

# Kryoprezervace a uchování genetických zdrojů



---

definice  
metody  
použití



# Uchování genetických zdrojů

Ztráta genetických zdrojů je nenahraditelná.

- **původní rostlinné druhy** - výskyt v přirozených ekosystémech - jejich ohrožení je určeno podle míry ohrožení těchto ekosystémů.
- **vyšlechtěné kultivary** - udržovací šlechtění je pracné a nákladné



# Uchování genetických zdrojů

- **Uchování semen** = nejběžnější a nejstarší metoda
- **Vegetativní orgány** - hlízy, kořeny, cibule, řízky



# Uchování genetických zdrojů:

## A. semena

Uchování semen klasicky = při normální teplotě  
(max. 1 - 5 let)

Semenné banky = uchování semen na delší dobu  
(při - 20°C)

ortodoxní semena - přežívají snížení obsahu vody  
na 5-10%

rekalcitrantní semena - dehydratace nesmí  
klesnout pod limit 12-30% → nelze  
skladovat pod 0°C, tropické druhy pod 10°C

(kávovník, kakaovník, kokosová palma, kaučukovník,  
z našich: dub, buk, jírovec, kaštanovník)



# Uchování genetických zdrojů:

## B. vegetativní orgány

uchovávání vegetativních orgánů

(hlízy, kořeny, cibule, řízky - brambory, česnek, réva, batáty, banánovník, )

**rizika:**

- choroby (houbové, virózy)
- škůdci
- nepříznivé podmínky (teplota, vlhkost...)
- pracné a nákladné (prostory, manipulace)



# **Genové banky *in vitro***

- **uchování aktivně rostoucích kultur**
- **uchování kultur v minimálním růstu**
- **kryoprezervace**





# Uchování aktivně rostoucích kultur

- pracné - pasáže: dny, týdny, měsíc
- nákladné (energie, prostory)
- nebezpečí infekce
- nebezpečí somaklonální variability

představují paralelu ke klasické polní bance



hledaly se podmínky pro prodloužení  
subkultivačního intervalu



# Uchování kultur v minimálním růstu

- metody založené na kultivaci při snížené teplotě

rostliny z mírného pásma: 20 - 25°C    4 - 10°C

rostliny z tropů:            25 - 30°C            15 - 20°C

- metody založené na modifikaci složení kultivačního média - snížení koncentrace solí (MS1/2 - MS1/4),  
přídavek osmotika - 3% manitol, 5% sacharóza, ABA
- metody založené na modifikaci plynného složení atmosféry v kultivačních nádobách





# Uchování kultur v minimálním růstu

## Výhody:

možnost vizuální kontroly

testování na patogeny - možnost mezinárodní výměny

menší nároky na prostor ( $2\text{m}^2 \times 1 \text{ ha}$ )

## Problémy:

stres může mít vliv na regenerační schopnost

může být ovlivněna genetická stabilita - nutnost kontrol

(kritéria morfologická, cytologická, biochemická, molekulárně-biologická=DNA)

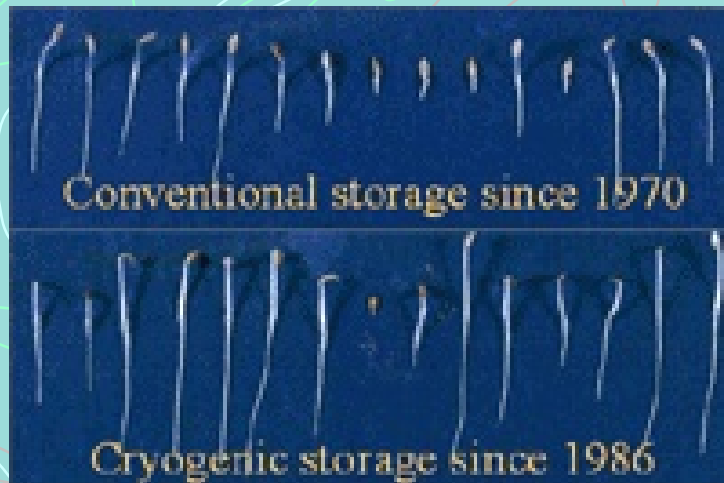
*Solanum, Medicago, Fragaria, Prunus, Malus, Beta*



## Definice kryoprezervace

- uchování materiálu při nízkých teplotách, nejčastěji v tekutém dusíku ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) (P. Debergh)
- neletální skladování pletiv nebo tkání při ultra nízkých teplotách (E. E. Benson)

# Kryoprezervace semen



testování klíčivosti  
skladovaných semen



# Cíl kryoprezervace

uchování rostlinného materiálu po delší dobu  
za účelem

- minimalizace růstu a vývoje *in vitro*
- uchování životaschopnosti a genetické stability
- zachování plného vývojového a funkčního potenciálu
- šetření pracnosti



# Mechanismy kryo-poškození

- tvorba ledu
  - **extracelulární** - začíná dříve
  - **intracelulární** (nukleace) - velké ledové krystaly poškozují struktury organel = snaha o zmenšení velikosti krystalů ledu
- vlivy poškození různými roztoky



