doporučit spíše vyšší navážku a to 15–20 mg pylu na jedno měření. Teplotní rozsah DSC měření závisí opět na vlastnostech měřeného materiálu a množství vody. Na základě zjištěných parametrů lze konstatovat, že není nutné měřit vzorky pylu do teploty -80 °C a ve většině případů na teplotu nižší než -60 °C . Tento poznatek je poměrně důležitý z praktického hlediska, protože je možné při DSC měření využít chlazení elektrické a není potřeba disponovat dražším zařízením využívajícím kapalný dusík. Protože jsou získané termogramy poměrně jednoduché a neobsahují velké množství efektů, které by se případně překrývaly, postačuje pro měření vzorků standardní metoda DSC bez teplotní modulace při standardní rychlosti ohřevu a chlazení 10 °C/min .

Na získaném termogramu je vyhodnocena přítomnost exotermických a souvisejících endotermických efektů, popřípadě skelného přechodu. Stanovena je především počáteční hodnota píků, která se obvykle v termické analýze 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. Na základě zkušeností z měření pylu v několika ročnících (2019–2022) nebyla zjištěna přítomnost žádného exotermického ani endotermického jevu, které by odhalovaly přítomnost zmrzlé vody v měřených vzorcích pylu u chmele. Ani u jednoho z testovaných genotypů nebyla zjištěna přítomnost exotermických či endotermických jevů, které by odhalovaly přítomnost zmrzlé vody (Obr. 6). Teplota skelného přechodu vzorků pylu chmele se pohybuje v intervalu od přibližně -53 °C do -5 °C bez přítomnosti efektů krystalizace či tání zmrzlé vody, které by signalizovaly problémy s úspěšnou kryoprezervací pylu chmele. Teplota skelného přechodu se mírně liší dle termínu odběru a genotypu a pohybuje se v rozmezí hodnot od -53 do $+15\text{ °C}$. Uvedené krajní hodnoty jsou spíše výjimečné a naprostá většina středních hodnot skelného přechodu se pohybuje v relativně úzkém intervalu -34 až -19 °C , přičemž délka teplotního intervalu skelného přechodu se pohybuje v rozmezí 10 až 14 $^{\circ}\text{C}$. U většiny měřených vzorků lze skelný přechod



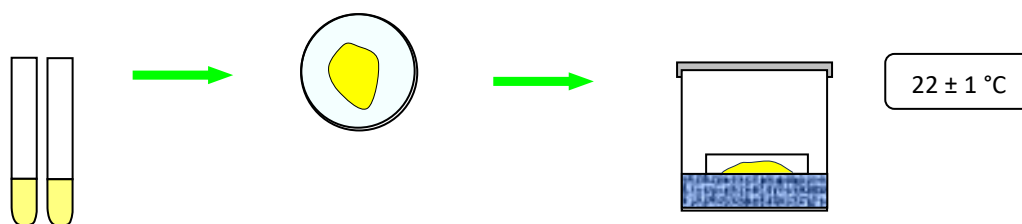
Obrázek 6. Příklady termogramů pylu a jejich hodnocení u vybraných genotypů chmele (A) `31/239`, `12/00`, `15/01`, `86/04`, `18/07`, `12/06` odebraných k analýze v roce 2019 a (B) genotypu `86/04` odebraného v letech 2020 a 2021 (B). Na každé křivce jsou vyznačeny (zleva doprava) teploty charakterizující počátek skelného přechodu, tzv. onset, střední hodnota definovaná jako střední výška efektu (H), dále tzv. endset a konec skelného přechodu.

proto očekávat v intervalu teplot od -30 až -25 °C. Střední hodnota skleného přechodu je obvykle při teplotě vyšší než -45 °C. Spíše výjimečně lze objevit skelný přechod při vyšší teplotě (+10 a +15 °C), což souvisí s vyšší mírou dehydratace vzorků pylu.

4) Stanovení obsahu vody v pylu

Obsah vody ve vzorcích je stanoven vážením u vzorků pylu, které se připravují pro měření termických vlastností pomocí DSC. Před měřením DSC se stanoví čerstvá hmotnost pylu, po měření se vzorky vloží do sušárny nastavené na teplotu 105 °C po dobu 1 týdne. Potom se vzorky přenesou do exikátoru s vysušeným silikagelem pro vytemperování vzorku a následně se provede zvážení sušiny vzorků. Z rozdílu hodnot hmotnosti čerstvého pylu a pylu vysušeného v sušárně se stanoví původní obsah vody ve vzorcích pylu. Obsah vody, který se vypočte na základě znalosti čerstvé hmotnosti pylu, sušiny pylu a stanoveného obsahu vody ve vzorcích, se pohybuje v rozmezí 0,1 až 0,3 g vody na 1 g sušiny.

