

# Kryoprezervace a uchování genetických zdrojů 12.

definice, metody, použití

Jaroslava Dubová



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

# Uchování genetických zdrojů

ztráta genetických zdrojů je nenahraditelná

uchováváme:

- **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
- **uchování vegetativních orgánů** - hlízy, kořeny, cibule, řízky (rizika akumulace virů a jiných patogenů)

# 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%

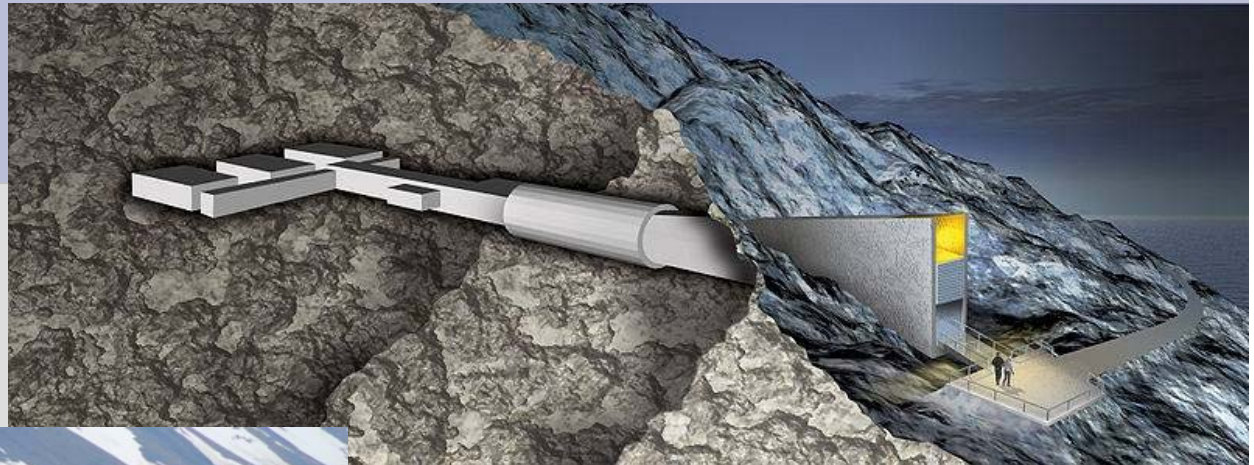
rekalcitrantní semena - dehydratace nesmí  
klesnout pod limit 12 -30% → nelze  
skladovat pod 0°C, tropické druhy pod 10°C

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

# Semenná banka v Botanické zahradě v KEW



# Semenná banka na Špicberkách



# 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*

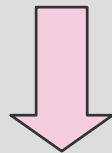
- uchování aktivně rostoucích kultur
- uchování kultur v minimálním růstu
- kryoprezervace



## 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 (2m<sup>2</sup> x 1 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)

# 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 a nákladů

# 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**)

# Krátkodobé skladování dospělých řízků révy

## *Vitis vinifera*

- odebírání řízků v zimě
- skladování při  $-3^{\circ}\text{C}$  = řízky rašily až po 1,5 roce
- hodnocení tolerance kryoexpozice meristémů vybraných linií z axenických kultur
- vývoj metod pro dlouhodobé uchování genetických zdrojů révy