# Přístupy ke kryoprezervaci

- **tradiční** = aplikace chemických kryoprotektiv a **kontrolované, pomalé** zmrazování  
0,5 - 1°C/ min  
(vyžaduje speciální přístroje)
- **novější** = **rychlé** zmrazování  
vitrifikace  
enkapsulace/dehydratace  
(relativně dostupnější)



# Možnosti kryoprotekce rostlinného materiálu





# Chemická kryoprotektiva

- **penetrující** - ovlivňují biochemické a strukturální vlastnosti membrán, a tak zvyšují toleranci k mrazu (**DMSO**, glycerol, etylenglykol, prolin)
- **nepenetrující** - mají vliv většinou jako osmoticky dehydratační (**sacharóza**, manitol, sorbitol, **PVP**)

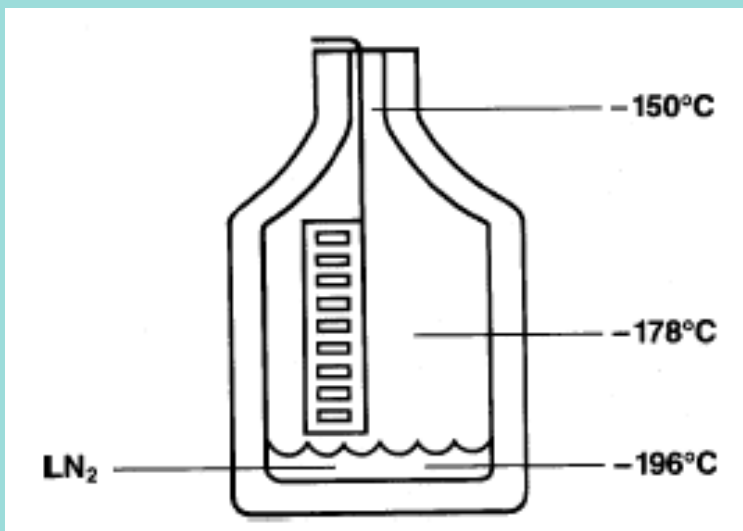


# Pomalé kontrolované zmrazování

- aplikace chemických kryoprotektiv
- **postupné kontrolované** ochlazování pod bod mrazu (**-30 až -60°C**), pak vložení do tekutého dusíku
  - pomalé ochlazování zvyšuje dehydrataci buněk, což snižuje bod mrznutí
  - po zkoncentrování buněčných roztoků pomalým ochlazováním může být zbývající voda **vitřifikována** rychlým zmrazením
- zpětné rozmrazování má být co nejrychlejší



