

Rada genetických zdrojů kulturních rostlin

Výzkumný ústav rostlinné výroby Praha – Ruzyně



**Konzervace a regenerace genetických zdrojů
vegetativně množených druhů rostlin
a
Dostupnost a využívání genetických zdrojů
rostlin a podpora biodiversity**

Vydal: Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha 6 - Ruzyně
Druh publikace: Sborník referátů
Autor: Kolektiv autorů
Editor: Iva Faberová
Tisk: Power Print, Praha 6 - Suchbát
Náklad: 300 kusů
Publikace neprošla jazykovou úpravou
Publikace vznikla za podpory Národního programu MZe č.j. 33 083/03-3000

ISBN 80-86555-71-2



Praha, srpen 2005

Výzkumný ústav rostlinné výroby Praha – Ruzyně
Rada genetických zdrojů rostlin



Sborník referátů ze seminářů

**Konzervace a regenerace genetických zdrojů vegetativně
množených druhů rostlin
a
Dostupnost a využívání genetických zdrojů rostlin a
podpora biodiversity**

26. listopadu 2003, CHI s.r.o. Žatec

a

24. listopadu 2004, OSEVA PRO s.r.o. VST Zubří



© Výzkumný ústav rostlinné výroby Praha-Ruzyně
„Genetické zdroje č. 92“, VÚRV Praha 2005
Editor: Iva Faberová

ISBN 80-86555-71-2

Obsah

Seminář 26. listopadu 2003, Chmelařský institut Žatec s.r.o.

Konzervace a regenerace genetických zdrojů vegetativně množených druhů rostlin

	Str.
Ladislav Dotlačil: Konzervace a regenerace genetických zdrojů vegetativně množených druhů rostlin - současné problémy a přístupy k jejich řešení	5
Boris Krška: Polní kolekce meruněk – jejich konzervace, hodnocení a využití ve šlechtění	12
Vendulka Horáčková, Jaroslava Domkářová: Využití <i>in vitro</i> kultur pro účely konzervace genofondu bramboru	20
Alois Bilavčík, Miloš Faltus, Jiří Zámečník: Teoretické základy uchování rostlin a jejich částí v ultranízkých teplotách	28
Miloš Faltus, Jiří Zámečník, Alois Bilavčík: Metody kryoprezervace	35
Jiří Zámečník, Alois Bilavčík, Miloš Faltus a Vladimír Skládal: Provoz kryobanky	41
Miloš Faltus, Petr Svoboda: Možnosti kryokonzervace genofondu chmele	46
Alois Bilavčík, Jiří Zámečník, František Paprštejn, Jiří Sedlák: Možnosti kryokonzervace ovocných dřevin	52
Miloš Faltus, Jaroslava Domkářová: Metody a perspektivy konzervace kolekce bramboru	58
Jiří Zámečník, Helena Stavělíková: Možnosti kryokonzervace zelenin rodu <i>Allium</i>	64
Magdalena Ševčíková, Šárka Kramolišová: Konzervace genetických zdrojů vegetativně množených okrasných travin	70

Dostupnost a využívání genetických zdrojů rostlin a podpora biodiversity

Téma I:

Využití biodiversity na podporu setrvalého rozvoje zemědělství a tvorbu krajiny

Pavel Šrámek, Magdalena Ševčíková: Využití genofondu trav v lučních porostech neprodukčního charakteru	75
Jan Pelikán, Tomáš Vymyslický, Pavlína Gottwaldová, Jan Nedělník: Možnosti využití druhů čeledi <i>Fabaceae</i> při setrvalém rozvoji zemědělství a tvorbě krajiny ..	82
Vojtěch Benetka: Konzervace domácího druhu <i>Populus nigra</i> L. ssp. <i>nigra</i> v podmínkách <i>in situ</i> a jeho další využití ve šlechtění a krajině	89
Vojtěch Holubec a František Paprštejn: Možnosti uplatnění <i>in situ</i> a <i>on farm</i> konzervace v ČR	92
Radoslav Vlk: Pěstování tradičních kulturních rostlin ve Valašském muzeu v přírodě v Rožnově pod Radhoštěm	97
Ivana Jongepierová, Jonathan Mitchley, Pavel Šrámek, Magdalena Ševčíková: Obnova biodiverzity lučních porostů v CHKO Bílé Karpaty	102
Tomáš Vymyslický, Jan Pelikán, Pavlína Gottwaldová, Jan Nedělník: Sběrové expedice – cílené sběry za účelem uchování biodiverzity krajových forem kulturních rostlin a příbuzných planých druhů	108

Téma II:

Dostupnost genetických zdrojů a informací a jejich hodnota pro uživatele; sdílení prospěchu z využívání genetických zdrojů

Ladislav Dotlačil, Zdeněk Stehno, Iva Faberová: Zhodnocení potřeby budování kapacit: Přístup ke genetickým zdrojům a sdílení prospěchu z jejich využití, konzervace a setrvalé využívání biodiversity významné pro zemědělství, lesnictví a výzkum - Česká republika	112
Iva Faberová, Ladislav Dotlačil, Zdeněk Stehno: Pilotní projekt FAO "Národní mechanismus pro sdílení informací o implementaci Globálního plánu akcí pro konzervaci a setrvalé využívání genetických zdrojů rostlin pro výživu a zemědělství"	116
Ladislav Dotlačil, Zdeněk Stehno, Iva Faberová: Dohoda o poskytování genetických zdrojů rostlin (Material Transfer Agreement - MTA)	121

Konzervace a regenerace genetických zdrojů vegetativně množených druhů rostlin – současné problémy a přístupy k jejich řešení

Ladislav Dotlačil

Výzkumný ústav rostlinné výroby Praha 6 - Ruzyně

Souhrn

Konzervace genetických zdrojů je strukturovaným problémem, optimální řešení je nutné hledat pro konkrétní cíle konzervace, různé druhy konzervovaných materiálů i s ohledem na technické možnosti. Důležitým kritériem však vždy zůstává bezpečnost konzervovaných genetických zdrojů. V příspěvku jsou porovnávány metody „in situ“ a „ex situ“ konzervace, jejich výhody, možnosti uplatnění i některá omezení. V ČR je uchováváno téměř 48 tisíc genetických zdrojů, z toho však 11,6% položek vyžaduje regeneraci. V kolekcích převládají generativně množené druhy (38,8 tis. položek, tj. 82,4 % všech položek; 89,5 % těchto zdrojů je dlouhodobě uloženo v genové bance, 10,5 % je stále ještě potřeba regenerovat a předat do genové banky). U vegetativně množených druhů (8,6 tis. položek) převládá konzervace v polních kolekcích (6,4 tis. položek), následuje uchování „in vitro“ (2,1 tis. položek). Od roku 2003 rozvíjí činnost kryobanka, kde je dosud uloženo přes 100 vzorků od 7 vegetativně množených druhů.

Klíčová slova: genetické zdroje rostlin, konzervace, stav v České republice

Summary

Conservation of plant genetic resources is a structured task and optimal solutions have to be searched for particular goals of conservation, with respect to different species as well as to available technical facilities. In general, security of plant genetic resources maintained is the principal criterion of conservation. Methods of „in situ“ and „ex situ“ conservation are further discussed with respect to their advantages, possible applications and limitations. There are maintained almost 48 thousands of genetic resources in Czech Republic, but 11.6 % of them needs regeneration. Seed – propagated species are prevailing (38.8 th., that is 82.4 % of all accessions; 89.5 % of these seed accessions are under long-term storage in the Gene Bank, remaining 10.5 % will have to be regenerated and placed to the storage). In vegetatively propagated species, (8.6 th. accessions) conservation in field collections is prevailing (6.4 th. accessions) followed by „in vitro“ storage (2.1 th. accessions). Cryo Bank operates since 2003 and conserves over 100 accessions of 7 species.

Key words: Plant Genetic Resources; conservatio; methods; status in Czech Republic

Konzervací genetických zdrojů rostlin se obecně rozumí uchování semen, rostlin či jejich částí v živém stavu a schopných reprodukce, při zachování jejich původního genetického základu, vyloučení genetických změn a maximálním vyloučení rizik, která by mohla vést k poškození či ztrátě životnosti uchovávaných genetických zdrojů a/nebo k nežádoucím genetickým změnám (v případě „in situ“ konzervace k evolučním změnám dochází), genetické erozi a ke zúžení genetického základu u populací. Deklarované standardy a používané technologie konzervace se ovšem liší podle charakteru konzervace (krátkodobá, střednědobá a dlouhodobá), způsobu reprodukce druhů (cizosprašné a samosprašné, vegetativně množené) biologických vlastností (jednoleté a víceleté) atd. To vše je potřebné posoudit i s ohledem na finanční a pracovní náročnost, technologickou vybavenost a míru vnitřních i vnějších rizik (např. choroby a škůdci).

Konzervace genetických zdrojů rostlin je tedy strukturovaný problém, který nemá univerzální řešení. Různá optimální řešení musí být hledána pro různé cíle konzervace, pro rostlinné druhy často velmi odlišné svými nároky a reprodukční biologií, pro odlišnou filozofii konzervace (statická a dynamická), pro různou technologickou úroveň pracovišť a přijatelné pracovní a celkové finanční nároky.

Jak již bylo zmíněno, cílem konzervace genofondů je především bezpečné uchování genetických zdrojů. V praktických podmínkách k tomu zpravidla přistupuje požadavek na konzervaci určitého rozsahu materiálů, což je předpoklad pro předávání vzorků genetických zdrojů uživatelům a tedy i vytváření prospěchu z jejich využívání. Vyčerpání zásoby vzorků genetických zdrojů v genové bance je proto, vedle poklesu životnosti uchovávaných genetických zdrojů v průběhu konzervace, častou praktickou příčinou, proč genetický zdroj namnožit a stanovený objem nově získaných materiálů opět konzervovat. Pokud nezískáme dostatečné množství kvalitních genetických zdrojů pro konzervaci přímo od dárce, je regenerace ve většině případů nezbytným krokem, který konzervaci předchází. Každá regenerace však vytváří jisté potenciální riziko poškození genetického zdroje (např. zúžení genetického základu u populací a víceliniových odrůd, riziko infekce genetických zdrojů chorobami přenosnými semenem nebo částmi rostlin u vegetativně množených druhů, nežádoucí cizosprašení, klimatické extrémy a technické poruchy, lidské chyby). Pro zajištění kvalitní a efektivní konzervace genetických zdrojů je proto zpravidla nezbytné věnovat regeneraci mimořádnou pozornost a regenerační cykly omezit na co nejdelší intervaly. Zásady a postupy regenerace jednotlivých druhů (skupin druhů) a závazné standardy regenerace jsou uvedeny v metodice Národního programu. Účelné je také použít strategii dlouhodobé a zvláště kvalitně uchovávané rezervy (základní popř. bezpečnostní kolekce u semenných druhů, kryokonzervace), ke které je možné se vrátit po několika přesevech z aktivní kolekce. Potřeba regenerací je proto také jedním z indikátorů úrovně zabezpečení národních kolekcí.

Tab. 1 Přehled regenerací GZ v roce 2004 podle pracovišť Národního programu

Ústav	Celkový počet položek vyžadujících regeneraci*	Počet položek genetických zdrojů					
		Regenerováno v roce 2004				Převédeno do genové banky VÚRV Praha v roce 2004	Položky semenných GZ dosud uchovávaných jen na pracovišti ♦♦
		semenné druhy		Vegetativně množené druhy			
		Vyseto	Sklizeno	Vysazeno	Uchováno		
VÚRV Praha	468	522	438	20	20	685	
ZVÚ Kroměříž	223	166	151	0	0	44	
AGRITEC Šumperk	24	1486	1483	0	0	0	
VÚB Havlíčkův Brod		0	0	2018	2018	0	0
CHI Žatec celkem	15	0	0	15	0	0	0
VÚRV Olomouc	2547	688	674	738	372	589	1621
VŠÚO Holovousy	255	0	0	196	196	0	0
VÚKOZ Průhonice	268	17	18	450	47	14	0
VÚP Troubsko	878	357	143	0	0	66	1238
OSEVA VST Zubří	388	86	76	76	129	45	1613
OSEVA VÚO Opava	154	176	103	0	0	86	20
VÚRV VSV Karlštejn	0	0	0	24	24	0	0
MZLU Lednice	230	14	10	188	151	10	14
AMPELOS Znojmo	15	0	0	25	25	0	0
Celkem	5465	3512	3096	3750	2982	1539	4922

♦♦ Včetně materiálů dosud nezařazených do kolekce (např. sběry)

Podle údajů z prosince 2004 vyžadovalo k tomuto datu v České republice z různých důvodů regeneraci 5 465 položek v kolekcích (tj. 11,6 % z celkového rozsahu kolekcí) a je

tedy stále aktuální věnovat tomuto problému prioritní pozornost. V roce 2004 bylo regenerováno celkem 3 512 položek semeny množených genetických zdrojů a od 3 096 množených GZ bylo získáno osivo; z toho bylo 1 539 semenných vzorků předáno do genové banky ve VÚRV Praha. Z 3 750 regenerovaných vegetativně množených položek bylo zachováno 2 982 regenerovaných genetických zdrojů. Tabulka 1. ukazuje rozsahy regenerací na jednotlivých pracovištích a dokumentuje značné úsilí, které bylo regeneracím genofondů věnováno. Přes dosažený pokrok musí regenerace kolekcí zůstat prioritou Národního programu ještě po několik příštích let.

Základním je rozdělením metod konzervace na metody „*ex situ*“ a „*in situ*“. Metody konzervace „*in situ*“ jsou rozhodujícími metodami konzervace planých druhů rostlin v přírodě; jejich hlavní a specifikou výhodou je, že chráněné druhy (ekotypy, genetické zdroje) se dále vyvíjejí jako součást ekosystému, ve kterém existují. Tento způsob konzervace je tedy dynamický a umožňuje chráněným genetickým zdrojům další evoluci, tedy i genetické změny konzervovaných materiálů. „*In situ*“ konzervace je doporučována a využívána u některých genetických zdrojů zemědělských plodin (např. u planých příbuzných druhů, ekotypů či primitivních forem, které rostou v původních areálech výskytu). Specifickým případem dynamické konzervace, vhodné zejména pro vybrané krajové odrůdy zemědělských plodin, je „*on farm*“ konzervace. Ta spočívá v udržování genetického zdroje jeho praktickým pěstováním, v podmínkách pokud možno blízkých podmínkám jeho vzniku (klimatické a půdní podmínky, srovnatelné pěstební technologie). Konzervace „*on farm*“ je tedy vázána i na ekonomiku produkce z takto konzervovaných genetických zdrojů a možnosti jejího využití v podmínkách ČR jsou omezené.

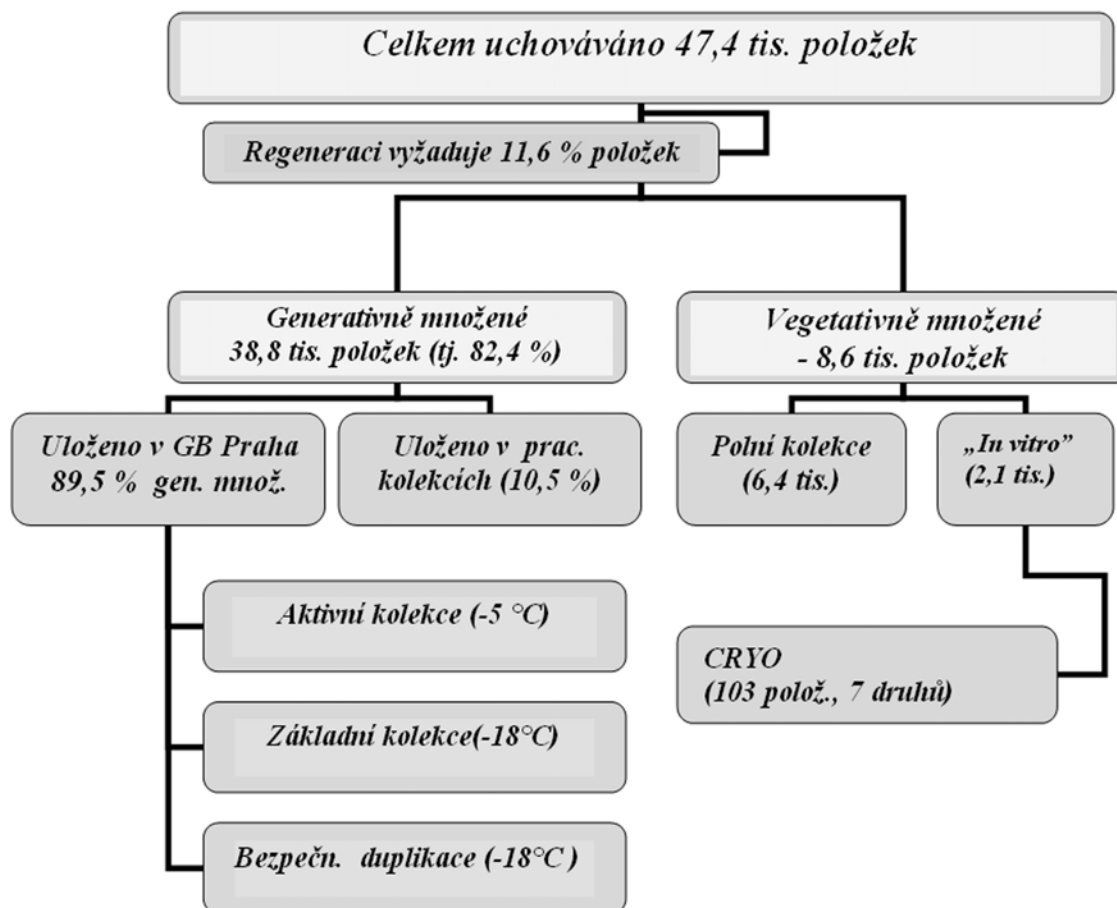
Metody konzervace „*ex situ*“ jsou založeny na uchování semen či částí rostlin mimo areál jejich přirozeného výskytu či zemědělskou farmu. Podstatou těchto metod je přenesení genetických zdrojů do určitých technologických zařízení (semenné genové banky, polní genové banky, kryobanky, „*in vitro*“ banky), které mohou lépe a efektivněji vytvořit co nejvhodnější podmínky pro bezpečné uchování genetických zdrojů. Genetický zdroj je tak ovšem přenesen z původního prostředí - další evoluce (genetické změny) neprobíhá. Naopak, jakékoliv případné genetické změny během konzervace jsou považovány za nežádoucí. Metodami „*ex situ*“ je dnes konzervována rozhodující část světových genofondů zemědělských plodin (dle odhadů FAO přes 6,5 milionů položek v celém světě).

Pod pojmem **konzervace** genetických zdrojů rostlin se nejčastěji rozumí střednědobé a dlouhodobé uchování vzorků semen v genových bankách „*ex situ*“. U semenných druhů je za střednědobou považována nejčastěji konzervace v časovém horizontu cca 5 – 15 let (s přihlédnutím ke specifické skladovatelnosti jednotlivých druhů), při určitém stupni vysušení semen a jejich uložení při teplotách do 10°C (nejčastěji -5°C až + 5 °C). Dlouhodobou konzervací se nejčastěji rozumí uchování vzorků genetických zdrojů po dobu několika desítek let, při výrazně snížené vlhkosti semen a teplotách -10°C a nižších. U generativně množených druhů je jednoznačné časové rozlišení střednědobé a dlouhodobé konzervace často obtížné. Rozdíly spíše souvisí s charakteristikami použité metody konzervace. Tak např. konzervace zpomaleným růstem v podmínkách „*in vitro*“ je dlouhodobě možná opakováním růstových cyklů (pasážováním kultur), samotný cyklus jedné kultivace je však značně časově omezený (cca 1 rok). Dlouhodobý charakter má konzervace vytrvalých druhů v polních genových bankách. Stejně tak dlouhodobý charakter by měla mít konzervace „*in situ*“. A mimořádná dlouhodobost konzervace je jedním z hlavních charakteristik kryokonzervace - ať již se jedná o vegetativní části rostlin či semena.