V případě, že obsah vody ve vzorku je příliš vysoký, což se projeví přítomností exotermie spojené s krystalizací vody ve vzorcích při měření DSC, je nutné snížit obsah vody pomocí jejich vysušení např. nad dehydratovaným silikagelem (Obr. 7) po dobu několika desítek minut až několika hodin, v závislosti na počátečním obsahu vody. Pyl se pro dehydrataci přesype na Petriho misku pro zvýšení relativního povrchu a rychlejší a rovnoměrnější dehydrataci vzorků pylu. Po dehydrataci je nutné opakovat měření termických charakteristik pomocí DSC pro detekci exotermie nebo naopak skelného přechodu a následně stanovit obsah vody.

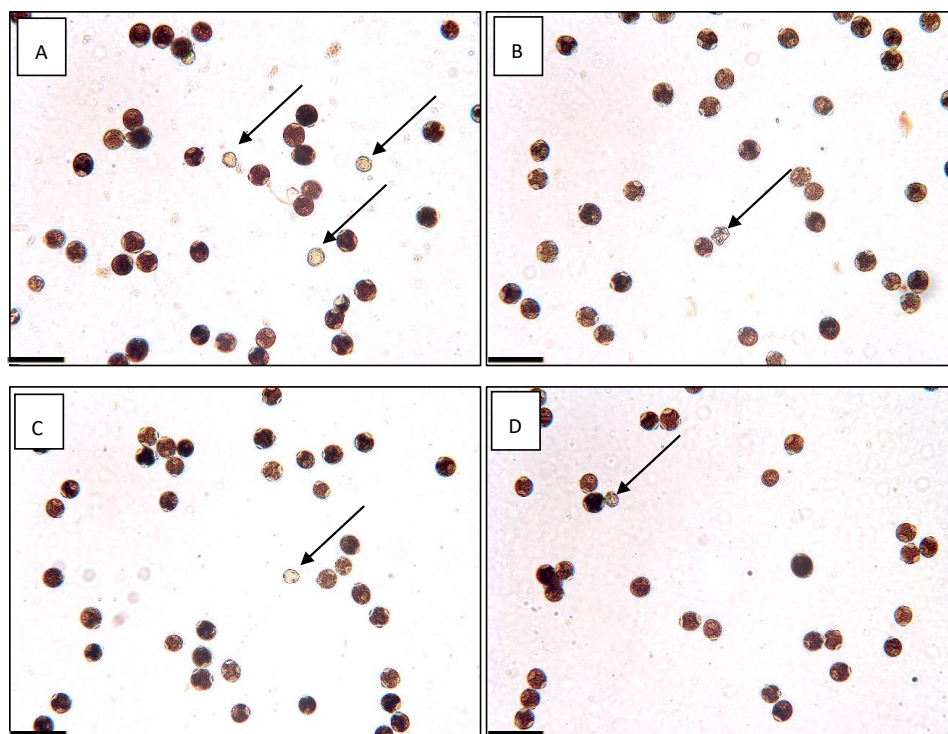


Obrázek 7. Dehydratace pylu nad silikagelem.