kryozkumavka



Ukládání vzorků do tekutého N<sub>2</sub>





# Přístroj Kryo10 pro klasickou kryoprezervaci

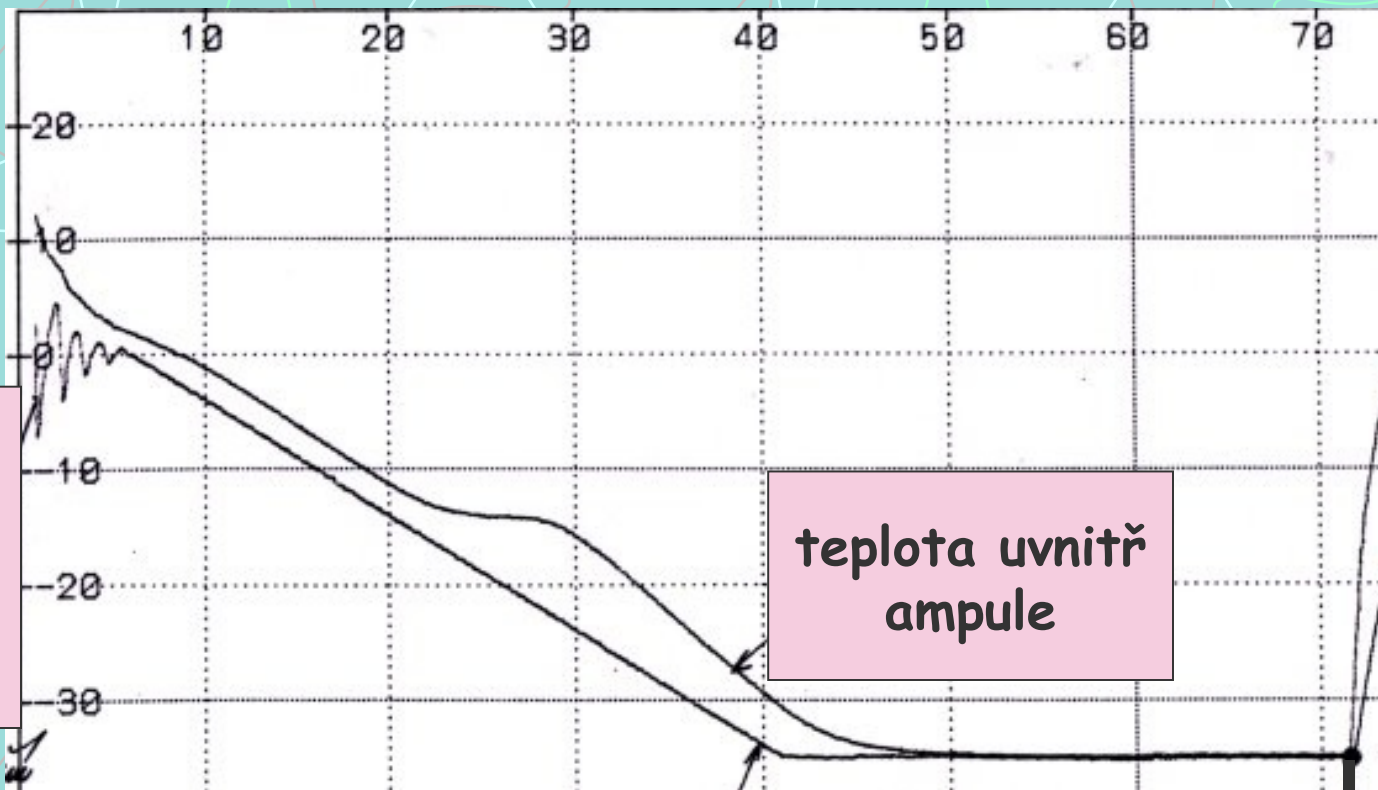


kontrolované pomalé zmrazování v kryozkumavkách

# Průběh zmrazování vzorků kalusu

t/min/

T/°C/



netěsnosti ventilu při napouštění  $N_2$

teplota uvnitř ampule

teplota uvnitř chlazeného prostoru

ampule do  $N_2$





# Vitrifikace

- proces **velmi rychlého zmrazení**, při kterém je zabráněno tvorbě ledových krystalů, protože vodný roztok je příliš koncentrovaný - zabránění nukleace ledových krystalů
- voda tuhne do tzv. **sklovitého** amorfního tvaru
- negativně může působit na životaschopnost materiálu vysoká koncentrace kryoprotektiv, která je nutná pro navození vitrifikace
- = nestabilní stav - může vést k tvorbě krystalů při zahřívání

# Postup: „Enkapsulace / dehydratace“

kultura prýtů

**otučení** materiálu - zvýšená osmotická hodnota  
média, snížená teplota kultivace

**izolace** meristémů

**enkapsulace:** přenos do 3% alginátu

nasátí alginátu s meristémem do špičky pipety

nakapání alginátu do 0,1 M roztoku  $\text{CaCl}_2$

polymerace alginátu 30 min.

**dehydratace:**

osmotická (0,75M sacharóza) 1 - 5 dní

osušení ve sterilním vzduchu flow-boxu 1 - 4 hod

přenos vysušených kuliček do kryozkumavky

**rychlé zmražení** - vhození do  $\text{N}_2$

Alginátové perly s vyrůstajícími prýty brambor  
(*Solanum tuberosum*) z enkapsulovaných meristémů



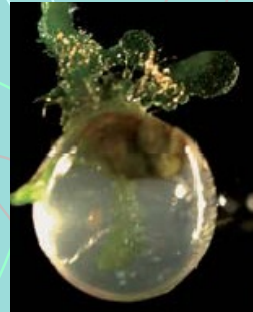
# Uchování genetických zdrojů révy



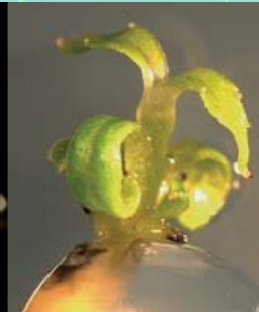
- krátkodobé skladování dospělých v zimě odebíraných řízků  
řízky rašily po 1.5 roce skladování při  $-3^{\circ}\text{C}$
- hodnocení tolerance kryoexpozice meristémů vybraných linií z axenických kultur
- vývoj metod pro dlouhodobé uchování genetických zdrojů révy



# Používání metody kryoprezervace v Kew



*Lepisorus longifolia*



*Medusagyne oppositifolia,*



*Paralophia epiphytica*



*Pteris adscensionis*



## Příklady využití kryoprezervace meristémů

Německá sbírka mikroorganismů a buněčných kultur (DSMZ, Braunschweig, Německo) - meristémy 519 starých kultivarů brambor - metoda mrazení perel

International Potato Centre (CIP, Lima, Peru) - 345 kultivarů brambor - vitrifikace

K.U. Leuven, Belgie - 306 kultivarů banánu (1/4 ze světového počtu kultivarů) - vitrifikace

kasava, česnek, máta a australské ohrožené druhy





# Příklady odkazů

dnes již vyžadují heslo

<http://scieng.abertay.ac.uk/plant/genebanking.htm>

[http://www.ars-grin.gov/ncgrp/volk\\_lab.htm](http://www.ars-grin.gov/ncgrp/volk_lab.htm)

on-line kurz kryoprezervace

[http://www.ucalgary.ca/~kmuldrew/cryo\\_course/course\\_outline.html](http://www.ucalgary.ca/~kmuldrew/cryo_course/course_outline.html)

manuál firmy Nalgene

<http://www.nalgenelabware.com/techdata/Technical/cryo.pdf>