Uplatnění konzervace „*ex situ*“ je velmi dobře rozpracováno a prakticky využíváno u generativně množených druhů rostlin, jejichž semena mají ortodoxní charakter (tzn. přežívají vysušení a uskladnění při nízkých teplotách - na rozdíl od tzv. rekalcitrantních semen, u

kterých uvedené zásahy životnost semen poškozují). Uchováním semenných vzorků se zabývají zejména genové banky, kde podle druhů rostlin a podmínek skladování mohou být životaschopná semena uchována až po několik desítek let. U vegetativně množených druhů je nejrozšířenějším způsobem konzervace uchování genetických zdrojů v polních kolekcích, v menším rozsahu se prakticky využívá konzervace v „*in vitro*“ kulturách (u omezeného počtu druhů). Obě tyto metody jsou pracovně náročné, u polních kolekcí existují navíc výrazná rizika poškození genetických zdrojů chorobami a škůdci, nepříznivými klimatickými faktory (mráz, sucho) a přírodními či jinými katastrofami. Jako perspektivní metoda se jeví zejména kryokonzervace, která je využitelná u semenných i vegetativně množených druhů rostlin - a zvláště u druhé skupiny je velmi výhodná (genetická stabilita a dlouhodobost konzervace, vysoká bezpečnost takto uložených materiálů). U obou typů genetických zdrojů je kryoprezervace prakticky využívána – u semenných kolekcí při zachování základních kolekcí v USA a v Kanadě, u vegetativně množených druhů zatím u omezeného spektra druhů v Evropě a jinde ve světě.

Jak ukazuje obrázek 1, z celkového rozsahu kolekcí v ČR (více než 47,4 tis. položek, z toho 38 808 generativně množených) je v současné době 34 750 vzorků semen uloženo v genové bance ve VÚRV Praha, což je 89,5% všech generativně množených položek.



Obr. 1 Rozsahy kolekcí a způsoby uchování

Celkem se v rámci Národního programu uchovává 8 621 položek vegetativně množených položek, z toho přes 2 100 položek v „*in vitro*“ kultuře (brambory, zčásti další kolekce). Činnost zahájila kryobanka ve VÚRV Praha-Ruzyně, která se zaměřuje na

skladování „*in vitro*“ kultur v tekutém dusíku. Kryoprotokol je rozpracován a rutinně se využívá pro zamrazování meristemů bramboru, jabloní a hrušní (s určitými výjimkami - některé odrůdy reagují s nižší regenerační schopností). Kryoprotokol lze považovat za použitelný rovněž pro kryobanku u chmele, zde se však dosud řeší problémy po regeneraci s následným růstem rostlin *de novo*. U *Allium* sp. lze kryoprotokol považovat rovněž jako použitelný pro kryobanku, je rozpracovaný také alternativní kryoprotokol bez použití kryoprotektivních látek. Kryoprotokol pro jahodník a višně není zatím použitelný pro rutinní zamrazování a na jeho vývoji se dále pracuje. Kryoprotokol pro vinnou révu je v počátku vývoje.

Počty položek převedených do kryokonzervace jsou následující: 77 položek čtyř druhů ovocných dřevin (jabloně, hrušně, višně, jahodník), 18 položek brambor, 6 položek chmele, a 2 položky *Allium* sp.. Celkem je ke konci roku 2004 v kryobance uskladněno 103 položek od 7 druhů zemědělských plodin.

Sklad genové banky ve VÚRV Praha má celkovou kapacitu 93 000 skladovacích obalů v pěti klimatizovaných komorách. Dvě komory s kapacitou 29 000 skladovacích obalů pracují v teplotním režimu -18°C a zbývající tři komory o kapacitě 64 000 skladovacích obalů udržují teplotu -5°C. V současné době jsou vzorky uchovávány ve čtyřech komorách: komory č. 2 a 4 s teplotou -18°C a komory 3 a 5 s teplotou -5°C. K datu 30.10. 2004 je bylo ve skladu genové banky uchováváno celkem 59 627 skladovacích obalů se vzorky. Z toho 55 470 obalů obsahuje vzorky aktivní a základní kolekce, 1 383 obalů obsahuje vzorky pracovní kolekce, 51 je obalů s chráněnými vzorky a 2 723 obalů obsahuje vzorky slovenské bezpečnostní duplikace VÚRV Piešťany. Celkově je kapacita skladu genové banky využita ze 64%.

Tabulka 2. uvádí počty skladovacích obalů a uchovávaných ECN a jejich rozdělení podle typu kolekce. Od jednoho genetického zdroje (ECN) může být ve skladu více než 1 skladovací obal (u velkosemenných druhů, v případě několika přesevů téhož genetického zdroje nebo v případě uložení téhož vzorku v základní i aktivní kolekci). Celkový počet jedinečných ECN, tj. bez ohledu na typ kolekce, je 34 750. Z uvedených čísel vyplývá, že některé vzorky jsou uloženy jen v aktivní kolekci, jiné jen v základní kolekci a 4 593 genetických zdrojů je uloženo v obou typech kolekce.

Tab. 2 Počty skladovacích obalů a ECN uložených ve skladu GB

typ uskladnění	počet ECN	počet skladovacích obalů
aktivní kolekce	32859	46664
základní kolekce	6384	8806
celkem	-	55470
počet jedinečných ECN	34750	NA
pracovní kolekce	1383	1383
chráněné druhy	51	51
bezpečnostní duplikace - SVK	2723	2723
Celkem	38907	59627

Tabulka 3 uvádí podíl jednotlivých skupin plodin ve skladu genové banky. Opět jsou uváděny počty jedinečných ECN (tj. počty genetických zdrojů bez duplikací).

Tab. 3 Podíl skupin plodin ve skladu GB

Kód	Skupina plodin	Počet GZ	% podíl
C	obilniny	17832	51,32
L	luskoviny	4207	12,11
H	zeleniny	3533	10,17
X	technické plodiny	2088	6,01
G	trávy	1644	4,73
O	olejniny	1431	4,12
T	píce kromě trav	1361	3,92
Z	kukuřice a alternativní obiloviny	1153	3,32
A	aromatické a léčivé	683	1,97
D	květiny	497	1,43
B	řepa	193	0,56
M	druhy květnatých luk	121	0,35
W	okrasné dřeviny	7	0,02
	Celkem	34750	100

Jako bezpečnostní duplikace genetických zdrojů domácího původu je 1 446 položek z českých pracovišť uloženo ve slovenské genové bance ve VÚRV Piešťany. V porovnání s počtem slovenských vzorků (viz Tab.2), které jsou uchovávány jako bezpečnostní duplikace ve VÚRV Praha, je to jen o málo více než polovina. Pro zvýšení bezpečnosti konzervace původních českých materiálů bude nutné urychlit převod těchto GZ do bezpečnostní duplikace na Slovensku.

Poznámka: čísla uvedená v textu i v tabulkách byla aktualizována podle stavu kolekcí koncem roku 2004

Literatura

- DOTLAČIL L., ŠTOLC K.J. (1998): National Programme on Plant Genetic Resources Conservation and Utilization in The Czech Republic. Genetické zdroje 71, VÚRV Praha: 78pp. ISBN 80-238-3207-7
- DOTLAČIL L., ŠTOLC K. J., STEHNO Z., FABEROVÁ I. (1998): The National Programme on Plant Genetic Resources Conservation and Utilisation in the Czech Republic. IN: Implementation of the Global Plan of Action in Europe – Conservation and Sustainable Utilization of Plant Genetic Resources for Food and Agriculture, Proceedings of the European Symposium, 30 June – 3 July 1998, Braunschweig, Germany. IPGRI Rome: 350 - 354
- FAO (1996): Global Plan of Action for the Conservation and Sustainable Utilization of Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. FAO, Rome, 1996: 63 pp.
- FAO (1996): The state of the world's plant genetic resources for food and agriculture. FAO, Rome, 1996: 336 pp.
- FAO (1998): The state of the world's plant genetic resources for food and agriculture. FAO, Rome, 1998: 510 pp.
- GASS T., FRESE L., BEGEMANN F., LIPMAN E. (1999): Implementation of the Global Plan of Action in Europe – Conservation and Sustainable utilization of Plant genetic Resources for food and Agriculture. (Proceedings of the European Symposium, Braunschweig, Germany, 1998), 1999: 396 pp.
- STEHNO Z., DOTLAČIL L., HERMUTH J. (1997): Plant genetic resources conservation and utilisation in the Czech Republic. Proceedings of the Latvian Academy of Sciences Vol. 51, no.1/2: 39 - 44

STEHNO Z., DOTLAČIL L., FABEROVÁ I. (1999): Genetic Erosion Issues – Plant Genetic Resources in the Czech Republic. IN: Proceedings of the Technical Meeting on the Methodology of the FAO World Information and Early Warning system on Plant genetic resources, RICP, Prague, 21 – 23 June 1999: 56 – 60

Kontaktní adresa autora

Ing. Ladislav Dotlačil, CSc. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně
E-mail: dotlacil@vurv.cz

Polní kolekce meruněk – jejich konzervace, hodnocení a využití ve šlechtění

Boris Krška

Mendelova zemědělská a lesnická univerzita Brno, Zahradnická fakulta v Lednici

Souhrn

Jedním z cílů studia genetických zdrojů meruněk bylo nalézt genetickou příbuznost donorů rezistence k virové šarce švestek, a to na základě molekulárních metod. Kultivar SEO-(Stark Early Orange) byl v dendrogramu AFLP markerů přiřazen k čínské podskupině meruněk, zatímco mikrosatelitními markery nebyla tato domněnka potvrzena. Analýza izoenzymů (peroxidázy) potvrdila shodnou hypotézu s AFLP markery u příbuznosti kultivaru SEO a jejich hybridů (LE-3276, LE-2904) s čínskou podskupinou a u kultivaru Harlayne se středoasijskou podskupinou.

Klíčová slova: meruňka, genofond, šarka švestek, genetická příbuznost, markery

Summary

The objective of this study was to establish the genetic relationship among cultivars commonly used as donors for resistance to plum pox virus (PPV) in order to identify the putative sources of resistance to PPV. The plant material tested represented the European, Central Asian and Chinese eco-geographical groups of cultivated apricots as well as the wild Dzungar-Zailij population of *Prunus armeniaca* L. Forty-eight native accessions as well as the resistant (or tolerant) cultivars Harlayne, Stark Early Orange (SEO), Goldrich, Vestar and two hybrid forms Vestar x SEO (LE 3276) and Velkopavlovická x SEO (LE 2904) were screened by means of SSR analysis. To elucidate genetic relationships among apricot germplasm, a dendrogram was produced using neighbor joining (NJ) analysis of Nei's pair-wise genetic distances over 14 polymorphic SSR markers. On the dendrogram, resistant cultivars were separated into two different clusters suggesting two different sources of resistance to PPV. As was expected from pedigrees SEO, Vestar, LE 2904 and LE 3276 were grouped together in a cluster adjacent to the European cultivars. Resistant cultivars Harlayne and Goldrich were within another group containing Central Asian apricots and Dzhungar-Zailij form.

Key words: apricot, Sharka, genetic similarity, microsatellite markers

Výsledky a diskuse

Problematika uchování a využívání genetických zdrojů meruněk je v bývalém Československu řešena intenzivně od šedesátých let minulého století, i když první doložené kolekce meruněk byly zaznamenány již na začátku minulého století v Praze-Tróji, kolekce meruněk byly zmíněny u M. Röslera v Poděbradech v ovocné zahradě Sans pareil, kde založil na sklonku 18. století velkou sbírku ovocných druhů.

Doba ledová, jak uvádí KOSTINA (1946), sehrála velkou roli v procesu formování a tvorby jednotlivých druhů rodu *Armeniaca*, zejména na okrajích areálů. V severních částech se diferencovaly nejvíce mrazuodolné druhy s nejkratší vegetační dobou, tj. stepní xerofytní zakrslý druh *Armeniaca sibirica* L. a blízký druh *Armeniaca davidiana* Carr. a lesní dřevina – druh *Armeniaca manshurica* (Maxim) Skvorts.

Množství genotypů, coby představitelů jednotlivých položek současného genofondu meruněk na ZF v Lednici, představuje počet 341 (položek včetně pracovní kolekce) evidovaných a hodnocených v rámci EVIGEZ. Od roku 1997 do roku 2003 se genofond soustřeďuje na jedno místo a výsadba je průběžně doplňována a regenerována.

Jaké jsou hlavní úkoly konzervace meruněk v polních kolekcích (kromě běžné rutinní práce) ?

1. **Studium genotypů** daného druhu a analýza biologických vlastností odrůd umožňuje zaznamenat obecné nedostatky rostlinného druhu, zejména ty, které se projevují v různém stupni (nedostatečná mrazuodolnost, náchylnost k chorobám apod.). Dalším důvodem, proč udržovat, je **uchovávání genofondů před genetickou erózí** jednotlivých druhů. Jak uvádí

autoři (ZAGAJA, 1983, SMYKOV, 1989) volně rostoucí meruňky jsou zahrnuty do Červené knihy Kazachstánu. Doporučuje se totální ochrana druhu a vyčlenění chráněných oblastí v regionech okolí města Alma-Ata, údolí řeky Susamyr a dalších částech Kyrgyzské republiky. Důvody, které vedou k úbytku meruňkových stromů, jsou různé, např. využití pro palivo, výstavbu domů, husté osídlení obyvatelstvem (některé regiony Číny). Na pohoří Zailijského Alataje, kde rostly planě, se meruňky vyklučují pro zakládání nových výsadeb jabloní, staré, tzv. národní selekce Arménie, Turecka a Střední Asie, uvolňují místo novým kultivarům, takže vlastní introdukce nových kultivarů způsobuje dilema.

2. Šlechtitelé meruněk během nastupujícího tisíciletí budou požadovat **rozšíření genetické diverzity** k podnícení jejich další činnosti. Jelikož v původních centrech meruňky lépe rostou v horských oblastech s typicky kontinentálním klimatem, kde za těchto podmínek nedochází k ustálení velkých center populací, je nutné mít a znát velký podíl všech eko-geografických skupin pro výběr vlastností a znaků využitých ve šlechtění i pro introdukci.

Většina kolekcí ovocných dřevin vytvořených v minulosti brala do úvahy vybrané vzorky populací. Udržovatelé kolekcí obvykle hledali některé specifické vlastnosti a jejich přítomnost či absence v přírodních materiálech byly posuzovány především na základě fenotypového projevu. Takovýto postup je vysoce rozdílný s ohledem k recesivním genům vyskytujícím se v heterozygotních rostlinách (FRANKEL, HAWKES, 1975 in. MOORE, JANICK, 1983). Z tohoto důvodu současní řešitelé genofondů ovocných dřevin doporučují nahodilé vzorky populací (ZAGAJA 1970, in. MOORE, JANICK, 1983). Tato skutečnost nahrává pro detailnější poznání genofondů, a to cestou křížení (štěpení vloh v populacích), kde lze podle dědičnosti jednotlivých znaků usoudit na recesivnost.

3. **Hledání zdrojů genetické diverzity a příbuznosti** u meruněk je jedním z dalších cílů studia genofondů, v tomto případě cíleném pro zlepšení rezistence k šarce. K těmto záměrům je využíváno hledání polymorfismu pomocí enzymatických systémů, identifikace molekulárních markerů metodou AFLP (polymorfismus délky amplifikačních fragmentů), dále pomocí metody SSR (krátká opakovaná sekvence) analýzy pro hodnocení variability meruňkových genofondů, případně metodou RAPD (náhodně amplifikovaná polymorfni DNK).

První práce, která využívá genetické diverzity pro zvýšení rezistence u meruněk, byla představena v roce 1996 (BADANES *et al.* 1996). Pro účel vyšlechtit odrůdy meruněk rezistentních k PPV studovali šest z deseti enzymatických systémů, které poskytly polymorfismus (celkem 94 položek tří eko-geografických skupin – iránskavkazská, severoamerická a evropská).

MDH - malát dehydrogenáza a její profily proužků představují komplex genetických kontrolních systémů v několika druzích rodu *Prunus*, (ARUSELKAR *et al.* 1991, CERERO *et al.* 1989 in BADANES *et al.* 1996), avšak u meruněk MDH modely jsou jednodušší a zdá se, že jsou kontrolovány dvěma lokusy a dvěma předpokládanými alelami v každém lokusu. Ve studované kolekci genotypů pouze severoamerické kultivary Harcot, Orange Red a SEO jsou heterozygotní v tomto lokusu. Přítomnost homozygotů pro oba (*Mdh-1* a *Mdh-2*) geny v semenné populaci *P. mandshurica* ukazují, že zdrojem těchto vzácných alel může být primitivní středoasijská skupina. Podle těchto výsledků kultivary SEO, Orange Red, Harcot a Goldrich mohou mít předky ve Střední Asii, což souhlasí s tezí, že některé severoamerické odrůdy pochází ze Střední Asie spíše než pouze ze současných evropských odrůd (BAILEY, HOUGH 1975).

Nejvzdálenější severoamerická podskupina odrůd vykazuje nejvíce rysy středoasijské skupiny. Výsledky nasvědčují, že Střední Asie může být zdrojem odolnosti k PPV.

V rámci spolupráce s GNBS Jalta (Ukrajina), studovala Žebentjaeva původ rezistence meruněk k PPV. Na základě studia polymorfismu izoenzymů, a zejména pak peroxidázy, dospěla ŽEBENTJAEVA (osobní sdělení, 2002) k těmto poznatkům:

- kultivar Harlayne projevila genetickou podobnost s některými středoasijskými odrůdami jako Badami, Maftobi a zejména Arzami. Odolnost vůči PPV může pocházet z džungarských planých forem *A. vulgaris* Lamé., nebo z ferganské či zeravšanské podskupiny meruněk patřící ke středoasijské eko-geografické skupině

- kultivar Stark Early Orange (SEO) – poukázal na genetickou podobnost s čínskými odrůdami, odolnost této odrůdy je spojena s čínskou skupinou meruněk

- hybridy LE-3276 a LE-2904 jsou z hlediska izoenzymatického velmi podobné s čínskými genotypy.

Tyto hypotézy byly potvrzeny i dalšími metodami, a to AFLP (231 AFLP proužků z osmi primerových kombinací) a také metodou SSR, kde bylo detekováno 14 polymorfních lokusů.

Výsledky společné práce mezi GNBS Jalta, Clemson University a ZF Lednice jsou v současné době v tisku (ŽEBENTJAEVA *et al.* 2002 – v tisku).

Předmětem této práce bylo odhalit genetickou podobnost odrůd využívaných v rezistentním šlechtění vůči PPV. Severoamerické šarce odolné kultivary a jejich hybridy byly přidány k evropské skupině pro kombinační analýzu s rostlinným materiálem reprezentujícím čínský a středoasijský areál (údolí Fergany) domestikace meruněk. Clusterová analýza 54 položek tvoří dendrogram se třemi hlavními skupinami podrozdělenými do sedmi clusterů (shluků), jak je patrné z grafu 1.

Genotypy zajišťující v rezistentním šlechtění odolnost vůči PPV tvořily dva odlišné shluky (SEO, LE-2904, LE-3276, včetně Vestar, která není donorem rezistence PPV) přiléhající k evropským odrůdám patřícím k široce rozšířeným genotypům Bergeron – Ananasnyj cjuripinskij). Severoamerický tolerantní kultivar Goldrich a imunní Harlayne byly v rámci dalšího shluku obsahující středoasijské meruňky a tři, resp. dvě evropské odrůdy a jednu severoamerickou (Vynoslivij, Early Gold, De Compot), jež vykazují některé znaky specifické pro středoasijskou skupinu.