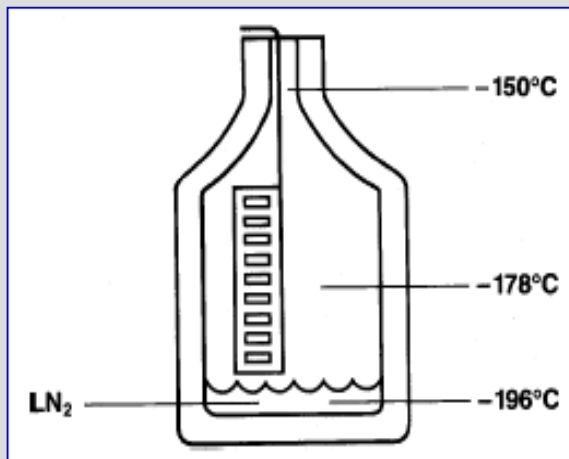


# Pomalé kontrolované zmrazování

- 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



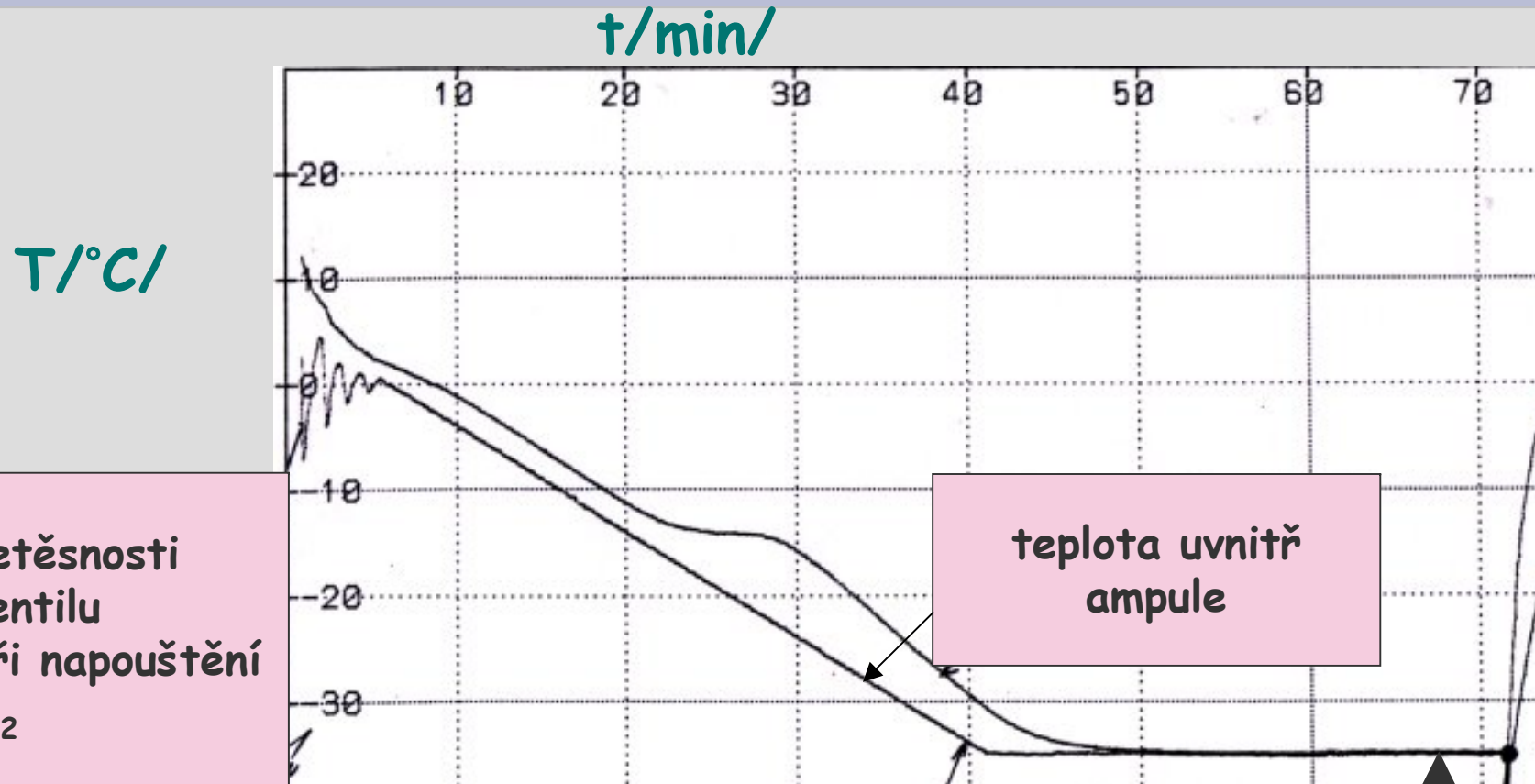
ukládání vzorků do tekutého N<sub>2</sub>

# Přístroj Kryo10 pro klasickou kryoprezervaci



kontrolované pomalé zmrazování v kryozkumavkách

# Průběh zmrazování vzorků kalusu



netěsnosti ventilu při napouštění  $\text{N}_2$

teplota uvnitř ampule

teplota uvnitř chlazeného prostoru

ampule do  $\text{N}_2$

# 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
- **vitrifikace = nestabilní stav** - může vést k tvorbě krystalů při zahřívání

# Postup: „Enkapsulace / dehydratace“

kultura prýtů

**otužení** 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



## Příklady využití kryoprezervace meristémů

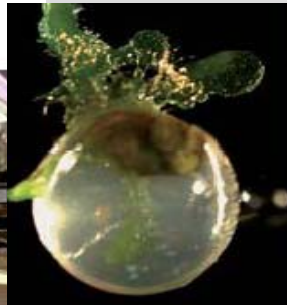
Německá sbírka mikroorganismů a buněčných kultur (DSMZ, Braunschweig, Německo) - meristémy 519 starých kultivarů brambor - metoda mrazení perel

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

# Používání metody kryoprezervace v Kew



*Lepisorus  
longifolia*



*Medusagyne  
oppositifolia*



*Paralophia  
epiphytica*



*Pteris  
adscension*

[http://www.kew.org/ksheets/pdfs/K31\\_cryopreservation.pdf](http://www.kew.org/ksheets/pdfs/K31_cryopreservation.pdf)

## 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](http://www.ars-grin.gov/ncgrp/volk_lab.htm)

[http://www.kew.org/ksheets/pdfs/K31\\_cryopreservation.pdf](http://www.kew.org/ksheets/pdfs/K31_cryopreservation.pdf)

**historie semenné banky na Svalbardu:**

<http://www.regjeringen.no/en/dep/lmd/campaign/svalbard-global-seed-vault/history.html?id=489075>