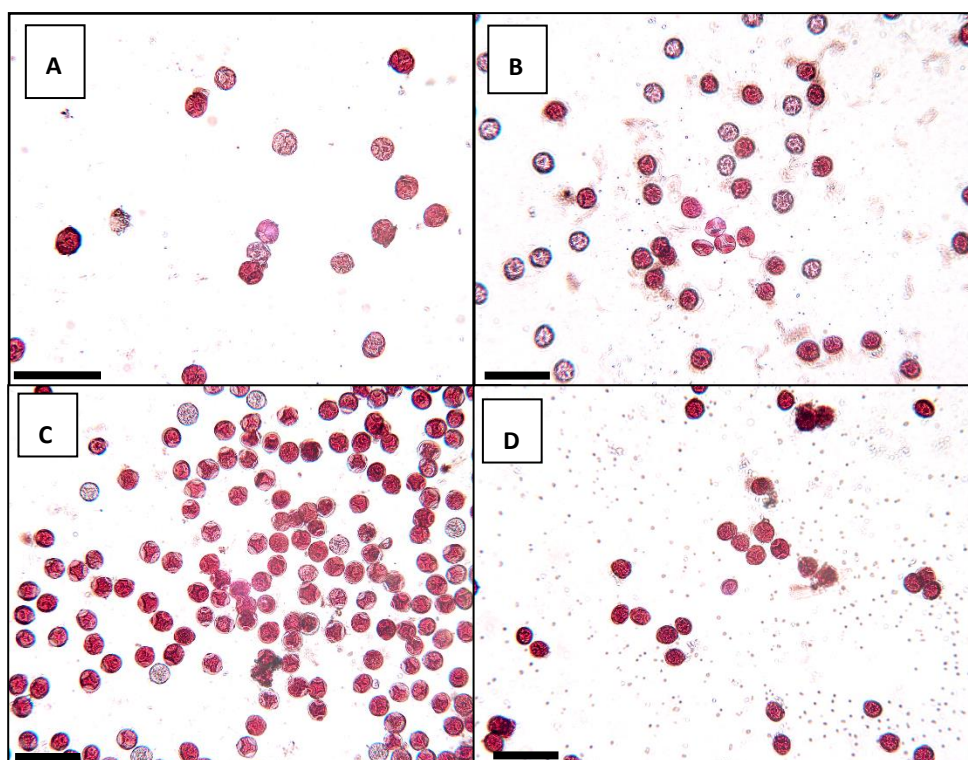
5) Hodnocení vitality pylu

Kontrola vitality pylu se provádí prostřednictvím tzv. vitálního barvení. Princip vitálního barvení je, že barvivo specificky barví pouze živá a vitální pylová zrna a v případě poškození pylu se intenzita barvení pylu snižuje a neživý pyl není obarven vůbec. V našich podmínkách se osvědčily dva způsoby vitálního barvení, a to s využitím Lugolova roztoku (Obr. 8) nebo Neutrál ní červeně (Obr. 9). Následně je vhodné provést pořízení mikroskopických snímků obarveného pylu pomocí digitální kamery a příslušného softwaru pro následné hodnocení vitality, protože není praktické počítat podíl vitálních či defektních zrn v živém obraze a také je vhodné pořízení záznamu hodnoceného materiálu pro účely záznamu. Následně je stanoven podíl defektních pylových zrn, které se vyznačují deformací povrchu pylu a absencí barvy použitého vitálního barviva. U čerstvých vzorků pylu chmele obvykle podíl defektních pylových zrn tvoří méně než 5 % z celkového počtu pylových zrn.

Vitalitu pylu lze hodnotit jak před jeho kryoprezervací, tak po kryoprezervaci; rovněž tak je možné kontrolovat vitalitu čerstvého pylu v případě krátkodobého skladování v chladničce před jeho aplikací při křížení. V případě dlouhodobého uchování pylu v nevhodných podmínkách vitalita pylu chmele klesá (Obr. 9). To je patrné i při pozorování změn fyzikálních vlastností pylu chmele – pyl hrudkovatí a mění barvu z jasně žluté do tmavších odstínů.



Obrázek 8. Mikroskopické snímky pylu chmele (A) 18/08, (B) P 57, (C) Sm21 H12 26/163, (D) 86/4 po obarvení pomocí Lugolova roztoku. Černé úsečky reprezentují 50 μm , černé šípky označují neobarvená a deformovaná zrna, představující poškození pylu a ztrátu životaschopnosti.



Obrázek 9. Mikroskopické snímky pylu chmele (A) genotyp P57 z roku 2022, který byl uchováván v exikátoru při pokojové teplotě, genotyp 86/4 z roku 2020 (B), stejný genotyp z roku 2021 (C) uchovávaný pomocí kryokonzervace v kapalném dusíku a čerstvý pyl genotypu 86/4 z roku 2023 (D). Černé úsečky reprezentují 50 μm , červeně vybarvená jsou plně životaschopná pylová zrna, světleji obarvená zrna značí snížení životaschopnosti, neobarvená a deformovaná zrna znamenají poškození pylu a ztrátu životaschopnosti.

C. UCHOVÁNÍ PYLU CHMELE V KAPALNÉM DUSÍKU

6) Kryoprezervace pylu

Vzorky pylu mohou být v podmínkách kryoprezervace uchovávány ve dvou typech nádob: v kryozkumavkách a ve stéblech. V případě chmele je obvykle k dispozici dostatečné množství pylu, a tak je poměrně efektivní uchování pylu v kryozkumavkách. Při výběru kryozkumavek je nutné dbát přísně na to, aby kryozkumavky 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. Těsnost kryozkumavek je zabezpečena obvykle přítomností silikonového těsnění. Vzhledem k tomu, že kryozkumavky obsahu vždy určité množství vzduchu, tak mají tendenci plavat na hladině kapalného dusíku. S tímto je nutné počítat při umísťování kryozkumavek do plastových krabiček, které jsou opatřeny pouze nízkými trny a nebrání zkumavkám k opuštění krabičky, pokud je přeplněna dusíkem.