Umístění kultivarů Goldrich a Harlayne blízko k přírodním ferganským typům meruněk podporují zjištění Badenes *et al.* (1996). Odloučení genotypů SEO a LE-3276 od kultivarů Harlayne a Goldrich na dendrogramu může indikovat odlišné předky rezistence k šarce. Odrůda SEO a některé další genotypy vlastní nejvýznamnější SSR alely a rovněž ukazují na genetickou podobnost s čínskými meruňkami, např. kultivar Pui Sha Sin (HORMAZA, 2002 in ŽEBENTJAEVA *et al.* 2002). Prokázání čínských meruněk v rodokmenu odrůdy SEO a jejich příbuzných hybridů bylo již uvedeno v dřívějších pracích na základě analýzy izoenzymů (nepublikované údaje). Avšak omezené množství markerů a omezená schopnost detekce SSR a izoenzymatické analýzy neumožňuje ověřit introgresi generací, které byly využity předtím. Na základě dat SSR analýzy můžeme v současné době zatím konstatovat:

- byly ověřeny dva zdroje rezistence k PPV v severoamerickém genofondu,
- rezistence či tolerance kultivarů Harlayne a Goldrich pochází od středoasijských předků,
- původ rezistence kultivaru SEO a jeho hybridu LE-3276 je zatím nejasný;

Hodnocení polymorfismu metodou AFLP (graf 2), zjistili ŽEBENTJAEVA *et al.* (2002):

- meruňky se vyznačují vysokou úrovní polymorfismu u morfologických a fyziologických znaků, zejména uvnitř středoasijské eko-geografické skupiny,
- AFLP analýza podpořila hypotézu o středoasijských předcích pro odolnost kultivarů Harlayne a Goldrich vůči PPV,
- PPV rezistence u SEO a LE-3276 pochází z čínských předků,
- původní donory rezistence byly do evropského genofondu introdukovány a zpětně nakříženy.

Rozdílnost či prozatímní nejasnost v původu rezistence zjištěná odlišnými metodami u kultivaru SEO a některých hybridů lednické provenience (LE-série) může být způsobena tím, že byly vyhodnocovány jiné genetické lokusy. Genetická podobnost odhalená izoenzymy (analýza 10 lokusů) vede k závěru o možné genetické příbuznosti čínských odrůd v případě kultivaru SEO a středoasijské skupiny kultivarů Harlayne.

U metody SSR 14 lokusů ukazovalo pouze rozdílný původ rezistence kultivarů SEO a Harlayne, bez závěru, která z těchto skupin odolnosti má hlavní účinek. AFLP analýza (okolo 260 lokusů) dala nejspolehlivější hodnocení genetické podobnosti. Celkově rezistentní skupina ukazovala podobnost s evropskými odrůdami, ale některé lokusy vykazují introgresi neevropského genofondu. Pokud porovnáme pouze tyto lokusy, získáme důkaz o příbuznosti kultivaru SEO s čínskou skupinou a kultivaru Harlayne se středoasijskou skupinou.

4. Řešení problematiky **identifikace molekulárních markerů** spojených s rezistencí meruňek k šarce, včetně molekulárního mapování genomu meruňky je nezbytným krokem v procesu studia genofondu a rezistentním šlechtění. První práce v řešení této problematiky byly již publikovány SALAVA *et al.* (2002 a, 2002 b, 2002 c).

Bulková segreganční analýza (BAS) v kombinaci s AFLP byla provedena k identifikaci molekulárních markerů u populace SEO x LE-3218 (zpětné křížení s citlivým potomkem). Čtyři AFLP markery byly nalezeny u rezistentního rodiče a bulku, ale nebyly nalezeny u citlivého rodiče a bulku. Tyto markery byly detekovány u BC1 rezistentních hybridů s výjimkou některých rekombinací a u citlivých potomků chyběly, což naznačuje možnost propojení se znakem odolnosti k PPV. V další práci SALAVA *et al.* (2002 b) byla sestavena pomocí AFLP markerů genetická vazbová mapa meruňek u 80 jedinců BC 1 populace pro křížení LE-3246 x Vestar. Z 26 různých kombinací primerů bylo vyhodnoceno 248 AFLP markerů, ze kterých 40 bylo umístěno do osmi vazbových skupin pokrývajících 315,8 cM jaderného genomu meruňky. Průměrná vzdálenost mezi dvěma sousedními markery je 7,7 cM. Byl zmapován jeden gen (*PPVres1*) ovlivňující rezistenci k viru šarky švestky. Byly nalezeny dva AFLP markery (EAA/MCAG8 a EAG/MCAT14) se silnou vazbou k lokusu *PPVres1*. Tyto markery jsou v současné době charakterizovány a bude zkoumána další možnost jejich využití pro MAS (marker-assisted selection) ve šlechtění meruňek.

5. Moderní metody mohou dále sloužit jako **prostředek k predikci stupně heterozygotnosti, k identifikaci kultivarů, genomu**. Koncem osmdesátých let k těmto účelům sloužila metoda elektroforézy enzymů, zpočátku zejména pro identifikaci genotypů za účelem obhájení šlechtitelských práv, dále pro hledání původu, pro šlechtitelské účely k očekávání možné segregace lokusů v potomstvech, avšak u náhodných znaků. Izoenzymy mohou být spolehlivým genetickým markerem s využitím molekulárních markerů.

ŽEBENTJAEVA *et al.* (2000, osobní sdělení 2002) hodnotila genetickou diversitu meruňek determinovanou pomocí izoenzymů (AAT, AMY, EST, LAP, PX, SOD, SKDH). Jako objekt výzkumu využila 140 odrůd z evropské, iráno-kavkazské, čínské a středoasijské skupiny, včetně hybridů a některých planých forem. Zjistili polymorfismus u izoenzymů AAT, AMY, EST, LAP, PX, SOD a SKDH. Bylo identifikováno dvanáct lokusů, z nichž 7 bylo nalezeno jako polymorfních v celé studované kolekci. Nejmenší množství polymorfních lokusů (41,7 %) bylo objeveno mezi evropskými odrůdami, nejvyšší (66,7 %) mezi čínskými genotypy. Dále byla určena intraspecifická variabilita izoenzymatické skladby alelické frekvence polymorfních lokusů v rámci eko-geografických skupin a jejich heterozygotnost a počet alel v lokusech.

Průměrná střední hodnota heterozygotnosti a počet alel v lokusech byla pro heterozygotnost od 0,17 (u evropské a kavkazské skupiny) – 0,26 (u středoasijských podskupin) a počet alel v lokusech 1,25 u evropských až po 1,70 u zeravšanské podskupiny.

Z výše uvedených enzymů největšího polymorfismu (genetické různorodosti) u meruněk zjistila ŽEBENTJAEVA (2000) u elektroforetické analýzy jednotlivých komponentů peroxidázy.

V průběhu stáže v rámci vědecko-technické spolupráce mezi ZF Lednice a GNBS Jalta, ŽEBENTJAEVA (1999, nepublikováno) prováděla elektroforetickou analýzu několika enzymů (SKDH, EST 1, EST 2, COD, AAT, AMY a LAP), a to na šlechtitelských materiálech, které bývají v současné době nejvíce využívány ve šlechtitelském programu Ústavu ovocnictví ZF v Lednici. Výsledek této analýzy uvádí tabulka 1.

Tab.1 Elektroforetická analýza izoenzymů

Genotyp	Lokusy						
	SK dh1	EST-1	EST-2	COD-1	AAT-1	AMY	LAP-1
LE-3247	bb	ab	ab	ab	bb	2,3,4	aa
SEO	bb	ab	ab	ab	bb	3,4	aa
LE-2904	bb	ab	ab	ab	ab	3,4	aa
Re Umberto	bb	ab	aa	ab	aa	1,2,3,4	aa
Vestar	bb	bb	ab	bb	bc	2,3,4	aa
Harlayne	bb	ab	ab	ab	bc	3,4	aa
LE-3276	bb	bb	bb	ab	bb	3,4	aa
Velkopavlovická LE-12/2	bb	ab	aa	bb	ab	1,2,3,4	aa
LE-97 (klon VP)	bb	ab	aa	bb	ac	1,2,3,4	aa

Z tohoto rozboru je zajímavý poznatek ten, že LE-97 (klon cv. Velkopavlovická) se odlišuje složením alel od standardního klonu Velkopavlovická LE-12/2 v enzymu AAT-1 - aspartátaminotransferáza.

Z toho vyplývá, že klon LE-97 není standardním klonem odrůdy Velkopavlovická, ale podle zkušeností Žebentjaevy tyto klony, které se liší v daném enzymu AAT-1, sestavou alel poukazují na svůj dřívější semenný původ. Jestliže klon LE-97 používáme v křížení, můžeme pak očekávat odlišnou segregaci vloh než u standardních klonů. Dále bylo zajímavé zjištění, že kultivar SEO neměl absolutní podobnost ve sledovaných enzymech s žádným dalším genotypem a jemu nejbližší byly čínské genotypy. V sestavě alel v lokusech v jednotlivých enzymech nezjistila autorka žádný rozdíl mezi kultivary Harlayne a Forum. Nejméně odlišností bylo zjištěno u hybridů ze SEO, tj. LE-3276, LE-3247 a LE-2904. Dokonce i u hybridu LE-2904 (Velkopavlovická x SEO) byla sestava alel v lokusech u jednotlivých enzymů bližší k odrůdě Velkopavlovická.

Závěr

1. Genofond, čili soubor genetických zdrojů meruněk, je potřeba **studovat na co největších populacích** (v rámci druhu i příbuzných taxonů) tak, aby byla zajištěna a reprezentována variabilita a biodiverzita daných druhů tamních genetických zdrojů. Již VAVILOV (1964) poukazoval na to, aby šlechtitel nepracoval na „tříšti“ druhů, ne na náhodném materiálu, ale aby využíval odrůdový rozsah včetně extrémních variant, a tak nacházel možnosti objektivního hodnocení druhů. Na tomto základě se šlechtitel pokouší najít donory hlavních hospodářských znaků a také široce využívat pro tento účel zákon homologické řady.

2. Intenzivně je genofond meruněk využíván pro šlechtitelskou práci, a to zejména pro **výběr donorů k adaptaci** na prostředí a k chorobám. Na genofond je pohlíženo jako na zdroj variability genetických znaků nejrůznějších fenologických, morfologických a tržních charakterů pro výběr zástupců všech eko-geografických skupin meruněk.

3. Pomocí analýzy izoenzymů, molekulárních metod SSR a AFLP a sestavených dendrogramů byla určena **genetická příbuznost** imunní odrůdy Harlayne a středně odolného cv. Goldrich se středoasijskými genotypy. Metodou AFLP byl stanoven původ kultivaru SEO s čínskou skupinou genotypů, avšak metodou SSR nebyla tato příbuznost cv. Stark Early Orange (SEO) potvrzena. Naproti tomu příbuznost hybridů LE-3276 (imunní k PPV) a LE-2904 (rezistentní k PPV) byla identifikována společně s čínskou skupinou, a to oběma metodami. Metodou AFLP bylo **objeveno 5 markerů odolnosti k šarce švestek**, které se vyskytují u všech rezistentních jedinců, avšak přibližně jedna třetina citlivých rostlin měla všech pět markerů také. Výzkum na tomto úseku dále pokračuje.

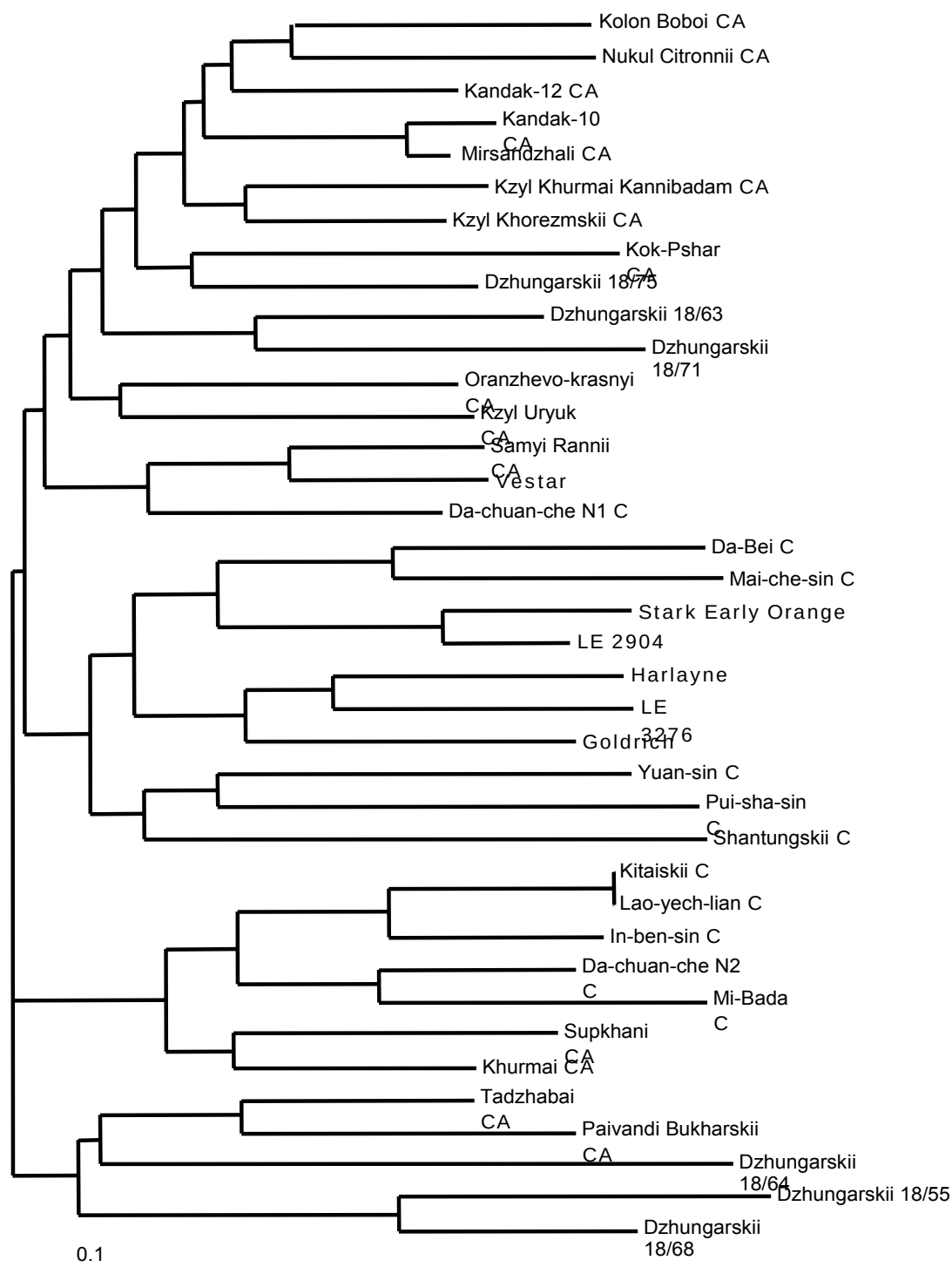
4. Práce s genofondy rostlin je rozmanitá jak svým obsahem, tak i posláním. **Uchování a využívání biodiverzity** (biologické rozmanitosti) je nejen úkolem ochrany přírody, ale především se tento úkol týká zemědělství a zahradnictví, jelikož tato odvětví ji přímo využívají. Nejinak je tomu i v případě genofondů meruněk. Meruňky prošly složitou evolucí a domestikací, v jejichž rámci člověk výběrem a později šlechtěním postupně spolu s přírodou vytvořil velké množství geneticky odlišných forem. Pro zachování a využití této široké vnitrodruhové genetické diverzity meruněk usilují lidé již několik století. V současnosti jsme svědky rozšiřování nových adaptovaných odrůd a stoupajícího trendu světové produkce meruněk, což je výsledkem správně zvolené cesty a práce našich předchůdců – šlechtitelů. Pokračováním této úspěšně započaté a již realizované činnosti se budoucí generace pěstitelů a šlechtitelů meruněk mohou dočkat i skutečnosti, že „meruňky k nám sestoupí z hor“.

5. **Hodnocení a konzervace meruněk v polních kolekcích** má a stále bude mít **prvořadou důležitost**. V budoucnosti by měly core kolekce v podmínkách insect-proof u ozdraveného resp. viru prostého materiálu sehrát větší význam, zejména v současnosti, kdy se objevují karanténní choroby jako ESFY- evropská žloutenka peckovin, šarka švestek apod. Budoucnost také ukáže do jaké míry bude využita perspektiva kryokonzervace u rodu *Prunus* spp.

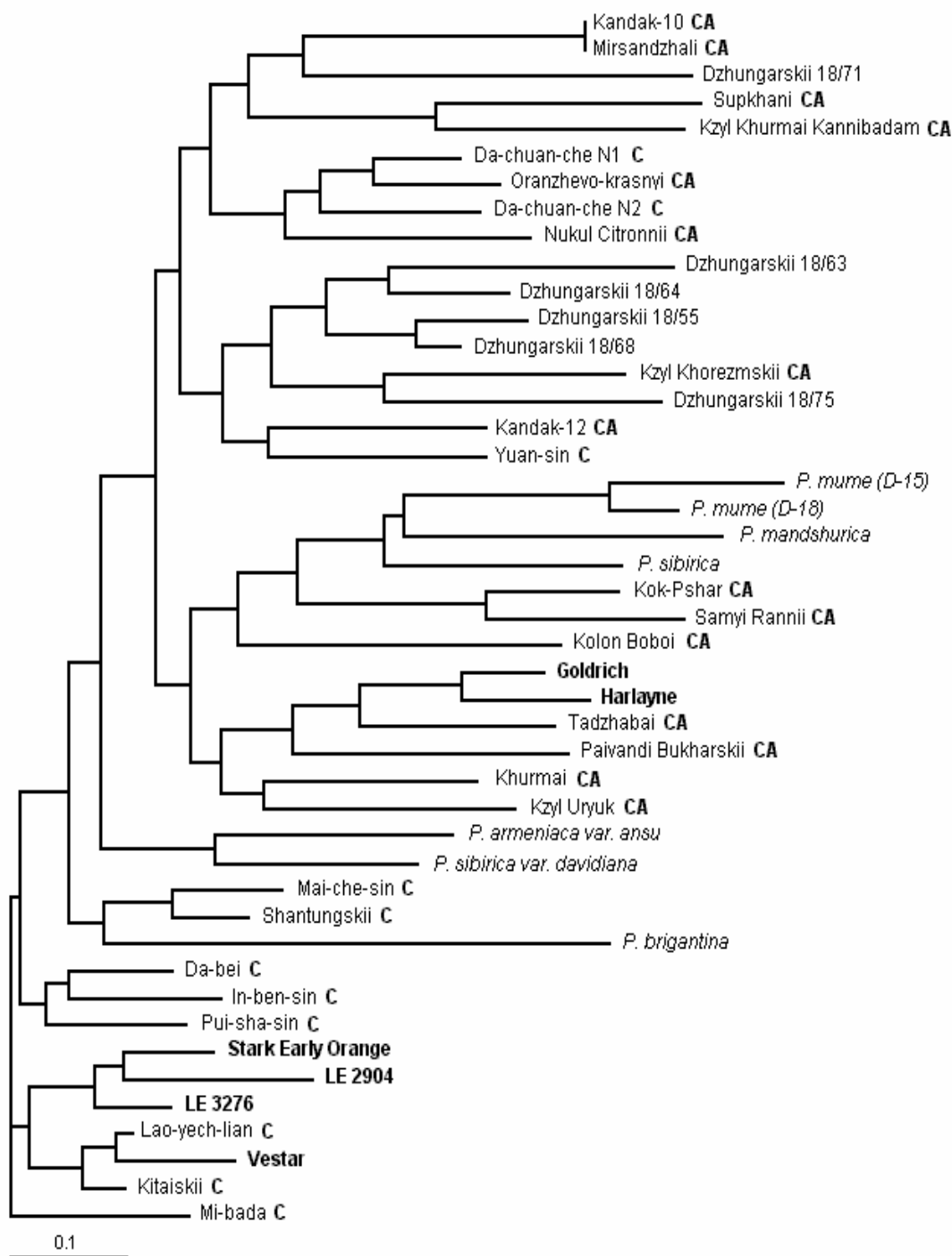
Literatura

- BADENES M.L., ASINS M.J., CARBONELL E.A., GLACER G. (1996): Genetic Diversity in Apricot, *Prunus armeniaca*, Aimed at Improving Resistance to plum Pox Virus. *Plant Breed* 115, 133-139.
- BAILEY C.H., HOUGH L.F. (1975): Apricots. In: JANICK J., MOORE J.N.: *Advances in Fruit Breeding*. Purdue University Press West Lafayette, Indiana, 1975.
- KOSTINA K.F. (1946): Proischozheniye i evolucija kulturnogo abrikosa. *Trudy GNBS*, Tom XXIV., vyp. 1, 1946, 25-39.
- SALAVA J., KRŠKA B., POLÁK J., ABBOTT A.G. (2002): Genetické mapování resistance meruněk k viru šarky švestky. Sborník přednášek: Využití molekulárních markerů v biologii, šlechtění a uchovávání genových zdrojů rostlin, 4.-6.11.2002 Šumperk, 175-179.
- SALAVA J., WANG Y., KRŠKA B., POLÁK J., KOMÍNEK P., ABBOTT A.G. (2002): Detection of AFLP Markers Linked to Plum Pox Virus Resistance Genes in Apricot. In: *Book of Abstracts from 6th, Conference of EFPP, Prague, 2002*, 40.
- VAVILOV N.I. (1964): *Problemy immuniteta kulturnych rastenij*. Nauka, Moskva-Leningrad, 1964.
- ZHEBENTYAYEVA T. N., SIVOLAP J.M (2000): Genetic Diversity of Apricot Determined by Isozyme and RAPD Analyses. *Acta Hort* 538, 525-529.
- ZHEBENTYAYEVA T., REIGHARD G., KRŠKA B., GORINA V., ABBOTT A.G. (2002): Origin of Resistance to Plum Pox Virus in Apricot: What Molecular Markers Tell. *Book of Abstracts Disease Resistance in Plant Pathology, Prague, 8.-14. September 2002*, 21.

