

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)

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°C) (P. Debergh)
- neletální skladování pletiv nebo tkání při ultra nízkých teplotách (E. E. Benson)



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, prolin)
- **nepenetrující** - mají vliv většinou jako osmoticky dehydratační (**sacharóza**, manitol, sorbitol)



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



Protocol:

For successful cryopreservation the material must be cooled slowly to ca -30 to -60°C , before transfer to liquid nitrogen. This slow cooling gives rise to cellular dehydration which progressively concentrates the cellular constituents and depresses their freezing point. Once cell solutions have been concentrated by slow cooling, remaining water can be vitrified by freezing the plant material as rapidly as possible. In some cases small plant material can be transferred immediately to minus 196°C without damaging the plant tissue.

Thawing usually is most successful when it happens rapidly.



kryozkumavka



Ukládání vzorků do tekutého N_2



Přístroj Kryo10 pro klasickou kryoprezervaci

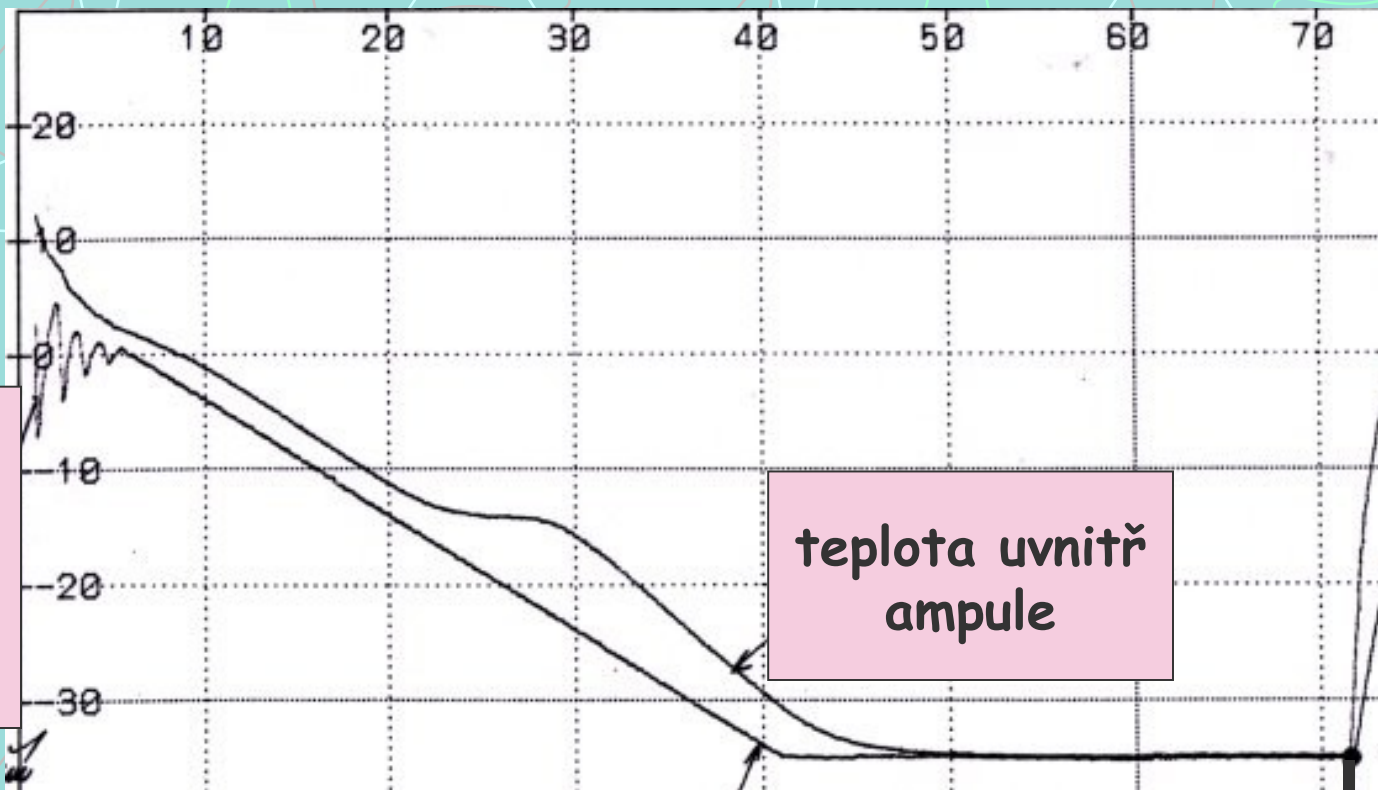


kontrolované pomalé zmrazování v kryozkumavkách

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 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 N_2

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





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

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

<http://www.ars.usda.gov/Main/docs.htm?docid=8100>

http://www.ars-grin.gov/ncgrp/volk_lab.htm