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.

7) Odtání pylu a desikace vzorků

Odtání pylu probíhá vyjmutím kryozkumavek z kapalného dusíku a jejich umístěním do exikátoru s dehydratovaným silikagelem na dobu přibližně 60 minut, kdy dojde k ohřátí kryozkumavky a jejího obsahu na pokojovou teplotu. Tím se eliminuje riziko kondenzace vzdušné vlhkosti na površích a znehodnocení pylu. Pyl je dále uchováván v chladu v uzavřeném obalu až do jeho dalšího využití.

D. VYUŽITÍ PYLU PŘI KŘÍŽENÍ CHMELE

8) Opylování samičích rostlin chmele

Před tvorbou blizen (Obr. 10) je nutné část chmelové rostliny zaizolovat (Obr. 11), aby nedošlo k opylení nežádoucím pylem. Křížením chmele se rozumí záměrné opylení samičích rostlin pylem vybrané samčí rostliny. V době vytvoření blizen v izolátorech se pyl vnese do izolátoru. Optimální je tento proces 2x až 3x opakovat, přičemž izolátor je stále uzavřený až do doby vytvoření chmelových hlávek.

Po vytvoření chmelových hlávek, které po opylení obsahují semena, je izolát odstraněn (Obr. 12). Chmel je vysoce heterozygotní rostlina, proto potomstva vykazují širokou variabilitu. Ze semen jsou po ukončení jejich dormance na jaře následujícího roku ve skleníkových podmínkách vypěstovány mladé rostliny chmele. V potomstvech jsou vybírány nejlepší rostliny, které jsou namnoženy a hodnoceny.



Obrázek 10. Květ samičích rostlin ve fázi butonizace, před tvorbou blizen.



Obrázek 11. Izolace květenství samičích rostlin chmele použitých pro křížení.



Obrázek 12. Odstraňování izolátoru po dozrání opylených hlávek.

9) Hodnocení fertility pylu



Po vytvoření chmelových hlávek jsou izolátory odstraněny a chmelové hlávky se semeny jsou sklizeny ve fyziologické zralosti, tj. na přelomu září a října. Sklizené chmelové hlávky jsou sušeny přirozeným způsobem na suchém místě, aby se zamezilo poškození semen. Semena se ze suchých hlávek oddělí ručně a vyčistí (Obr. 13). Do výsevu na jaře následujícího roku jsou uchována v mrazicím boxu při teplotě -7°C .

Obrázek 13. Semena chmele vzniklá z křížení kryoprezervovaného pylu.

Fertilitu pylu hodnotíme na základě počtu získaných semen a jejich velikosti – hmotnosti tisíce semen (HTS) (Tab. 1). Je patrné, že kvalita semen získaných s využitím pylu po kryoprezervaci nezaostává ve srovnání se semeny získanými z čerstvého pylu. Rozdíl v počtu získaných semen může být ovlivněn i objemem pylu, který byl odtán z podmínek kryoprezervace.

Tabulka 1. Příklad hodnocení fertility pylu a úspěšného křížení po jeho kryoprezervaci ve srovnání s čerstvě sklizeným pylem.

♀	♂	Datum					Získaných semen ks	HTS (g)
		Zaizolování	1. opylení	2. opylení	Protržení izolace	Sklizeno		
5571	86/4 čerstvý r. 2022	1.8.	9.8.	12.8.	29.8.	10.10.	1027	3,3
5571	86/4 zmrazený r. 2022	2.8.	9.8.	12.8.	29.8.	10.10.	76	3,16
5571	86/4 zmrazený r. 2021	31.7.	9.8.	12.8.	29.8.	10.10.	9	3,33
5571	86/4 zmrazený r. 2020	1.8.	9.8.	-	29.8.	10.10.	7	4,29

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 přináší aktuální poznatky výzkumu, čímž lépe a přesněji definuje hodnocení pylu chmele před jeho kryoprezervací. Umožňuje tak mnohem lépe a operativněji pracovat s genetickými zdroji při šlechtění chmele. Kromě vyšší operativnosti při křížení odrůd chmele s odlišnou dobou kvetení je třeba poukázat i na vyšší jistotu a lepší plánování šlechtitelského procesu, 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 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. Termická analýza může odhalit přítomnost a teplotu fázového přechodu klíčového pro úspěšnou kryoprezervaci, a to skelného přechodu. Skelný stav je důkazem dosažení optimálních podmínek pro dlouhodobé bezpečné skladování pylu v kapalném dusíku. Teplota skelného přechodu pak definuje teplotu, při které lze pyl bezpečně uchovávat, aniž by došlo k jeho poškození.