Graf.1. Dendrogram genetické příbuznosti mezi odrůdami zjišťujícími rezistenci k šarce a odrůdami na základě alelického polymorfismu zjištěného cíleně SSR primary (C – čínské, CA – středoasijská skupina).



Graf 2. Dendrogram genetické příbuznosti odrůd zjišťující rezistenci k šarce a odrůdami genofondu na základě 27 markerů AFLP (C – čínské, CA – středoasijská skupina).



Kontaktní adresa autora

Doc. Dr. Ing. Boris Krška, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita Brno, Zahradnická fakulta v
Lednici, Ústav ovocnictví
E-mail: krska@zf.mendelu.cz

Využití *in vitro* kultur pro účely konzervace genofondu bramboru

Vendulka Horáčková, Jaroslava Domkářová

Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod s.r.o.

Souhrn

V genové bance in vitro Výzkumného ústavu bramborářského Havlíčkův Brod s.r.o. je v současné době uchováváno 2 018 vzorků bramboru rozdělených do šesti podkolekcí. Jsou to odrůdy světového sortimentu, tetraploidní hybridy, indukované primární a sekundární dihaploidy, kulturní druhy, plané druhy a mezidruhové hybridy. Kolekce představuje širokou základnu donorů významných hospodářských vlastností a rezistencí a je zařazena do Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agrobiodiversity. Uživatelé genové banky jsou praktičtí šlechtitelé bramboru, vysoké školy a výzkumná pracoviště v České republice a v zahraničí.

Klíčová slova: kolekce bramboru, in vitro konzervace, mikrohlízky

Summary

Altogether 2 018 potato accessions divided into six sub-collections are held in the in vitro gene bank Potato Research Institute Havlíčkův Brod Ltd.. Among them are current advanced cultivars, tetraploid hybrids, induced primary and secondary dihaploids, cultivated and wild species and interspecific hybrids. This collection representing broad base of donors of important economic characters and resistances is included in the National Programme on Conservation and Utilization Plant Genetic Resources and Agro-biodiversity. Potato in vitro gene bank provides services to users, domestic and foreign potato breeders, universities and research institutions.

Key words: potato collection, in vitro conservation, micro-tubers

Úvod

Explantátové techniky, které při manipulaci *in vitro* zachovávají genetickou identitu materiálu, se využívají velmi často k uchovávání kolekcí genových zdrojů, a to především u vegetativně množených plodin, kde je při tradičním způsobu udržování nebezpečí ztráty materiálu v důsledku degenerace vyvolané přirozeným infekčním tlakem patogenů.

Jednou z vegetativně množených plodin, u které se konzervace genových zdrojů v kultuře *in vitro* uplatňuje již řadu let, jsou brambory. Světová síť genových bank bramboru pracuje již výhradně na principu *in vitro* konzervace. Tento postup umožňuje uchovávat rozsáhlou základnu materiálu se širokým spektrem dostupných genetických informací a usnadňuje jeho mezinárodní výměnu.

Zatím nejrozšířenějším způsobem konzervace *in vitro* je postup vedoucí k navození podmínek pomalého růstu ve vitálních teplotách nad bodem mrazu, ve kterých dlouhodobě přežívají buď rostlinky nebo indukované mikrohlízky.

V České republice existuje genová banka bramboru při Výzkumném ústavu bramborářském v Havlíčkově Brodě od roku 1952. Po roce 1985 začal být klasický způsob každoročního vegetativního přesazování postupně nahrazován udržováním v kultuře *in vitro*.

Postup uplatňovaný při vedení genové banky sestává z karantenní výsadby nově získaných materiálů, aseptického převodu do prostředí *in vitro*, dlouhodobého udržování, subkultivace a ozdravování od virových chorob *in vitro*. Vlastní technika dlouhodobého udržování *in vitro* spočívá v indukci tvorby mikrohlízky na modifikovaných médiích MS (MURASHIGE, SKOOG, 1962) bez růstových regulátorů a v kultivaci při teplotě 10° C, 10 hodinové fotoperiodě a intenzitě osvětlení 3000 luxů. Subkultivace je prováděna po 14 – 18 měsících pomocí rašících mikrohlízky.

Techniky rostlinných explantátů *in vitro* a jejich uplatnění v genetice a šlechtění je možno rozdělit do dvou základních skupin, a to na

- techniky zachovávající genetickou identitu s výchozím materiálem
- techniky rozšiřující genetickou variabilitu výchozího materiálu

Volba výchozího explantátu a kultivačního postupu je přitom řízena charakterem vytýčeného cíle.

Techniky, které při manipulaci *in vitro* zachovávají genetickou identitu materiálu, se využívají mimo jiné k uchovávání kolekcí, zejména u vegetativně množených plodin, kde je při tradičním způsobu udržování nebezpečí ztráty materiálu v důsledku degenerace vyvolané přirozeným infekčním tlakem patogenů a u materiálu lze pouze okrajově použít udržování semen.

Jednou z vegetativně množených plodin, u které je konzervace genových zdrojů *in vitro* využívána již řadu let, jsou brambory.

Brambor hlízatý (*Solanum tuberosum* L.) je teoreticky možné rozmnožovat a udržovat dvěma způsoby, a to generativně a vegetativně. Prakticky však má rozmnožování a udržování bramboru svá specifika. Ta vyplývají z tetrasomické dědičnosti kulturních odrůd bramboru, která se projevuje značnou proměnlivostí znaků a vlastností potomstev semenných generací ze samoopylení a záměrného křížení. Proto jsou kulturní tetraploidní druhy *S. tuberosum* rozmnožovány pouze vegetativně hlízami a rovněž vegetativní cestou mohou být udržovány. Uchovávání vzorků ve formě semen je využíváno pouze u omezeného souboru fertálních planých a kulturních druhů rodu *Solanum*.

Generativní způsob množení je však nezbytný v novošlechtění bramboru, neboť v semenné populaci se projeví kombinace vlastností rodičovských partnerů a po podchycení žádoucích klonů probíhá další rozmnožování vegetativním způsobem, který projev vysoké heterozygotnosti eliminuje a zachovává vlastnosti F1 generace.

Celosvětově se uchovávání kolekcí bramboru s pomocí kultury *in vitro* začalo ve větší míře využívat po roce 1970, kdy bylo zdůrazňováno zejména hledisko fytopatologické. Tento postup umožňoval nejen záchranu materiálů plně zamořeného virovými chorobami, ale otevřel nové možnosti pro ozdravování od virových chorob v kultuře *in vitro* a dosažení viruprostých rostlin. Přispěl výrazně i k rozvoji mezinárodní výměny genových zdrojů.

Konzervace genofondů bramboru s využitím kultury *in vitro* ve světě

V současné době pracuje světová síť genových bank bramboru již výhradně na principu *in vitro* konzervace a představuje rozsáhlou základnu s dostatečně širokým spektrem dostupných genetických informací (SCHÜLER - HOEKSTRA, 1997, HOEKSTRA, 2002, HUAMÁN *et al.* 2000, HUAMÁN – SCHMIEDICHE, 1999). Velkými sbírkami genových zdrojů rodu *Solanum* disponují banky jak na americkém kontinentě např. CIP Lima v Peru, USPC Sturgeon Bay v USA, tak v Evropě např. CPP Pentlandsfield ve Skotsku, BGRC Braunschweig-Volkenrode a IPK v Gaterslebenu, s pobočkou v Gross Lüsewitz v Německu, CGN Wageningen v Nizozemí, SCRI Dundee ve Velké Británii, INRA Landerneau ve Francii, VIR Petrohrad v Rusku, IZ Bonin v Polsku a další. Pracovní sbírky genových zdrojů vznikly rovněž při bramborářských institucích, zejména šlechtitelských, ve všech vyspělých státech.

Postupy používané ke konzervaci bramboru *in vitro* se liší mezi jednotlivými světovými kolekcemi v dílčích detailech, přičemž společné všem jsou následující aspekty:

- jednoduchost zakládání kultury a možnost jejího využití pro široké spektrum genotypů brambor
- schopnost dlouhodobého udržování organogenetické schopnosti v kultuře *in vitro* a dlouhá subkultivační perioda

- nutnost zachování genetické homogenity a identity udržovaného materiálu s materiálem výchozím.

Pro střední až dlouhodobé uchovávání genotypů bramboru se uplatňují s určitými modifikacemi v zásadě dva postupy, a to:

- uchovávání ve formě *in vitro* rostlin nebo mikrohřízek
- uchovávání meristémů nebo vrcholků výhonů v kapalném dusíku (kryokonzervace)

Při způsobu konzervace pomocí *in vitro* rostlin nebo mikrohřízek se jedná o navození podmínek pomalého růstu ve vitálních teplotách nad bodem mrazu, ve kterých tyto orgány dlouhodobě přežívají.

Pokud jsou uchovávaným explantátem rostliny *in vitro*, jako je to v případě udržování odrůd v kolekci genových zdrojů v Braunschweigu, Německo (MIX-WAGNER, 1996, MIX-WAGNER, 1999), převádějí se tyto do režimu pomalého růstu ve velikosti 3 - 4 cm a ke kultivaci se používá bazální živné MS médium (1962) s přidavkem 2% sacharózy. Médium se využívá buď pevné (agarové), nebo v tekuté podobě, s rostlinami vysazenými na ponořených můstcích z filtračního papíru. Kultivace probíhá při teplotě 10°C, intenzitě světla 2000 luxů a 16ti hodinové délce dne.

Délka udržovacího cyklu závisí plně na charakteru uchovávaného materiálu a je obvykle 2 roky, výjimečně přežívají životaschopné části rostlin až 3 roky. Poté jsou kultury pozvolna převedeny do podmínek běžné kultivace a z přežívajících částí rostliny se odeberou axilární pupeny, namnoží se potřebný počet rostlinek (obvykle do deseti) a celý postup kultivace se při pomalém růstu opakuje. U části materiálu se projevuje přibližně po půl roce skladování růstová deprese různé intenzity a tento materiál vyžaduje přepasážování v kratším termínu, než je obvyklý dvouroční cyklus, např. u odrůd světového sortimentu to představuje cca 10% položek. Vzhledem k tomu, že ne všechen materiál reaguje na konzervaci pomalým růstem stejně, je nutné prověřování stavu vzorků v intervalech 1 – 2 měsíce (MIX-WAGNER, 1996, MIX-WAGNER, 1999).

Poměrně více využívaným postupem je konzervace pomocí mikrohřízek. Uplatňuje se např. v rozsáhlé kolekci CIP v Peru (ROCA *et al.* 1979, HUAMÁN *et al.* 2000), v německých bankách (THIEME, 1992, MIX-WAGNER, 1999, SCHÜLER, HOEKSTRA, 1997), v polské genové bance (ZAKLUKIEWICZ, SEKRECKA, 1994), ve slovenské genové bance (HELDÁK, 1995, TOMA, 1997) a v dalších.

K vyvolání tuberizace *in vitro* se obecně používá základní médium MS (1962) se zvýšenou koncentrací sacharózy (6 – 10%), případně s malým přidavkem manitolu. Rostlinky *in vitro* ve fázi 5 nódů se převedou do indukčních podmínek, představovaných teplotou 10°C, fotoperiodou odpovídající krátkému dni (8 – 10 hodin světlo) a nižší intenzitou světla (2 000 luxů). Po indukci mikrohřízek (za čtyři měsíce) dochází k pomalému odumírání a zasychání stonků. V této podobě přežívá kultura dalších 12 – 15 měsíců, po té začnou hlízky rašit. Vyvinuté výhony se použijí k pasáži a k založení nového cyklu. Zkumavky s indukovanými mikrohřízkami je možné také přenést do tmy a teploty 4°C, jak to uvádí MIX-WAGNER (1999), v případě kolekce 1.500 odrůd udržovaných v genové bance IPK Gatersleben (Německo). Průměrná doba do další pasáže se pohybuje mezi 12 – 15 měsíci. Všechny uložený materiál nereaguje na podmínky kultivace stejně a kontrola v dvouměsíčních intervalech je nezbytná.

Konzervace genofondů bramboru s využitím kultury *in vitro* v ČR

V České republice se existence genové banky bramboru při Výzkumném ústavu bramborářském v Havlíčkově Brodě datuje od roku 1952. Do současné doby bylo postupně shromážděno přes 2.000 vzorků (DOMKÁŘOVÁ, 1995, DOMKÁŘOVÁ, 1999, DOMKÁŘOVÁ, 2003, DOMKÁŘOVÁ, HORÁČKOVÁ, 2000, HORÁČKOVÁ,

DOMKÁŘOVÁ, 1998, HORÁČKOVÁ, DOMKÁŘOVÁ, 1999, HORÁČKOVÁ, DOMKÁŘOVÁ, 2003).

Po roce 1985 začal být klasický způsob každoročního vegetativního přesazování i v naší bance postupně nahrazován udržováním v kultuře *in vitro*. Vedlo k tomu zejména výrazné zhoršení zdravotního stavu polní kolekce po letech s velmi silným infekčním tlakem, kdy hrozila ztráta řady materiálů.

V průběhu zakládání genové banky byla provedena celá série pokusů zaměřených na sledování vlivu kultivačních podmínek na zpomalení růstu kultur a vyvolání tuberizace *in vitro*. Dále na potlačení vnitřních kontaminací při převodu do sterilního prostředí, na ozdravování od virových chorob a ověření stability udržovaného materiálu (KOSTŘICA *et al.*, 1995).

Na základě těchto pokusů byla vypracována technika dlouhodobé kultivace *in vitro*. Sestává z několika navazujících postupů:

Karanténní výsadba nově získaných materiálů

Karanténní výsadba je prováděna za účelem detailního prověření zdravotního stavu před převodem do prostředí *in vitro*. Použit je test ELISA pro stanovení šesti nejvýznamnějších virů bramboru, elektroforéza v PAA gelu a molekulární cDNA hybridizace pro detekci viroidu vřetenovitosti bramboru (DĚDIČ, 1990, DĚDIČ, PTÁČEK, 1995).

Aseptický převod do prostředí in vitro

K převodu do kultury *in vitro* se používají stonkové segmenty skleníkových nebo polních rostlin, dobré výsledky jsou při převodu pomocí klíčků hlíz. Použit lze i přímo výsev semen na agar, což je využíváno především u špatně klíčících semen planých druhů.

K odstranění vnitřních bakteriálních kontaminací, které mají původ v cévních svazcích převáděného segmentu a přetrvávají i po povrchové sterilizaci, se používá krátkodobá, případně opakovaná kultivace na půdách s antibiotiky (např. gentamycin, rifampicin).

Kultivační média pro dlouhodobé udržování

Každý k udržování připravený genotyp je pasážován na tři živná média. Základem je médium MS (MURASHIGE, SKOOG, 1962) bez růstových regulátorů. V prvním případě je médium doplněno zvýšenou dávkou sacharózy (6 %), která pozitivně ovlivňuje tuberizaci *in vitro*. Ve druhém případě je zvýšený obsah sacharózy kombinován s růstovým retardantem Alar 85 v dávce 5 mg/l, působícím na prodloužení periody růstu před nasazením mikrohlízek a na stimulaci jejich tvorby. Ve třetím médiu je normální obsah sacharózy (3 %) doplněn zvýšenou dávkou Alaru 85 (30 mg/l).

Dlouhodobé udržování a subkultivace in vitro

Do chladového režimu genové banky jsou přenášeny již vyvíjející se rostliny. Kultivace probíhá při teplotě 10° C, desetihodinové fotoperiodě a intenzitě osvětlení 3000 luxů.

Subkultivace na nová média pomocí mikrohlízek se provádí u většiny materiálů v průměru po 14 – 18 měsících. Některé udržované materiály (např. dihaploidy, plané druhy apod.) vyžadují individuální přístup a pasážování na nová média i po kratší době. V závislosti na genotypu se projevuje jistá variabilita růstové reakce, proto je nutná průběžná kontrola stavu udržovaného materiálu.

V případě požadavku se u vybraného genotypu mohou kdykoliv v průběhu roku použít živé části uchovávané kultury k pasážování na množící médium MS a materiál je připraven k dalšímu řízkování nebo expedici.

Kultivační postup používaný během uchovávání kultur bramboru *in vitro* je shrnut v následujícím přehledu:

Kultivační fáze	Kultivační režim	Stav kultury	Délka kultivační fáze
1.	20 °C, 16 hod. Fotoperioda	regenerující řízků na na bankovních půdách	2 týdny
2.	10 °C, 10 hod. Fotoperioda	rostliny nasazující mikrohlízky	4-6 měsíců
3.	10 °C, 10 hod. Fotoperioda	zasyhající stonek dormantní mikrohlízky	4-5 měsíce
4.	10 °C, 10 hod. Fotoperioda	mikrohlízky rašící, případně se stonkem schopným řízkování	6-7 měsíce
Celkem			14-18 měsíců

Ozdravování od virových chorob in vitro

K ozdravování od virových chorob v kultuře *in vitro* se v současné době využívají dva postupy. Jedná se o klasickou metodu, spočívající v kombinaci termoterapie s následným odběrem vrcholových meristémů. Metoda využívá efektu klesající koncentrace virů směrem k vegetativnímu vrcholu a inhibice reprodukce a šíření virů v důsledku termoterapie.

Druhým postupem, který se v současné době při eliminaci virové infekce v genové bance využívá ve větší míře, je chemoterapie *in vitro*. Jako nejúčinnější přípravek k inhibici reprodukce virů se v našich pokusech projevil syntetický preparát Ribavirin (HORÁČKOVÁ, 1998).

Virostatického účinku se dosahuje po opakovaném pasážování horních částí rostlin na živném médiu s Ribavirinem, přičemž subkultivace na nové médium se provádí po čtyřech týdnech. Po ukončení ozdravovacího cyklu následuje opakované testování zdravotního stavu testem ELISA, včetně závěrečného testu na rostlinách *in vivo*. Pozitivní ozdravovací efekt se projevuje již po druhé pasáži na médium s Ribavirinem, optimální je po pasáži třetí, kdy je dosahováno až 100% podílu ozdravených klonů ve vzorku. Ozdravování však není úspěšné u všech ovlivňovaných materiálů, vždy u určitého procenta vzorků musí být ozdravovací proces opakován (HORÁČKOVÁ *et al.* 2003).

Shromažďování a rozšiřování kolekce, poskytování genetických zdrojů

Vzorky genetických zdrojů bramboru domácího i zahraničního původu jsou shromažďovány na základě přímého kontaktování šlechtitelů nebo prostřednictvím ÚKZÚZ, referát brambor Lípa. Dále z nabídkových katalogů zahraničních genových bank a výměnou s bramborářskými institucemi ve světě. Do kolekce jsou rovněž převáděny cenné materiály získané při řešení výzkumných projektů s geneticko-šlechtitelským zaměřením zabezpečovaných ve VÚB Havlíčkův Brod.

Uživatelům udržované kolekce genetických zdrojů jsou vyžádané vzorky poskytovány převážně ve formě rostlin *in vitro*, případně hlíz z technických izolátorů, včetně dostupných údajů o předávaném materiálu.

Odborná veřejnost je každoročně informována prostřednictvím poskytovaných přehledů o rozsahu udržované kolekce *in vitro* a jejím zdravotním stavu.

Uživateli genové banky jsou výzkumná a šlechtitelská pracoviště a univerzity doma i v zahraničí. Ve VÚB jsou materiály z genové banky pravidelně využívány při řešení většiny výzkumných projektů z oblasti genetiky, virologie a tkáňových kultur.

Charakter a rozsah udržované kolekce bramboru

V genové bance bramboru je dosud shromážděno 2 018 položek a kolekce je rozdělena podle charakteru udržovaného materiálu na šest podkolekcí uvedených v následujícím přehledu:

- 1) Odrůdy *Solanum tuberosum* - 1 100 položek
- 2) Tetraploidní kříženci *Solanum tuberosum* - 280 položek
- 3) Dihaploidy, diploidy - 249 položek
- 4) Kulturní druhy rodu *Solanum* - 5 druhů ve 187 klonech
- 5) Plané druhy rodu *Solanum* - 23 druhů ve 106 klonech
- 6) Mezidruhové hybridy rodu *Solanum* - 96 položek

Uvedený přehled dokumentuje, že v genové bance *in vitro* VÚB Havlíčkův Brod je uchovávána široká biodiverzita rodu *Solanum*. Vzorky odrůd *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*, tetraploidních kříženců *S. tuberosum*, dihaploidů, kulturních a planých druhů bramboru jsou dostupné pro šlechtitelská a výzkumná pracoviště a poskytují možnost výběru donorů významných hospodářských a šlechtitelských vlastností pro experimentální práci i novošlechtění. Detailně je biologický potenciál udržované genové banky popsán v publikaci (HORÁČKOVÁ, DOMKÁŘOVÁ, 2003).

Revitalizace a valorizace genové banky bramboru *in vitro*

Program revitalizace a valorizace vyplynul z potřeby zajistit v genové bance dodržování směrnic EU, konkrétně se jedná o Směrnice Komise 95/44/EC, aktualizované Směrnicí Komise 97/46/EC, které požadují otestování udržovaných materiálů vedle běžných virů, rovněž na přítomnost souboru karanténních škodlivých organismů, přinejmenším před jeho poskytnutím uživatelům, zejména šlechtitelům. Finanční podpora tohoto programu je garantována MZe ČR a probíhá od druhé poloviny roku 2001 na základě uzavřené smlouvy. Na řešení se podílí oddělení tkáňových kultur, virologie a genových zdrojů. Vedle testování materiálu v souladu s citovanými směrnici je náplní programu postupná eliminace běžných virů bramboru u napadených položek, s cílem převedení kolekce na bezvirovou úroveň (HORÁČKOVÁ *et al.* 2003).

Dosud bylo na požadované karanténní viry, viroidy a bakterie otestováno 365 položek a pozitivní nález některého z testovaných škodlivých organismů nebyl zaznamenán.

Uplatňované metody determinace, prováděné v referenční diagnostické laboratoři pro viry a virům podobné organismy bramboru ve VÚB Havlíčkův Brod, jsou plně v souladu s postupy stanovenými FAO/IPGRI Technical Guidelines.

Od zahájení programu aktivního ozdravování v kultuře *in vitro*, za využití chemoterapie pomocí Ribavirinu, se počet genotypů prostých běžných virů zvýšil z původních 1.157 (59,1%) na současných 1.453, což znamená, že 74,1% položek v kolekci je již viruprostých. Eliminace virů dále pokračuje a v různé fázi ozdravovacího cyklu se v současné době nachází 278 vzorků, tedy dalších 14,2%. Rozpracované série ozdravování budou postupně v průběhu roku 2004 dokončeny a následně v dalších letech zařazeno do ozdravování zbývajících 230 položek (11,7%), které dosud zůstávají napadeny virovými chorobami a na terapii teprve čekají.

Eradikační program genové banky bramboru předpokládá v horizontu několika let odstranění virové infekce u všech *in vitro* udržovaných materiálů a průběžné ozdravování všech nově zařazovaných genových zdrojů.

Vzhledem k tomu, že vegetativně množené brambory patří z hlediska ohrožení karanténními chorobami a škůdci mezi nejexponovanější plodiny, je pravidelná kontrola přítomnosti těchto patogenů všeobecnou nutností, která jediná může zabránit dalšímu šíření a

přenosu do zemí dosud bez výskytu těchto chorob. Program valorizace a revitalizace a možnost dokončit v následujících letech ozdravování a karanténní testování v celém rozsahu kolekce by pozvedlo českou genovou banku bramboru *in vitro* na kvalitativně vyšší úroveň, srovnatelnou s obdobnými genovými bankami ve světě. Současně by se zlepšila a urychlila možnost poskytování vzorků vyžádaných z naší kolekce zahraničními bankami (v roce 2003 – Německo, Francie, Belgie, Finsko), protože v řadě případů může být vzorek odeslán až po ozdravení a protestování na karanténní škodlivé činitele.

Závěr

V genové bance *in vitro* VÚB Havlíčkův Brod je uchovávána široká biodiverzita odrůd *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*, tetraploidních kříženců *S. tuberosum*, dihaploidů, kulturních a planých druhů bramboru. Materiály jsou dostupné pro šlechtitelská a výzkumná pracoviště a poskytují možnost výběru donorů významných šlechtitelských a hospodářských vlastností pro experimentální řešení i praktické šlechtění.

Literatura

- DĚDIČ, P.: Studium nových metod diagnózy virů a viroidů u brambor. (Závěrečná zpráva.) Havlíčkův Brod, VÚB, 1990
- DĚDIČ, P., PTÁČEK, J.: Exaktní diagnóza a charakterizace chorob virové etiologie u brambor. (Závěrečná zpráva), Havlíčkův Brod, VÚB, 1995
- DOMKÁŘOVÁ, J.: Genetické zdroje bramboru. (Závěrečná zpráva), Havlíčkův Brod, VÚB, 1995
- DOMKÁŘOVÁ, J.: Kartotéka odrůd světového sortimentu brambor - kolekce Výzkumného ústavu bramborářského Havlíčkův Brod, XVI. díl, 1999
- DOMKÁŘOVÁ, J.: Kartotéka odrůd světového sortimentu brambor - kolekce Výzkumného ústavu bramborářského Havlíčkův Brod, XVII. díl, 2003
- DOMKÁŘOVÁ, J., HORÁČKOVÁ, V.: The germplasm collection in the Czech Republic. In Report of a Working Group on Potato. First Meeting 23-25 March 2000, Wageningen, The Netherlands R. Hoekstra, L. Maggioni and E. Lipman, compilers, s. 13-17
- HOEKSTRA, R.: Conservation of potato genetic resources, a strategic activity. In: Abstracts of Papers and Posters. Potatoes Today and Tomorrow. 15th Triennial Conference of the EAPR. Hamburg 2002, July 14 – 19, s. 24
- HELDÁK, J.: Dlhodobé uchovávanie genotypov zemiakov v prostredí *in vitro*. In: Ochrana biodiverzity rastlín. Zborník referátov z vedeckej konferencie. VŠP Nitra 1995, s. 161 - 162
- HORÁČKOVÁ, V.: Eliminace viru S bramboru chemoterapií *in vitro* za použití Ribavirinu. Rostlinná výroba, č.44, 1998 (12), s. 539 – 544
- HORÁČKOVÁ, V., DOMKÁŘOVÁ, J.: Konzervace *in vitro*, její uplatnění u kolekce bramboru. In Metody konzervace genofondu rostlin a možnosti jejich využití v ČR. Sborník referátů ze semináře konaného 19. listopadu 1998 ve VÚRV Praha – Ruzyně. Praha, VÚRV 1998, s. 60 – 66
- HORÁČKOVÁ, V., DOMKÁŘOVÁ, J.: Vývoj a charakteristika genové banky bramboru *in vitro* ve VÚB Havlíčkův Brod. In: Vědecké práce 13 - Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, VÚB 1999, s. 58 – 68
- HORÁČKOVÁ, V., DOMKÁŘOVÁ, J.: Biologický potenciál genofondu bramboru udržovaného v genové bance *in vitro*. In: Vědecké práce 14 - Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, VÚB 2003, s. 87 – 101
- HORÁČKOVÁ, V., DĚDIČ, P., DOMKÁŘOVÁ, J., PTÁČEK, J.: Revitalizace a valorizace genové banky bramboru *in vitro*. Bramborářství č. 3, 2003, s. 8 – 10
- HUAMÁN, Z., HOEKSTRA, R., BAMBERG, J.B.: The inter – genebank potato database and the dimensions of available wild potato germplasm. American Journal of Potato Research, 77, 2000, č. 6, s. 353 – 362
- HUAMÁN, Z., SCHMIEDICHE, P.: The potato genetic resources held in trust by the International Potato Center (CIP) in Peru. Potato Research, 42, 1999, č. 3/4, s. 413 - 426

- KOSTŘICA, P., NOVÁK, F., KUČÍRKOVÁ, B., DĚDIČ, P.: Kolekce genových zdrojů bramboru v bance *in vitro*. (Závěrečná zpráva), Havlíčkův Brod, VÚB, 1995
- MIX-WAGNER, G.: Management of the *in vitro* Genebank for old potato cultivars at the Institute of Crop Science in Braunschweig. Landbauforschung - Völkenrode 46, 1996, s. 5 - 9
- MIX-WAGNER, G.: The conservation of potato cultivars. Potato Research, 42, 1999, č. 3/4, s. 427 - 436
- MURASHIGE, T., SKOOG, F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15, 1962, s. 473 – 497
- ROCA, W.M.: Tissue culture for the international transfer of potato genetic resources. Amer. Potato J. č.56, 1979, s.1 – 10
- SCHÜLER, K., HOEKSTRA, R.: Kartoffelgenbanken in Deutschland und der EU. Kartoffelbau, 48, 1997, s. 122 - 123
- STACE-SMITH, R., MELLOR, F.C.: Eradication of potato viruses X and S by thermotherapy and axillary buds culture. Phytopathol., 58, 1968, s. 199 – 223
- THIEME, R.: An *in vitro* potato cultivar collection: Microtuberization and storage of mikrotubers. Plant Genetic Resources Newsletter 88/89, 1992, s. 17 - 19
- TOMA, M.: Genobanka zemiakov udržiavaná na VŠÚZ vo Veľkej Lomnici. Zemiakár, 1997, č. 3/4, s. 8 - 10
- ZAKLUKIEWICZ, E., SEKRECKA, D. Kolekcja *in vitro* (bank genow) odmian ziemniaka jako zdroj zdrowych roślin ziemniaka. Ziemniak Polski, 4, 1994, s. 4 - 11

Kontaktní adresy autorů

Ing. Vendulka Horáková, CSc., Ing. Jaroslava Domkářová, PhD Výzkumný ústav bramborářský
Havlíčkův Brod s.r.o., Dobrovského 2366, 580 03 Havlíčkův Brod
E-mail: horackova@vubhb.cz, domkarova@vubhb.cz

Teoretické základy uchování rostlin a jejich částí v ultranízkých teplotách

Alois Bilavčík, Miloš Faltus, Jiří Zámečník

Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha 6 -Ruzyně

Souhrn

Uchování rostlin při ultranízkých teplotách, tj. kryoprezervace, je jedna z možností uchování genofondu rostlin. Kryoprezervace je skladování rostlinného materiálu v ultranízkých teplotách, většinou při teplotě tekutého dusíku (-196 °C). V buňkách rostlin jsou při této teplotě veškeré procesy téměř zastaveny a tím je lze uchovat po velmi dlouhou dobu. Tato metoda má význam hlavně pro uchování vegetativně množených druhů, u kterých lze rostliny z uchovaných pletiv dobře regenerovat. Výhodou kryoprezervace je především relativně vysoká jistota bezpečnosti uchování, malá náročnost na prostor a údržbu během uchovávání a nízké udržovací náklady kolekce oproti uchování rostlin v polních podmínkách.

Klíčová slova: konzervace, kryoprezervace, skelný stav, termická analýza, rostliny

Summary

Cryopreservation methods are based on storage of samples at low temperature at which practically neither chemical reactions and consequently neither aging nor genetic changes of plant material occur. During cooling and rewarming of samples there is a danger of crystallization and subsequent ice crystallization leading to frost damage. On the bases of the latest results from the field of molecular biology it is evident that the main factor influencing the success of cryopreservation method is the keeping of the glassy state in plant material and avoiding ice nucleation. Thus the majority of new progressive techniques uses and develops glassy state in biological material devoted for cryopreservation. We have the best results with cryoprotocols based on the biological glass formation in our laboratory.

Key words: conservation, cryopreservation, glass state, thermal analysis, plants

Úvod

V průběhu kryoprezervace jsou rostliny, především jejich meristematické části, vystavovány teplotám, se kterými se ve svém přirozeném prostředí nesetkávají. Pro úspěšné zvládnutí kryoprezervace je potřeba poznat a navodit v rostlinných pletivech takové procesy a stavy, které zvyšují jejich odolnost k celé řadě stresových faktorů (tvorba ledových krystalů v pletivech, dehydratace, apod.)

Fyzikální podstata přežití rostlin v ultranízkých teplotách

U rostlin, které jsou schopné tolerovat ledové krystaly ve svých pletivech, existují v principu dvě strategie pro přežití jejich pletiv, či částí v teplotách pod bodem mrazu. Prvním typem je vyhnutí se mrznutí vody (podchlazení, snížení bodu mrznutí) a druhým je tolerance extracelulárních ledových krystalů (LARCHER 1988).

Podchlazení se vyskytuje u celé řady rostlin a pletiv - parenchymatické buňky cévních svazků (BURKE *et al.* 1976, ASHWORTH a WISNIEWSKI 1991), či celé orgány - generativní pupeny u rybízu (WARMUND a kol, 1988), rododendronu (CHALKER-SCOTT 1992) jabloně (BILAVČÍK a ZÁMEČNÍK, 1996) nebo vegetativní pupeny různých druhů *Abies* (SAKAI 1978, 1979). Úroveň podchlazení může dosahovat až -41 °C (BURKE *et al.* 1976). Z hlediska termodynamických zákonů vyplývá, že pokud je podchlazená kapalina ochlazená pod bod teploty skelného přechodu - T_g, dojde u ní k tvorbě skla. MALONE a ASHWORTH (1991) zjistili, že mrazově velmi odolné dřeviny jsou schopné přežití v podchlazeném stavu po vystavení teplotě -196 °C. Při této teplotě buňky zůstávaly plně turgescenční a ani u nich nedošlo k selhání buněčných membrán. Tyto výsledky (HIRSH

1987) napovídají, že u těchto typů pletiv dochází ke tvorbě skel při jejich vystavení ultra nízkým teplotám. Obdobně HIRSH *et al.* (1985) a HIRSH (1987) zjistili, že u buněk větviček topolu dochází k tvorbě skel již při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Takto vysokou teplotu přechodu ve sklo zdůvodňují tím, že při vystavení mrazově odolných větviček topolu teplotě pod nulou u nich dochází k mrazové dehydrataci, během níž se koncentrují vodné roztoky, především bílkovin a cukrů (hlavně sacharózy, rafinózy a stachyózy).

Odolnost *in vitro* kultur k mrazu se zvýší otužováním - působením endogenních a exogenních podmínek (BALDWIN *et al.* 1998, PALONEN *et al.*, 2000). Otužení je předpokladem pro uchování materiálu v ultra nízkých teplotách. Pro zvýšení úrovně otužení je na kultivované rostliny v *in vitro* podmínkách obvykle aplikována nízká teplota ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$), krátký den 8/16 (světlo/tma), kyselina abscisová ($30 - 50\text{ }\mu\text{M}$) či vyšší koncentrace cukrů v médiu (8-14%) (BALDWIN *et al.* 1998).

Vodní deficit vyvolává v rostlinách četné metabolické změny. Vysoká akumulace prolinu je jednou z největších změn, které charakterizují stres v rostlinách (BARNETT a NAYLOR, 1966; STEINER a BIELKA, 1990). Obsah prolinu, který se zvyšuje rychleji než obsah jiných aminokyselin ve stresované rostlině, může být použit jako parametr pro měření fyziologického stresu nebo adaptace na něj (PALFI a JUHASZ, 1971). Při analýzách většího množství vzorků je vhodné použít jednoduché rychlé kolorimetrické metody pro stanovení obsahu prolinu, např. (BATES *et al.*, 1973). Touto metodou lze stanovit obsah prolinu v rozmezí $0,1 - 36,0\text{ }\mu\text{mol g}^{-1}$ čerstvého materiálu.

Skelný stav

Podle HIRSH (1987) je sklo kapalina s viskozitou pevné látky. WILLIAMS a LEOPOLD (1995) uvádí pro sklo termín viskózní kapalina nebo nezkrytalizovaná pevná látka. Pro sklo je charakteristická vysoká viskozita ($\sim 10^{13}\text{ Pa s}$) a s ní související pomalá difúze molekul. Sklo se dá detekovat různými metodami. Nejjednodušší, avšak ne plně spolehlivá a použitelná pouze pro čiré roztoky, je metoda vizuální – kdy se hodnotí průhlednost či zakalení. Dále je to metoda nízkoteplotní skenovací elektronové mikroskopie, nukleární magnetické rezonance a termické metody. Mezi nejvhodnější termické metody patří diferenční termická analýza (DTA), termomechanická analýza (TMA) a diferenční skenovací kalorimetrie (DSC). DSC patří mezi nejcitlivější metody pro sledování skelných přechodů (BORDE *et al.* 2002, KHALLOUFI *et al.*, 2000).

Sledování skel a ledových krystalů v rostlinných pletivech

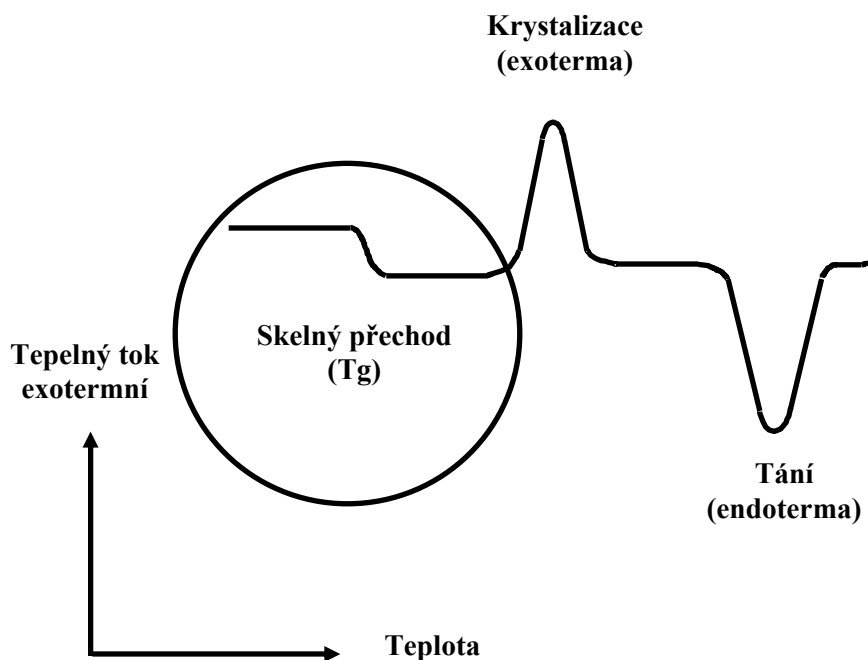
Metodami elektronové mikroskopie lze sledovat lokalizaci skelných a krystalických oblastí v rostlinných vzorcích. Skenovací elektronová mikroskopie používá systém nepřímého pozorování a snímání obrazu, kdy je objekt bodově bombardován úzkým svazkem elektronů v řádcích za sebou, detektor snímá vyražené sekundární elektrony a přes fotonásobič a zesilovač je signál na obrazovce řádkováním skládán zpět v celistvý obraz.