IV POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Uživatelé metodiky kryokonzevace je Svaz pěstitelů chmele České republiky, který sdružuje pěstitelé a šlechtitele chmele v České republice. Tato nová metodika umožní efektivnější využití genetických zdrojů chmele využívaných při šlechtění nových odrůd. Výhodou je především omezení ročníkové variability v produkci pylu chmele u některých odrůd a také překonání bariéry ve šlechtění při využití rodičů s rozdílnou dobou kvetení. Nová metodika umožní bezpečnější způsob uchování pylu chmele za přesně definovaných podmínek, bez rizika jakýchkoliv změn v uchovávaném materiálu včetně stárnutí a ztráty životnosti. Metodika může být využita i na zahraničních pracovištích, které se zabývají obdobnou problematikou (Reed 2001, Reed *et al.* 2003, Ellis a Jenderek 2008) v USA.

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 chmele 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 – měřící 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 na rok, v závislosti na množství uchovávaného materiálu.

Ekonomický přínos pro uživatele

Ekonomické aspekty této metodiky souvisí především s tím, že není nutné každoročně pěstovat otcovské genotypy chmele pro potřeby křížení, čímž dojde k úspoře, která souvisí se zakládáním kultur a kultivací otcovských genotypů chmele včetně příslušných agrotechnických zásahů. S využitím této metodiky je možné v jednom roce napěstovat otcovské rostliny, sklídit veškerý pyl a po kontrole jeho kvality jej uložit do kapalného dusíku. V případě potřeby lze odtát ve vhodném termínu jen potřebné množství pylu vybraného genotypu a tento postup lze opakovat dle potřeby v různých letech až do spotřebování celého objemu skladovaného pylu od příslušného genotypu. Ten je pak nezbytné opět vysadit pro sklizeň a uložení do kapalného dusíku. Lze odhadnout, že 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, jsou náklady na jejich uchování přibližně v úrovni 50 % s jejich kultivací v polních podmínkách.

VI SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Benson E.E., 2008, Cryopreservation Theory. In: Reed B.M. (eds) Plant Cryopreservation: A Practical Guide. Springer, New York, NY
- Day J.G., Harding K.C., Nadarajan J., Benson E.E., 2008, Cryopreservation. In: Walker J.M., Rapley R. (eds) Molecular Biomethods Handbook. Humana PressMurashige T., Skoog F. A., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473–497
- Ellis D. D., Jenderek M. M., 2008, Operational cryopreservation of multi-genera plant genetic resources collections at the National Center for Genetic Resources Preservation, In: Proceeding “Joint Meeting of Working Group 1 and 2, COST871”, 20th-23rd of February 2008, Oulu, Finland, s. 8-9.
- Reed B. M., 2001, Implementing cryogenic storage of clonally propagated plants, *CryoLetters* 22, s. 97-104.
- Reed B. M., Okut N., D'Achino J., Narver L., Denoma J., 2003, Cold Storage and Cryopreservation of Hops (*Humulus L.*) Shoot Cultures Through Application of Standard Protocols, *Cryoletters* 24, s. 389-396.

VII SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- Faltus M., Svoboda P., Bilavčík A., Zámečník J. Metoda kryoprezervace pro uchování genetických zdrojů chmele. *Úroda*. 2018, 66. (12 vědecká příloha), 127-130. ISSN 0139-6013.
- 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 chmele a bramboru. *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:

doc. Ing. František Hnilička, Ph.D., Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, ČZU, Kamýcká 129, 165 00 Praha 6 - Suchbát

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 chmele

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Autoři (podíl na práci): Ing. Miloš Faltus, Ph.D. (35 %)
RNDr. Alois Bilavčík, Ph.D. (15 %)
Ing. Petr Svoboda, Ph.D. (25 %)
Ing. Vladimír Nesvadba, Ph.D. (15 %)
Ing. Jiří Zámečník, CSc. (10 %)

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
svoboda@chizatec.cz
bilavcik@vurv.cz
nesvadba@chizatec.cz
zamecnik@vurv.cz

Autor fotografií: Miloš Faltus (mikroskopie), Petr Svoboda (ostatní)