U nízkoteplotní mikroskopie je pozorován objekt při ultra nízké teplotě – LT SEM. Pro pozorování krystalických či amorfních stavů vody v zmrazeném objektu se užívá metoda mrazového lámání a mrazového leptání a poté je objekt sledován pomocí LT SEM při ultra nízké teplotě. Pro dosažení amorfního stavu vody v objektu se používá metoda vysokotlakého zmrazování (MOOR, 1987), při které se objekt zmrazí z laboratorní teploty do teploty kapalného dusíku za vysokého tlaku (více jak 200 MPa) za dobu v řádu desetin sekundy, přičemž se dosahuje rychlostí poklesu teploty na povrchu vzorku v cca $500\text{ }^{\circ}\text{C s}^{-1}$ (MOOR, 1987). Pokud je zamrazen objekt s relativně vysokým obsahem vody (přibližně $1\text{ g vody g sušiny}^{-1}$ a více), doporučuje se pro dosažení vitrifikovaného, t.j. skelného, stavu velikost objektu upravit na maximální tloušťku cca $0,2\text{ mm}$ (BACHMAN a MAYER, 1987). U objektů s větší tloušťkou již není z fyzikálního hlediska možno dosáhnout dostatečně

velkých rychlostí poklesu teploty uvnitř vzorku, aby bylo dosaženo skelného stavu (BACHMAN a MAYER, 1987).

Detekce a charakterizace skel pomocí – DSC

Diferenční skenovací kalorimetrie (DSC) je termická metoda, pomocí které lze měřit a definovat procesy fázových a skelných přeměn ve vzorcích. Pomocí DSC lze sledovat exotermické a endotermické charakteristiky a změny tepelné kapacity (Δc_p), viz. Obr.1.



Obr. 1 Termické charakteristiky vzorku sledované diferenční skenovací kalorimetrií (DSC) v průběhu ohřevu

Skelný přechod (T_g) se vyznačuje esovitým tvarem křivky, ve vzorku dochází ke změně tepelné kapacity. Při krystalizaci, či tání dochází k uvolnění, resp. absorpci tepla, přičemž v obou případech má křivka charakteristický tvar píku.

DSC lze využít ke stanovení skelného přechodu, teploty mrznutí, tání a varu, krystalizačního času a teploty, podílu krystalinity, specifické tepelné kapacity, reakčního tepla a tepla fúze, oxidační a teplotní stability, rychlosti a stupně tvrzení, reakční kinetiky a čistoty látek. Princip této metody spočívá ve vystavení vzorku řízenému poklesu či vzestupu teploty a měření tepla uvolněného nebo přijatého na dvou (eventuálně třech) měřených místech, z nichž na jednom, měřicím místě, je vzorek uzavřen v hliníkové pánvičce a na druhém, referenčním místě, je většinou prázdná pánvička. Teplo se buďto měří přímo, podle výkonu nutného dodat pro chlazení či ohřev měřicího místa, které se udržuje na stejné úrovni teploty jako referenční místo, anebo se vypočítává z teplot měřených na místě vzorku a reference. První systém se nazývá „power compensation“ DSC systém a druhý „heat flow“ DSC systém. Pomocí DSC lze měřit vzorky od teplot blížících se teplotám kapalného dusíku, řádově od $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ do teplot až $700\text{ }^{\circ}\text{C}$. Při DSC měření se standardně používá lineární rychlost chlazení a ohřevu. Vzhledem k časovému rozložení experimentů se používá nejčastěji rychlost $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Při charakterizaci skelného přechodu sledovaného materiálu se používají hodnoty skelného přechodu (T_g) získané především při ohřevu, protože při mrazení může docházet k podchlazení vzorku.

Množství uvolněného tepla ze vzorku po ledové nukleaci závisí jednak na navážce a dále na měrném skupenském teple tání látek ve vzorku (pro vodu je 335 J g^{-1}). Při ohřevu dochází k fázovému přechodu z pevného skupenství do kapalného pozvolněji a proto k výše zmíněným nelineárním rychlostem dochází v mnohem menší míře.

Kryoprezervace

Kryoprezervace je metoda uchovávání rostlin v ultra nízkých teplotách. Jedná se o technologii umožňující dlouhodobé uchovávání biologického materiálu při velmi nízké teplotě (nejčastěji v kapalném dusíku při -196°C), při zachování jeho životaschopnosti po přenesení do normálních podmínek. Pro uchovávání se používají jak vzrostné vrcholy či pupeny vegetativně množených rostlin, tak semena. Vzhledem k rychlosti mrazení, lze kryoprezervaci rozdělit do dvou metod: dvoustupňovou kryoprezervaci a vitifikaci (metoda založená na tvorbě biologických skel).

Jednotlivé metody a jejich popis jsou uvedeny v tomto sborníku v příspěvku FALTUS *et al.* s názvem Metody kryoprezervace. V této části se zaměříme na vysvětlení fyzikální podstaty a principu metod kryoprezervace. Dvoustupňová metoda je užívaná především pro kryoprezervaci takových rostlin, které jsou schopné otužení a přežití pod nulových teplot. Například se používá pro kryoprezervaci dormantních pupenů (STUSHNOFF, 1987; TYLER a STUSHNOFF, 1988). Princip této metody spočívá v pomalém snižování teploty do úrovně -30 až -40°C v prvním stupni, kdy dochází při rychlostech přibližně 2°C za hodinu k promrzání pletiv a k jejich mrazové dehydrataci. Poté následuje ekvilibrace po dobu 4 – 24 hodin na dosažené teplotě. Pro následné zamrazení do ultra nízkých teplot do kapalného dusíku (LN) je vhodné zamrazit dormantní pupeny v prvním stupni kryoprotokolu na co nejnižší teplotu, aby v jejich pletivech vymrzlo co nejvíce vody extracelulárně při pomalé rychlosti zamrazování, protože tato nevymrzlá voda by mohla v druhém stupni, ponořením do LN, způsobit poškození pletiv intracelulárním zmrznutím. Intracelulární mrznutí je pro buňky letální (GUSTA a FOWLER, 1977). Proto je nejvýhodnější optimalizovat teplotu, na kterou jsou vzorky zmrazovány v prvním stupni kryoprotokolu, například dormantních pupenů, na hodnotu po které již vzorky začínají ztrácet životnost. Odtátí vzorků probíhá po jejich vložení do teploty 5°C (ve vzduchu), kdy dojde k exponenciálnímu ohřevu vzorků (s počáteční rychlostí desítky $^\circ\text{C}$ za minutu). Po odtátí jsou vzorky, dormantní pupeny, regenerovány buďto očkováním na podnože (SEUFFERHELD *et al.*, 1991) anebo převodem do *in vitro* podmínek (SUZUKI *et al.*, 1997).

Vitifikace (SAKAI *et al.* 1991) je založena na tvorbě skel během co nejrychlejšího zamrazení vzorků do ultra nízkých teplot (řádově sta až tisíce stupňů Celsia za minutu). Této rychlosti poklesu teploty se dosahuje ponořením vzorku do LN.

Existuje mnoho modifikací vitrifikační metody kryoprezervace, které se liší především typem použitého kryoprotektantu, ošetřením rostlin před a po vlastní kryoprezervaci a způsobem dehydratace vzorků. Ošetření před vlastní kryoprezervací spočívá především v otužování rostlin nízkou teplotou (REED 1989, BILAVČÍK *et al.* 1999) působením kryoprotektních roztoků (většinou sacharidů) (GROSPIETSCH *et al.* 1999).

Existují tři hlavní modifikace vitrifikačního protokolu kryoprezervace.

První je **enkaspulačně dehydratační** postup, při kterém se vzrostné vrcholy obalují - enkapsulují v alginátu sodném a poté se dehydratují většinou nad silikagelem (GROSPIETSCH *et al.* 1999b) nebo v proudu sterilního vzduchu (DEREUDRE *et al.* 1991) na úroveň, při které dochází v rostlinných pletivech k tvorbě skla a nejsou již detekovány ledové krystaly. Enkapsulované vzorky jsou poté ponořeny do LN. Odtátí probíhá rychlým ponořením do 40°C teplé vody na 1-2 minuty a následuje regenerace v *in vitro* podmínkách. Velmi rychlé odtátí zajišťuje co nejrychlejší překlenutí teplotní zóny, ve které se mohou tvořit a růst ledové krystaly.

Druhým typem kryoprezervačních metod je metoda používající **vitrifikačních roztoků**, při které jsou vzorky vystaveny řádově hodinovým působením silně koncentrovaných kryoprotektivních směsí a poté ponořeny do tekutého dusíku. Vitrifikační roztoky obsahují různé kryoprotektanty. Z řady různých směsí kryoprotektivních látek jsou nejpoužívanější následující tři vitrifikační roztoky. SAKAI *et al.* (1991) používá PVS2 (z anglického Plant Vitrification Solution) roztok o složení etylenglykol (15% w/v), glycerol (30% w/v) a DMSO (15% w/v) ve 0,4M sacharóze. Obdobný je vitrifikační roztok MPVS (Malus Plant Vitrification Solution) - SEUFFERHELD *et al.* (1991) (k PVS2 přidán propylenglykol). LANGIS a STEPONKUS (1990) používá roztok o složení: etylenglykol (24% w/v), sorbitol (30% w/v) a hovězí sérum albumin (30% w/v) ve vodě. Odtátí je v těchto případech provedeno ponořením do 40 °C teplé vody na 1-2 minuty s následným vymýváním kryoprotektivní směsí (převážně fytotoxického DMSO) sestupnou řadou sacharózových (SAKAI *et al.*, 1991) či sorbitolových (LANGIS *et al.* 1989) roztoků (od 1,2 M až po 0,2 M). Regenerace rostlin probíhá v *in vitro* podmínkách.

Třetím typem kryoprezervačních metod je **kapková metoda**, kdy je v *in vitro* předošetřený extirpovaný vzrostný vrchol umístěn na aluminiový plíšek do kapky s kryoprotektantem, většinou DMSO (10% v/v) (SCHAFFER-MENUHR 1996) a ponořen přímo do LN (SCHAFFER-MENUHR 1996, GROSPIETSCH a ZÁMEČNÍK, 2001). Odtátí je provedeno rychle – ponořením plíšku s kapkami se vzrostnými vrcholy do 40 °C teplé sterilní vody nebo MS média. Následně se vzrostné vrcholy nasadí na regenerační médium a hodnotí v *in vitro* podmínkách.

Pro hodnocení rostlin po jejich vystavení teplotám tekutého dusíku se používá vizuální stupnice úrovně poškození či exaktní měření poškození buněk. Nejdůležitějším ukazatelem úspěšného kryoprotokolu je regenerace rostlin *de novo*.

Závěr

Podstatou všech kryoprezervačních metod je uchování vzorků při nízké teplotě, při které již nedochází k žádným chemickým reakcím a tím ani k stárnutí a ke genetickým změnám uloženého rostlinného materiálu. V průběhu zmrazování a ohřevu vzorků však hrozí velké nebezpečí krystalizace a následně mrazového poškození. Na základě nejnovějších poznatků o molekulární podstatě stavu biologického pletiva je zřejmé, že nejpodstatnějším faktorem ovlivňující úspěšnou kryoprezervaci rostlin je uchování skelného stavu ve vzorcích a zabránění ledové krystalizaci. Proto většina nových a progresivních metod používá a rozvíjí zákonitosti tvorby skel v biologickém materiálu určeném pro kryoprezervaci. S kryoprezervačními protokoly zakládající se na tvorbě biologických skel máme v našich podmínkách nejlepší zkušenosti.

Poděkování

Práce na tomto článku byla částečně podporována výzkumným záměrem Ministerstva zemědělství ČR MZE 0002700602 a projektem Grantové Agentury ČR 522/04/0384.

Literatura

- ASHWORTH EN, WISNIEWSKI ME (1991) Response of fruit tree tissues to freezing temperatures. In proceedings: Breeding fruit crops for cold climates, 85th ASHS Annual Meeting/33rd CSHS Annual Meeting East Lansing, Mich. 1988. HortSci 26:501-504
- BACHMAN L, MAYER E (1987) Physics of water and ice: implications for cryofixations. In RA Steinbrecht, K Zierold, eds, Cryotechniques in biological electron microscopy, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 3-34
- BALDWIN BD, BANDRA NS, TANINO KK (1998) Is tissue culture a viable system with which to examine environmental and hormonal regulation of cold acclimation in woody plants? Physiol Plant 102:201-209

- BARNET NM, NAYLOR AW (1996) Environmental signals, receptors, physiological and genetic regulation in plant. *Plant Physiol* 41:1222
- BATES LS WALDREN RP, TEARE ID (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39:205-207
- BILAVČÍK A, ZÁMEČNÍK J (1996) Localization of Endogenous Ice Nuclei in Flowering Apple Shoots, *Biologia* 51(1):62-63
- BILAVČÍK A, LYNCH PT, ZÁMEČNÍK J (1999) The effect of cultivation conditions on frost hardiness of apple *in vitro* culture. *Biologia* 54:72-73
- BORDE B, BIZOT H, VIGIE G, BULEON A (2002) Calorimetric analysis of the structural relaxation in partially hydrated amorphous polysaccharides. I. Glass transition and fragility, *Carbohydr Polym* 48:83-96
- BURKE MJ, GUSTA LV, QUAMME HA, WEISER CJ, LI PH (1976) Freezing and injury in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol* 27:507-528
- DEREUDDRE J, HASSEN N, BLANDIN S, KAMINSKI M (1991) Resistance of alginate-coated somatic embryos of carrot (*Daucus carota* L.), to desiccation and freezing in liquid nitrogen. 2. Thermal analysis, *Cryo-Lett* 12:135-148
- GROSPIETSCH M, ZÁMEČNÍK J (2001) Cryopreservation of potato (*Solanum tuberosum* L.), In proceedings Crop Science on the Verge of the 21st Century – Opportunities and Challenges, Research Institute of Crop Production Prague, Prague, 11-13 September, 2001, Czech Republic, p 25
- GROSPIETSCH M, STODŮLKOVÁ E, ZÁMEČNÍK J (1999) Effect of osmotic stress on the dehydration tolerance and cryopreservation of *Solanum tuberosum* shoot tips. *Cryo-Lett* 20:339-346
- GUSTA A FOWLER, 1977
- HIRSH AG (1987) Vitrification in plants as a natural form of cryoprotection. *Cryobiology* 24:241-228
- HIRSH AG, WILLIAMS RJ, MERYMAN HT (1985) A novel method of natural cryopreservation: intracellular glass formation in deeply frozen *Populus*. *Plant Physiol* 79:41-56
- CHALKER-SCOTT L (1992) Disruption of an ice-nucleation barrier in cold hardy *Azalea* buds by sublethal heat stress. *Annals of Botany* 70:409-418
- KHALLOUFI S, ELMASLOUHI Y, RATTI C, (2000) Mathematical model for prediction of glass transition temperature of fruit powders. *J. Food Sci* 65:842-848
- LANGIS R, SCHNABEL B, EARLE ED, STEPONKUS PL (1989) Cryopreservation of *Brassica campestris* L. cell suspensions by vitrification. *Cryo-Lett* 10:421-428
- LANGIS R, STEPONKUS PL (1990) Cryopreservation of rye protoplasts by vitrification. *Plant Physiol* 92:666-671
- LARCHER W (1988) Fyziologická ekologie rostlin. Academia Praha
- LEVITT J (1980) Responses of Plants to Environmental Stresses. In J Lewitt, ed, Chilling, freezing and high temperature stresses. Academic Press, New York, p 497
- MALONE SR, ASHWORTH EN (1991) Freezing stress response in woody tissues observed using low-temperature scanning electron microscopy and freeze substitution techniques. *Plant Physiol* 95:871-881
- MOOR H (1987) Theory and practice of high pressure freezing. In RA Steinbrecht, K Zierold, eds, Cryotechniques in biological electron microscopy, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 175-191
- PALFI G, JUHASZ J (1971) The theoretical basic and practical application of a new method of selection for determining water deficiency in plant. *Plant and Soil* 34:503-507
- PALONEN P, BUSZARD D, DONNELLY (2000) Changes in carbohydrates and freezing tolerance during cold acclimation of red raspberry cultivars grown *in vitro* and *in vivo*. *Physiol Plant* 100:393-401
- REED BM (1989) The effect of cold hardening and cooling rate on the survival of apical meristems of *Vaccinium* species frozen in liquid nitrogen. *Cryo-Lett* 10:315-322
- SAKAI A (1978) Low temperature exotherms of winter buds of hardy conifers. *Plant Cell Physiol* 19:1439-1446
- SAKAI A (1979) Freezing avoidance mechanism of primordial shoots of conifer buds. *Plant Cell Physiol* 20:1381-1390

- SAKAI A, KOBAYASHI S, OYAMA I (1991) Survival by vitrification of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* var. *brasiliensis* Tanaka) cooled to -196°C . J. Plant Physiol 137:465-470
- SEUFFERHELD MJ, FITZPATRICK J, WALSH TM, STUSHNOFF C (1991) Cryopreservation of dormant buds from cold tender taxa using a modified vitrification procedure. In proceedings: 28th Annual Cryobiology Meeting, Cryobiology 28:576
- SCHAFER - MENUHR A (1996) Refinement of cryopreservation techniques for potato. Final Report for the period September 1, 1991 – August 31, 1996, p 41
- STEINERT A, BIELKA S (1990) Determination of free proline in stressed plants. Archiv für Zuchtungsforschung 20:199-204
- STUSHNOFF C (1987) Cryopreservation of apple genetic resources. Can J Plant Sci 67:1151-1154
- SUZUKI M, NIINO T, AKIHAMA T, OKA S (1997) Shoot formation and plant regeneration of vegetative pear buds cryopreserved at -150°C . J Japan Soc Hort Sci 66:29-34
- TYLER NJ, STUSHNOFF C (1988) The effects of prefreezing and controlled dehydration on cryopreservation of dormant vegetative apple buds. Can J Plant Sci 68:1163-1167
- WARMUND MR, GEORGE MF, CUMBIE BG (1988) Supercooling in 'Darrow' blackberry buds. J Amer Soc Hort Sci 113:418-422
- WILLIAMS RJ, LEOPOLD AC (1995) Changes in glass transition temperatures in germinating pea seeds 1995 Seed Science Research 5:117-120

Kontaktní adresy autorů

RNDr. Alois Bilavčík, PhD, Ing. Miloš Faltus, PhD, Ing. Jiří Zámečník, CSc.
Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně
E-mail: bilavcik@vurv.cz, faltus@vurv.cz, zamecnik@vurv.cz

Metody kryoprezervace

Miloš Faltus, Jiří Zámečník, Alois Bilavčík

Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha 6 - Ruzyně

Souhrn

V příspěvku jsou popsány základní principy metod kryoprezervace. Kryoprezervace je uchování vzorků při utranízkých teplotách, obvykle při teplotě bodu varu tekutého dusíku, tedy při $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Existují dvě základní metody kryoprezervace – klasická a vitrifikační. Klasická metoda spočívá v řízeném mrznutí vzorků, kdy dochází k extracelulární tvorbě ledových krystalů a vymrzání vody z pletiv. Vitrifikační metoda je založena na tvorbě skla, tedy amorfni pevné hmoty, která umožňuje překonání ultranízkých teplot bez poškození vzorků. V přehledu jsou popsány principy čtyř základních vitrifikačních postupů a další modifikace těchto metod s příklady jejich použití.

Klíčová slova: kryoprezervace, vitrifikace, desikace, enkapsulace-dehydratace

Summary

Basic principles of cryopreservation methods are introduced. Cryopreservation means maintenance of samples at ultra-low temperature, usually at the temperature of liquid nitrogen ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$). There are two basic cryopreservation methods: classical and vitrification. The classical method is based on controlled freezing of samples and extracellular ice formation together with freezing dehydration of tissues. The vitrification method is based on production of glass, amorphous solid matter, which allows withstanding ultra-low temperatures and consequent rewarming without sample damage. Principles of four basic vitrification procedures and their modifications together with examples of their applications are reviewed.

Key words: cryopreservation, vitrification, desiccation, encapsulation-dehydration

Úvod

Jednou z metod uchování genetického materiálu *ex situ* je metoda kryoprezervace. Tato metoda je založena na uložení genetického materiálu v tekutém dusíku, tedy při utranízkých teplotách, a to buď v parách dusíku při teplotě kolem $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo přímo v tekutém dusíku při teplotě $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Uplatnění této metody je vhodné především v případě, kdy nelze použít dlouhodobé uchování genotypů pomocí semen. To znamená u vegetativně množených rostlin a u rostlin množících se semeny, ale poskytujících rekalcitrantní semena. U vegetativně množených druhů je tato metoda velmi efektivní a bylo vyvinuto mnoho protokolů pro kryoprezervaci kořenových a hlíznatých plodin, ovocných a okrasných druhů z oblastí mírného i tropického podnebí.

Při vývoji a aplikaci kryoprezervačních postupů je třeba překonávat dva hlavní problémy spojené s uchováním materiálu v tekutém dusíku. Jednak je to problematika mrznutí a tvorby ledových krystalů. V případě, že metoda umožňuje nebo předpokládá tvorbu ledových krystalů při kryoprezervačním protokolu (klasické metody kryoprezervace), vždy se musí jednat o mrznutí extracelulární; opak, tedy mrznutí intracelulární vede ke smrti buněk. Extracelulárního mrznutí vody lze dosáhnout především otužením materiálu a poklesem obsahu vody v pletivech.

Druhým problémem kryoprezervačních postupů může být silná dehydratace buněk, která vede k jejich poškození. Na jedné straně je dehydratace buněk nezbytná pro zabránění tvorby ledových krystalů při zchlazování materiálu, ale na druhé straně může dojít k příliš silné dehydrataci, ať už při sušení vzorků, při ovlivnění kryoprotektivními látkami nebo při vymrzání vody z buněk při extracelulárním mrznutí.

Nové kryoprezervační postupy jsou založeny na vitrifikaci uchovávaného materiálu, dosažené při velmi rychlých poklesech teploty. Vitrifikace je fyzikální proces, který může být definován jako fázový přechod vodného roztoku z tekutiny do amorfni skelné pevné hmoty,

nebo skla, při teplotě skelného přechodu (T_g), při vyloučení krystalizace ledu. Sklo se tvoří v pletivech a během dehydratace může pomoci zabránit následnému poškození pletiv, koncentraci roztoků a změny pH. Nad sklem je nižší tlak vodní páry než nad krystaly ledu a tak je zabráněno další dehydrataci pletiv. Sklo je vysoce viskózní a prakticky zastavuje veškeré chemické reakce, které vyžadují molekulární difúzi. Tvorba skla může vést k zastavení biochemických procesů a genetické stabilitě po dlouhou dobu (BURKE, 1986).

Pro úspěšnou kryoprezervaci je nezbytné se vyhnout letálnímu intracelulárnímu mrznutí, ke kterému dochází během rychlého mrznutí v tekutém dusíku. Vzorky proto musí být dostatečně dehydratované, aby se předešlo intracelulárnímu mrznutí a došlo k vitrifikaci za rychlého mrznutí v tekutém dusíku. Vitrifikace je dosud jediný známý mechanismus, který umožňuje hydratovaným buňkám, tkáním a orgánům přežít teplotu tekutého dusíku (SAKAI, 1960, 1965, 1995). Podrobnější výklad podstaty kryoprezervace a vitrifikace je popsán v tomto sborníku v příspěvku BILAVČÍK *et al.* s názvem Teoretické základy uchování rostlin a jejich částí v ultranízkých teplotách.

Metody kryoprezervace

Metody kryoprezervace lze rozdělit na základě tvorby krystalů, respektive skla ve vzorcích, na klasické metody a metody založené na vitrifikaci.

Klasické metody

Klasické metody nebo také metody řízeného, případně dvoustupňového mrznutí, jsou jedny z prvních použitých metod. Jak napovídá jedno z jejich označení, postup kryoprezervace spočívá ve dvou stupních. V prvním stupni dochází k pomalému, řízenému zchlazování materiálu, kdy dochází k iniciaci extracelulárního mrznutí a postupně k vymrzání volné vody z buněk. Pokles teploty se zastaví na přesně definované teplotě, která ještě není pro materiál letální, ale umožní dostatečnou dehydrataci vzorku. Pak následuje druhý stupeň, kdy je používán rychlý pokles teploty až na teplotu tekutého dusíku. Výhodou této metody je využití přirozené schopnosti rostlin se otužit nízkým teplotám a přirozená, neletální, dehydratace buněk. Tato metoda má ovšem jistá omezení. Jednak je to metoda náročná na přístrojové vybavení. Je třeba mít k dispozici poměrně nákladné zařízení pro programovatelné mrznutí. Dále je metoda omezena i okruhem rostlin, pro které lze tuto metodu použít. Jsou to především rostliny, které jsou schopny otužení vůči mrazu. U diferencovaných pletiv byly tyto techniky použity pro mrznutí vrcholů mrazuvzdorných druhů (REED a CHANG, 1997). Využití u tropických druhů je spíše výjimečné (ESCOBAR *et al.*, 1997). Klasické metody byly použity i u nediferencovaných systémů, jako jsou buněčné suspenze a kalusy (KARTHA a ENGELMANN, 1994; WITHERS a ENGELMANN, 1997).

Vitrifikační metody

Vitrifikační metody jsou založeny na tvorbě skla a vyhnutí se tvorbě ledových krystalů v pletivech. Základem metod založených na vitrifikaci je dehydratace buněk před zamrazením vystavením vzorků koncentrovaným kryoprotektivním roztokům ve většině případů nebo jejich desikace. Pak následuje rychlé zamrazení. Výsledkem je, že všechny faktory, které ovlivňují tvorbu intracelulárního ledu, jsou omezeny. Skelné přechody během mrznutí a ohřevu byly zaznamenány u různých materiálů pomocí termické analýzy (SAKAI *et al.* 1990; DEREUDDRE *et al.* 1991; TANNOURY *et al.* 1991; NIINO *et al.* 1992). DUMET *et al.* (1993b) prokázal, že zvýšené přežití somatických embryí olejové palmy po kryoprezervaci souviselo s poklesem množství krystalizující vody a naopak s nárůstem vodní fáze přecházející do skelného stavu. Vitrifikační metody nabízejí praktické výhody ve srovnání s klasickými metodami (STEPONKUS *et al.* 1992). Jsou vhodnější pro kryoprezervaci komplexních orgánů (vegetační vrcholy, embrya), které obsahují různé typy buněk, každé

s jinými požadavky při použití klasických metod. Vyloučením tvorby ledových krystalů při použití vitrifikačních metod jsou pracovně méně náročné než klasické metody (nevyžadují programovatelné zmrazovače) a mají vyšší potenciál pro širokou použitelnost vyžadující pouze malé modifikace pro různé typy buněk (ENGELMANN 1997b).

Společným rysem všech těchto nových kryoprotokolů je, že kritickým krokem k dosažení přežití je krok dehydratace a ne mrznutí jako v případě klasických kryoprotokolů. Proto, jestliže jsou vzorky určené pro kryoprezervaci schopné desikace na dostatečně nízkou úroveň obsahu vody s minimálním nebo žádným poklesem životnosti, pak je obvykle dosahována vysoká životnost i po kryoprezervaci (ENGELMANN 1997b).

Existují čtyři základní metody kryoprezervace založené na vitrifikaci:

- 1) enkapsulace-dehydratace
- 2) metoda vitrifikační s použitím chemických kryoprotektantů
- 3) metoda desikace
- 4) metoda ultra-rychlého mrznutí

Dále existují další modifikace a kombinace metod základních:

- metoda enkapsulace-vitrifikace
- metoda předkultivace
- metoda předkultivace-desikace
- kapková metoda

Metoda enkapsulace-dehydratace

Tato metoda je založena na technologii vyvinuté pro produkci umělých semen. Rostlinný materiál je enkapsulován do alginátových kuliček a může být dále kultivován na mediu se sacharosou 1 až 7 dní. Alginátové kuličky jsou pak částečně desikovány v proudu vzduchu v laminárním boxu nebo nad silikagelem na obsah vody asi 20 % a pak rychle zamrznou. Přežití materiálu bývá vysoké a růst po kryoprezervaci rychlý a přímý bez tvorby kalusu. Tato metoda byla aplikována na řadu plodin mírného i tropického klimatu (ENGELMANN 1997b) a je použitelná i na buněčné suspenze a somatická embrya (TESSERAU *et al.* 1994; BACHIRI *et al.* 1995).

Výhodou této metody je, že není třeba speciálního vybavení a ke snížení obsahu vody se využívá přirozeného způsobu osmotického působení a desikace bez chemických kryoprotektantů. Nevýhodou může být, že některé genotypy nesnášejí vysokou koncentraci sacharosy použitou při této metodě. Kritickým faktorem této metody je stupeň dehydratace materiálu, a proto ji nelze použít u těch genotypů, které netolerují nízký obsah vody v pletivech.

Vitrifikační metoda

Další metoda je označována jako metoda vitrifikační v užším slova smyslu. Tato metoda využívá aplikaci vysoce koncentrovaných vitrifikačních roztoků (glycerol, DMSO, poly- a ethylen- glykoly) k dehydrataci materiálu následované rychlým mrznutím doprovázeném tvorbou skla. Při odtávání materiálu po rychlém ohřevu následuje vymytí kryoprotektantů a regenerace. Tento postup byl vyvinut pro vegetační vrcholy, buněčné suspenze a somatická embrya mnoha různých druhů (SAKAI, 1995, 1997).

Výhodou metody je, že není náročná na přístrojové vybavení a čas a je možné kryoprezervovat rostliny i bez jejich otužování. Nevýhodou je toxicita některých kryoprotektantů a jejich potenciální negativní vliv na genetickou stabilitu.

Metoda enkapsulace-vitrifikace.

Tato metoda je kombinací metody enkapsulace-dehydratace a vitrificační metody, kdy jsou vzorky enkapsulovány do alginátových kuliček a dehydratovány působením chemických kryoprotektantů. Tato metoda je vhodná pro materiál, u něhož nelze použít postup dehydratace pomocí klasické metody enkapsulace-dehydratace. Byla použita např. u karafiátů, (TANNOURY *et al.*, 1991) lilií, wasabi a *Armoracia* (SAKAI, 1997).

Metoda desikace

Metoda desikace je nejjednodušší metodou, která spočívá v dehydrataci explantátů a rychlém zmrazení přímým ponořením do tekutého dusíku. Tuto metodu lze použít u materiálu, který odolává silné dehydrataci. Používá se např. u zygotických embryí nebo jejich částí získaných ze semen a u pupenů ovocných dřevin. Byla aplikovaná na embrya velkého počtu rekalcitrantních semen (ENGELMANN 1997a). Desikace se provádí obvykle v proudu vzduchu laminárního boxu nebo přesněji a reprodukovatelněji jsou podmínky dehydratace dosaženy použitím sterilního stlačeného vzduchu nebo silikagelu. Ultrarychlé sušení v proudu stlačeného suchého vzduchu umožňuje kryoprezervaci vzorků s relativně vysokým obsahem vody, a tak snížit poškození způsobené desikací samotnou (BERJAK *et al.*, 1989; WESLEY–SMITH *et al.*, 1992). Optimální stupně přežití jsou obecně dosaženy, když jsou vzorky mrazeny s obsahem vody mezi 10 a 20 %.

Metoda ultrarychlého mrznutí

Tato metoda je založena na použití malých vzorků a jejich přímém ponoření do tekutého dusíku. Tím je dosaženo velmi vysoké rychlosti poklesu teploty (více než 1000 °C za minutu). To umožňuje tvorbu skla v pletivech bez vzniku ledových krystalů. Pro omezení tvorby ledových krystalů jsou vzorky před ponořením do tekutého dusíku dehydratovány osmoticky, desikací (ve flowboxu nebo nad silikagelem) nebo aplikací kryoprotektantů. Výhodou této metody je její jednoduchost a nenáročnost na přístrojové vybavení.

Kapková metoda

Kapková metoda je jednou z modifikací metody ultrarychlého mrznutí. Tato metoda je používána například u vegetativních vrcholů bramboru (SCHÄFER–MENUHR, 1996). Vrcholy jsou syceny v tekutém kryoprotektivním mediu (10% DMSO) a pak umístěny na hliníkové plíšky do kapek kryoprotektantu a zamrazeny přímo ponořením do tekutého dusíku. Mírně modifikovaná byla tato metoda úspěšně vyzkoušena i u chryzantémy (HALMAGYI *et al.*, 2004).

Metoda předkultivace

Tato metoda spočívá v kultivaci vzorků v přítomnosti kryoprotektantů a samotné mrazení se provádí rychlým ponořením vzorků do tekutého dusíku. Tato metoda byla použita například pro vegetační vrcholy banánovníku (PANIS 1995).

Metoda předkultivace-desikace

Tato metoda je modifikací předchozích metod. Explantáty jsou předpěstovány v přítomnosti kryoprotektantů, následně dehydratovány ve flowboxu nebo nad silikagelem a pak rychle zamrazeny. Tato metoda byla aplikována na stonkové segmenty chřestu, somatická embrya olejové palmy a zygotická embrya kokosu (URAGANU *et al.*, 1990; ASSY–BAH a ENGELMANN, 1992; DUMET *et al.*, 1993a).

Tato metoda byla úspěšně použita i u bramboru (GROSPIETSCH *et al.*, 1999). Nodální segmenty bramboru jsou před samotnou procedurou kryoprezervace kultivovány 5 dní

s přidavkem 2 M sacharosy. Izolované vrcholy jsou syceny na 0,7 M sacharose přes noc a pak následuje desikace nad silikagelem a zamrazení přímým ponořením vrcholů do dusíku.

Závěr

Během posledních 10 let došlo k významnému posunu na poli kryoprezervace rostlin. Došlo zejména k rozvoji nových kryoprezervačních technik založených na vitifikaci uchovávaného materiálu. Důležitou výhodou těchto nových technik je jejich nenáročnost na přístrojové vybavení, což umožňuje jejich rozšíření i v rozvíjejících se zemích v tropických oblastech, kde je nejvyšší zastoupení druhů rostlin problémových z hlediska uchování biodiverzity.

Pro mnoho vegetativně množených druhů jsou kryoprezervační metody dostatečné, aby je bylo možné použít rutinně v kryobankách. Zatím určitou nevýhodou může být skutečnost, že daná metoda nemusí být zcela univerzální pro všechny genotypy v rámci jedné plodiny a je nutné kryoprezervační postupy pro tyto genotypy nadále optimalizovat. Na druhou stranu se nabízejí nové přístupy, jako např. metody termické analýzy pro studium tvorby skel ve studovaném materiálu, a tím i možnost optimalizovat kryoprezervační postupy.

Poděkování

Práce na tomto článku byla částečně podporována grantem GAČR 522/02/D089 a projektem MZe ČR QF 3039.

Literatura

- ASSY-BAH, B., ENGELMANN, F.: Cryopreservation of mature embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.) and subsequent regeneration of plantlets. *Cryo-Letters* 13, 117–26, 1992
- BACHIRI, Y., GAZEAU, C., HANSZ, J., MORISSET C., DEREUDDRE, J.: Successful cryopreservation of suspension cells by encapsulation-dehydration. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 43, 241–248, 1995
- BERJAK, P., FARRANT, J.M., MYCOCK, D.J., PAMMENTER, N.W.: Homoiohydrous (recalcitrant) seeds: the enigma of their desiccation sensitivity and the state of water in axes of *Landolphia kirkii* Dyer. *Planta* 186, 249–261, 1989
- BURKE, M.J.: The glassy state and survival of anhydrous biological systems. In: *Membranes, Metabolism, and Dry Organisms*. A.C. Leopold, ed. Comstock, Cornell Univ. Press, Ithaca and London. 358–363, 1986
- DEREUDDRE, J., HASSEN, M., BLANDIN, S., KAMINSKI, M.: Resistance of alginate-coated somatic embryos of carrot (*Daucus carota* L.) to desiccation and freezing in liquid nitrogen: 2. thermal analysis. *Cryo-Letters* 12, 135–148, 1991
- DUMET, D., ENGELMANN, F., CHABRILLANGE, N., DUVAL, Y.: Cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos involving a desiccation step. *Plant Cell Reports* 12, 352–355, 1993a
- DUMET, D., ENGELMANN, F., CHABRILLANGE, N., DUVAL, Y., DEREUDDRE, J.: Importance of sucrose for the acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm somatic embryos. *Cryo-Letters* 14, 243–250, 1993b
- ENGELMANN, F.: Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species. *Plant Genetic Resources Newsletter* 112, 9–18, 1997a
- ENGELMANN, F.: *In vitro* conservation methods. In B.V. Ford-Lloyd, J.H. Newbury and J.A. Callow (eds.), *Biotechnology and Plant Genetic Resources: Conservation and Use*. CABI, Wallingford, 119–162, 1997b
- ESCOBAR, R.H., MAFLA, G., ROCA W.M.: A methodology for recovering cassava plants from shoot tips maintained in liquid nitrogen. *Plant Cell Reports* 16, 474–478, 1997
- GROSPIETSCH M., STODULKOVÁ, E. A ZÁMEČNÍK, J.: Effect of osmotic stress on the dehydration tolerance of *Solanum tuberosum* shoot tips. *CryoLetters* 20, 339–346, 1999

- HALMAGYI, A., FISCHER-KLÜVER, G., MIX-WAGNER, G., SCHUMACHER, H., M.: Cryopreservation of *Chrysanthemum morifolium* (*Dendranthema grandiflora* Ramat.) using different approaches, *Plant Cell Reports*, 22, 371–375, 2004
- KARTHA, K.K., ENGELMANN, F.: Cryopreservation and germplasm storage. In: Vasil, I.K. and Thorpe, T.A. (Eds.) *Plant cell and tissue culture*, Kluwer, Dordrecht, 195–230, 1994
- NIINO, T., SAKAI, A., YAKUWA, H., NOJIRI, K.: Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of apple and pear by vitrification. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 28, 261–266, 1992
- PANIS, B.: Cryopreservation of banana (*Musa* spp.) germplasm. *Dissertationes de Agricultura*, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium, 1995
- SAKAI, A.: Survival of the twig of woody plants at -196°C . *Nature*, 185, 393–394, 1960
- SAKAI, A.: Determining the degree of frost-hardiness in highly hardy plants. *Nature*, 206, 1064–1065, 1965
- SAKAI, A., KOBAYASHI, S. AND OIYAMA, I.: Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell reports*, 9, 30–33, 1990.
- SAKAI, A.: Cryopreservation for germplasm collection in woody plants. In: Jain, S., Gupta, P. and Newton, R. (Eds.), *Somatic embryogenesis in woody plants*, Vol. 1, Kluwer, Dordrecht, 293–315, 1995
- SAKAI, A.: Potentially valuable cryogenic procedures for cryopreservation of cultured plant meristems. In: *Conservation of Plant Genetic Resources In Vitro*. Volume 1: General Aspects. M.K. Razdan and E.C. Cocking (eds.). Science Publishers Inc., Enfield, USA, 53–66, 1997
- SCHÄFER-MENUHR, A.: Refinement of cryopreservation techniques for potato. Final Report for the period 1 Sept. 1991–31 Aug. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, 1996
- STEPONKUS, P.L., LANGIS, R., FUJIKAWA, S.: Cryopreservation of plant tissues by vitrification. In: *Advances in Low-Temperature Biology*, Vol. 1. P.L. Steponkus (ed.). JAI Press Ltd., Hampton Mill, UK., 1–61, 1992
- TANNOURY, M., RALAMBOSOA, J., KAMINSKI, M., DEREUDDRE, J.: Cryopreservation by vitrification of coated shoot-tips of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) cultured *in vitro*, *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, Paris 313, Série III, 633–638, 1991
- TESSERAU, H., FLORIN, B., MESCHINE, M.C., THIERRY, C., PÉTIARD, V.: Cryopreservation of somatic embryos: a tool for germplasm storage and commercial delivery of selected plants. *Annals of Botany*, 74, 547–555, 1994
- URAGAMI, A., SAKAI, A., MAGAI, M.: Cryopreservation of dried axillary buds from plantlets of *Asparagus officinalis* L. grown *in vitro*. *Plant Cell Reports*, 9, 328–331. 1990
- WESLEY-SMITH, J., VERTUCCI, C.W., BERJAK, P., PAMMENTER, N.W., CRANE, J.: Cryopreservation of desiccation-sensitive axes of *Camellia sinensis* in relation to dehydration, freezing rate and the thermal properties of tissue water. *Journal of Plant Physiology*, 140, 596–604, 1992
- WITHERS, L.A., ENGELMANN, F.: *In vitro* conservation of plant genetic resources. In: *Biotechnology in Agriculture*, A. Altman ed., Marcel Dekker Inc., New York. 57–88 1997

Kontaktní adresy autorů

Ing. Miloš Faltus, PhD, Ing. Jiří Zámečník, CSc., RNDr. Alois Bilavčík, PhD
Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně
E-mail: faltus@vurv.cz, zamecnik@vurv.cz, bilavcik@vurv.cz

Provoz kryobanky

Jiří Zámečník, Alois Bilavčík, Miloš Faltus a Vladimír Skládal

Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha 6 – Ruzyně

Souhrn

Kryoprezervace je technologie uchování rostlin v ultranízkých teplotách. Využívá se hlavně pro uchování genofondu vegetativně množených rostlin. Výchozím materiálem jsou rostliny převedené do in vitro podmínek. Množství kryoprezervovaných vzrostných vrcholů, pravděpodobnost dosažení určitého počtu rostlin regenerací, bylo odvozeno na základě publikovaného statistického modelu. Množství kryoprezervovaných položek a počet meristémů jedné položky jsou porovnány s publikovanými údaji světových kryobank. Jsou popsány: Informační systém využívající evidenci skladovaných vzorků označených pomocí čárového kódu, jeho napojení na evidenci genetických zdrojů EVIGEZ, technologické a bezpečnostní zabezpečení.

Na základě teoretických poznatků a metodických pokroků v kryoprezervaci rostlin, technickém zázemí organizačních a informačních struktur byla dne 26.11.2003 založena Kryobanka vegetativně množených rostlin v České republice.

Klíčová slova: kryobanka, kryoprezervace, vegetativně množené rostliny, ultranízké teploty

Summary

Cryopreservation is a technology of ultra-low temperature germplasm storage. Methods of cryopreservation are used mostly for vegetatively propagated plants. In vitro cultivated plants are the source for cryopreservation. The number of cryopreserved shoot tips and probability of plant regeneration were calculated according to the published statistical model. The number of cryopreserved accessions and the number of meristems of one accession are compared with the published parameters of other world cryobanks. On the basis of the theoretical and methodical approach to plant cryopreservation, the technology and the information system, the Czech Cryobank was established on November 26, 2003.

Key words: cryobank, cryobanking, cryopreservation, vegetatively propagated plants, ultra-low temperatures

Úvod

Kryoprezervace vegetativně množených rostlin nebo jejich částí je jedním ze způsobů, jak uchovat rostliny živé po dlouhou dobu bez růstu. Kryoprezervace je metoda uchování rostlin nebo jejich částí v ultranízkých teplotách za účelem uchování biodiverzity. Skladovací systém je založen na minimalizaci růstu a vývoje, udržení životnosti vzorků na nejvyšší možné úrovni, udržení genetické stability s minimálním rizikem její ztráty, udržení schopnosti plného vývoje ve fyziologických teplotách, minimalizaci lidské práce, materiálových a energetických vstupů.

Kryoprezervace přispívá k uchování genetické stability a zamezuje stárnutí. Kryoprezervací se uchovává ozdravený (případně vzácný neozdravený) materiál, u kterého hrozí při množení v *ex vitro* podmínkách znehodnocení vlivem působení biotických a abiotických stresů. Nepřímo se při kryoprezervaci skladuje i lidská práce a know-how vložené do celého postupu kryoprezervace včetně předchozího ozdravení.

Jednou z výhod tohoto skladování rostlin je vysoká jistota udržení životaschopnosti při ultranízkých teplotách pomocí tekutého dusíku (teplota $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) nezávisle na elektrické energii. Nevýhodou je počáteční větší pracnost, která je však kompenzována dlouhodobým skladováním rostlinného materiálu bez dalšího nutného pasážování, které je nezbytné, pokud jsou rostliny pěstovány v tkáňových kulturách.

Metody kryoprezervace jsou využívány nejen pro uchování genových zdrojů kulturních plodin, ale také pro uchování vzácných rostlin. V neposlední řadě i pro potřeby šlechtitelů se pomocí kryoprezervace uchovává pyl v ultranízkých teplotách pro křížení.

Kryoprezervací rostlin se zastaví růst a vývoj rostlin, za současného uchování co nejvyšší životnosti a regenerační schopnosti rostlin. Při přípravě, skladování a následné regeneraci rostlin je nutné přihlížet k tomu, aby nedocházelo k ovlivnění genetické stability. Změny genetické stability mohou nastat výběrem, či nevhodným použitím kryoprotektivních látek, které mohou mít vliv na vyšší výskyt mutací. Při skladování rostlinných vzorků v ultranízkých teplotách není tak velké riziko ovlivnění genetické stability jako je při přípravě těchto rostlin na mrznutí a při tání a jejich regeneraci. Při odtávání vzorků je nutné dbát na vymytí kryoprotektivních látek z rostlin, které by mohly ovlivnit hlavně regeneraci a případně genetickou stabilitu. Při regeneraci rostlin po kryoprezervaci je nutné aby vzrostné vrcholy regenerovaly z meristematických buněk a ne z kalusů, které mohou mít vliv na somaklonální variabilitu. Při kryoprezervaci vzrostných vrcholů rostlin je zaručeno, že regenerace probíhá z meristematických buněk. Z hlediska nároků na energii je metoda kryoprezervace v počátku při přípravě rostlin a po odtátí náročnější více na lidskou práci a energii, zato během skladování je nutné pouze udržovat hladinu tekutého dusíku, která zaručuje ultranízkou teplotu skladování. Hlídání hladiny tekutého dusíku je v řadě kryobank automatické podobně jako doplňování tekutého dusíku.

Metodika kryobanky

Na základě teoretických poznatků (viz BILAVČÍK *et al.*) a metodických postupů (viz FALTUS *et al.*) byla 26.11.2003 založena první kryobanka vegetativně množených rostlin v České republice ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby ve spolupráci s Výzkumným ústavem bramborářským v Havlíčkově Brodě, Chmelářským institutem v Žatci a Výzkumným a šlechtitelským ústavem ovocnářským v Holovousích. V počáteční fázi provozu kryobanky je pozornost zaměřena na nejdůležitější vegetativně množené plodiny (brambor, chmel, *Allium*, jablono, hrušeno, jahodník, višeno a třešeno), které budou uloženy v ultranízkých teplotách. Pro kryoprezervaci genotypů jednotlivých plodin je vytvořena „core“ kolekce s genotypy s odlišnými vlastnostmi, jako je jejich rychlost růstu, regenerační schopnost, množitelský koeficient a další. Prioritu určuje při výběru genotypů jejich původ (českým odrůdám bude dána zpočátku přednost), poté to budou ty z nich, u kterých hrozí vyšší riziko ohrožení v přirozených podmínkách, případně se nedaří je uchovávat ani v tkáňových kulturách. Výběr vhodných genotypů pro kryoprezervaci se provádí v úzké spolupráci s kurátorem kolekce plodiny, který zná velmi podrobně vlastnosti jednotlivých genotypů a genetických zdrojů. V neposlední řadě bude věnována pozornost bezpečnému uchování genotypů v kryobance vyplývající z podmínek mezinárodní výměny vzorků a jejich duplikace.

V počátku vývoje kryoprezervačních metod byla snaha použít rostliny či jejich části z přirozených podmínek v období, kdy jsou připravené odolávat nízkým teplotám. Tyto rostliny připravené z hlediska jejich fyziologického stavu (s vysokou odolností k nízké teplotě), v dormantním stavu se ukazovaly z počátku jako výhodné pro kryoprezervaci. Během studia se ukázaly proměnlivé sezónní vlivy jako nevhodné pro úspěšnou kryoprezervaci, v pozdějších etapách vývinu kryoprotokolu se proto začly používat rostliny z kultur *in vitro*.

Rostliny napěstované v podmínkách *in vitro* slouží jako výchozí materiál pro jejich uchování v kryobance. Výchozí materiál napěstovaný v *in vitro* podmínkách má řadu výhod. Rostliny jsou ve stejném ontogenetickém a fyziologickém stavu, je možné je připravit pro kryoprezervaci standardním způsobem. Napěstované rostliny v řízených podmínkách lze

použít celoročně a tak práci rozložit během celého roku. Tuto podmínku nebylo možné splnit v případě použití dormantních pupenů dřevin a pacibulek česneků, u kterých je možnost použití jako výchozího materiálu pro kryoprezervaci omezena na 3-4 měsíce v roce.

Vypreparované vzrostné vrcholy s meristematickými buňkami jsou rovněž výchozím materiálem pro kryoprezervaci.

Pro dlouhodobé skladování kryoprezervovaných rostlinných vzorků je použit systém skladování v tekutém dusíku (při teplotě -196°C). Rostlinné vzorky jsou umístěny ve speciálních zkumavkách, krympulích, odolávajících náhlým teplotním změnám a dlouhodobému vystavení teplotám tekutého dusíku. Krympule mají šroubovitý uzávěr se silikonovým těsněním. Vyrábějí se v různých objemech od 0,5 ml do 5 ml.

Metody kryoprezervace jsou optimalizovány pro jednotlivé druhy plodin. Optimalizace kryoprotokolů u genotypů s nízkou regenerací při kryoprezervaci je řešena v rámci výzkumných projektů. Kryoprotokol je založen na metodách vyvolávajících vitrificační stav, který je výhodný pro dlouhodobé uchování genetické informace (jednotlivé metody a jejich popis je uveden v tomto sborníku v příspěvku Faltus *et al.* s názvem Metody kryoprezervace).

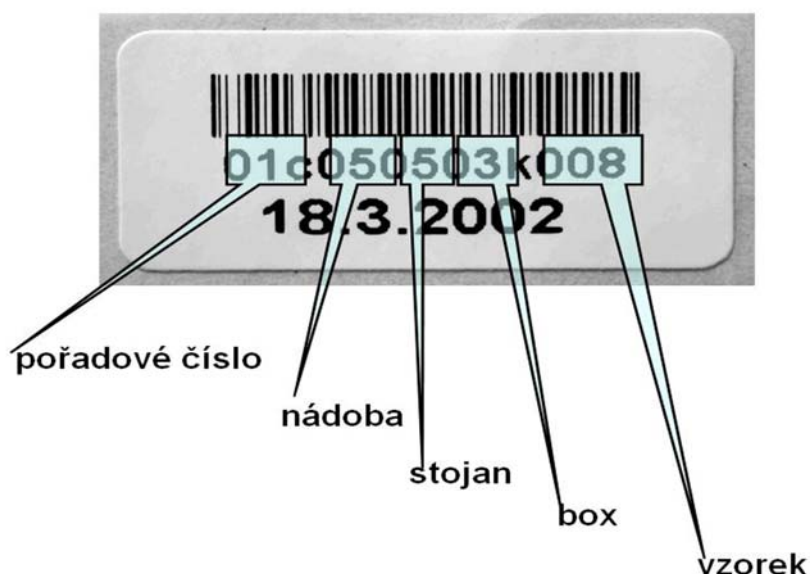
Na základě zkušeností a statistického modelu (DUSSERT *et al.* 2003) byl navržen model, z kterého byly odvozeny základní parametry kryobanky. Za genotyp úspěšně uchovaný v kryobance lze považovat ten, u něhož je zamrazeno minimálně 140 vzrostných vrcholů a z nich je minimálně 20 odtáto s takovou regenerační schopností, že ve vzorku v kryobance lze zregenerovat alespoň jednu rostlinu s pravděpodobností $P \geq 0,95$. Minimálně 120 vzrostných vrcholů bude uloženo nejméně v 6 krympulích. Pakliže po zamrazení nebudou splněna kritéria pro úspěšně uchovaný genotyp v kryobance, bude celý kryoprotokol s výchozím genotypem opakován nebo na základě zkušeností bude rozhodnuto o úpravě kryoprotokolu.

Informační systém EVIGEZ vypracovaný pro dokumentaci kolekcí genetických zdrojů a skladování semen v genové bance je základem informačního systému kryobanky. Na databázi EVIGEZ navazuje databáze kryoprotokolů. Kryoprotokol obsahuje údaje o původu vzorku, o datu jeho převzetí do kryobanky, o předkultivaci (době, času, teplotě), o složení kultivačního média (hlavně o hormonálním složení média), o datu a podmínkách kryoprezervace. Kryoprotokol obsahuje podmínky pro odtátí, které byly použity pro stanovení regenerace kontrolního vzorku. Dále jsou uchovány údaje o procentu regenerace a teplotě pro bezpečné skladování. Kryoprotokol obsahuje důležitou poznámku experimentátora, který navrhne metodu odtátí (teplotu, rychlost, rehydrataci).

Manipulace při skladování položek a komunikace se skladovou databází v PC se uskuteční pomocí terminálu čárového kódu. Každá krympule je označena jedinečným alfanumerickým kódem. Kód obsahuje pořadové číslo uchovaného vzorku, jeho pozici v Dewarově nádobě a datum zamrazení (obr.1)

Zabezpečení kryobanky proti technické havárii je monitorováno dvouúrovňovým měřením teploty v každé Dewarově nádobě. Bezpečnost práce v kryobance je hlídána kyslíkovým čidlem spojeným s výstražnou sirénou. Zabezpečení kryobanky proti vniknutí nepovolané osoby je zajištěno propojením 3 okruhů zabezpečovacího systému na pult centrální ochrany.

Virtuální inventura kryobanky bude prováděna jednou ročně spolu se zálohováním dat. Jednou ročně budou odtávány kontrolní vzorky rostlin ke stanovení úrovně regenerace. Jednou za 10 let bude provedena fyzická inventura kryobanky se vzorky v kapalném dusíku.



Obr. 1 Systém čárového kódu pro skladování GZ v tekutém dusíku

Řada pracovišť ve světě se zabývá vývojem kryoprezervačních metod na úrovni základního a aplikovaného výzkumu, přehledně viz REED (2001). Jen málo laboratoří si na základě výsledků s kryoprezervací založilo kryobanky vyšších rostlin zejména zemědělsky významných plodin (tab. 1).

Tab. 1 Kryoprezervované kolekce plodin skladované ve formě meristémů v *in vitro* podmínkách ve světových kryobankách (upraveno podle REED 2001)

Taxon	Země/ instituce	Počet	
		položek	meristémů/položku
jabloň	Čína	20	50
ostružiník	USA (NCGR)	17	100
kasava	Kolumbie (CIAT)	95	30
trávy	USA (NCGR)	10	100
chmel	USA (NCGR)	2	100
hrušně	USA (NCGR)	106	100
brambor	Německo (DSM/FAL)	219	40-350
brambor	Peru (CIP)	197	250
jam	Indie (NBPGR)	8	30-50
rybíz	USA (NCGR)	5	100
angrešt	Skotsko(UAD)	31	25-30
Jabloň ⁺	ČR (VÚRV)	12	120
hrušeň ⁺	ČR (VÚRV)	14	120
česnek ⁺	ČR (VÚRV)	2	120
chmel ⁺	ČR (VÚRV)	1	120
brambor ⁺	ČR (VÚRV)	8	120

⁺ doplněná data, stav konec roku 2003

Vysvětlivky zkratk:

NCGR-National Clonal Repository Laboratory, Corvallis OR, USA

CIAT- International Center for Tropical Agriculture, Cali, COL

DSM/FAL-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, DEU

CIP-International Centre for Potato, Lima, PER

NBPGR-National Bureau of Plant Genetic Resources, Delhi, IND

UAD-University of Abertay, Dundee, GBR

VÚRV-Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha, CZE

Na základě teoretických poznatků (BILAVČÍK *et al.* Teoretické základy uchování rostlin a jejich částí v ultranízkých teplotách, v tomto sborníku) a metodických pokroků (FALTUS *et al.* Metody kryoprezervace, v tomto sborníku) v kryoprezervaci rostlin, technickém zázemí organizačních a informačních struktur byla dne 26.11.2003 založena kryobanka vegetativně množených rostlin v České republice.

Poděkování

Práce vznikla za částečné podpory projektu MZe QF 3039 a grantu GAČR 522/04/0384.

Literatura

REED B.M. (2001) Implementing cryogenic storage of clonally propagated plants. *CryoLetters* 22: 97-104.

DUSSERT, S., ENGELMANN, F., NOIROT, M., (2003) Development of probabilistic tools assist in the establishment of cryopreserved plant germplasm collections. *CryoLetters* 24, 149-160.

Kontaktní adresy autorů

Ing. Jiří Zámečník, CSc., RNDr. Alois Bilavčík, PhD, Ing. Miloš Faltus, PhD, Ing. Vladimír Skládal, CSc. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně

E-mail: zamecnik@vurv.cz, bilavcik@vurv.cz, faltus@vurv.cz, skladal@vurv.cz

Možnosti kryokonzervace genofondu chmele

Miloš Faltus¹, Petr Svoboda²

¹Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha 6 – Ruzyně

²Chmelařský institut, Žatec

Souhrn

V přehledu jsou prezentovány možnosti kryoprezervace chmele. Jsou popsány používané metody pro kryoprezervaci chmele: enkapsulace-dehydratace, řízené mrznutí a ultra-rychlé mrznutí. U jednotlivých metod jsou uvedeny výhody a nevýhody spojené s jejich použitím. V příspěvku je shrnut stav kryoprezervace chmele v ČR: výběr a optimalizace metody pro kryoprezervaci chmele, výsledky použité metody, založení a cíle kryobanky chmele v ČR.

Klíčová slova: kryoprezervace, chmel, *Humulus lupulus* L., kryobanka

Summary

Techniques of hop germplasm cryoconservation are reviewed. Cryopreservation methods employed for hop cryoconservation are described: encapsulation-dehydration, controlled freezing and ultra-rapid freezing. Advantages and disadvantages of the individual methods employed are discussed. Information about cryopreservation of hop in Czech Republic is reported: choice and method optimization for hop cryopreservation, results of the applied method for hop cryopreservation, establishment and objectives of the hop cryobank.

Key words: cryopreservation, hop, *Humulus*, cryobank

Úvod

Chmel (*Humulus lupulus* L.) patří mezi plodiny, jejichž pěstování, šlechtění i následné zpracování má na našem území bohatou tradici. Jedná o vegetativně množenou plodinu a genofond chmele může být uchováván a množen pouze pomocí vegetativních částí rostlin. U klasických polních kolekcí hrozí poškození nebo ztráta genetického materiálu působením biotických a abiotických činitelů. Tato rizika lze omezit využitím *in vitro* kultur. Navíc je možné pomocí *in vitro* technik rostlinný materiál ozdravit od patogenů. Další možností, jak uchovat genové zdroje chmele, je využití metody kryoprezervace, která vychází z *in vitro* kultur. Je to metoda založená na uchování vzorků při teplotě tekutého dusíku, kdy dochází prakticky k zastavení veškerých procesů ve skladovaných vzorcích. Výhodou této metody jsou minimální pracovní a materiálové nároky spojené s udržováním kolekce uložených vzorků.

Kryokonzervace chmele

Chmel je víceletá rostlina přechodného klimatu. Rostliny jsou schopné se v přirozených podmínkách otužit a překonat působení mrazu. V podmínkách *in vitro*, po dvou týdnech otužování při 5 °C, dosahuje tzv. letální teplota při níž přežije 50 % jedinců (LT₅₀) - 10 °C. Při kryoprezervaci jsou rostliny, respektive jejich části vystaveny teplotě bodu varu tekutého dusíku, tedy -196 °C. Pro kryokonzervaci chmele se používají meristematické části rostlin – vzrostné vrcholy. Využívají se metody enkapsulace-dehydratace, řízeného mrznutí a ultra-rychlého mrznutí.

Metody kryokonzervace chmele ve světě

Metoda enkapsulace-dehydratace (MARTÍNEZ *et al.* 1999)

Metoda využívá axilární i apikální vrcholy. Vegetační vrcholy (0,5 – 2 mm) byly získány z otužených rostlin rostoucích 3 týdny při krátké fotoperiodě (8h/16h) a teplotě 12 °C/6 °C (den/noc). Izolované vzrostné vrcholy byly enkapsulovány do alginátových kuliček

(MARTÍNEZ *et al.* 1998) a následně kultivovány na pevném mediu s 0,75 M sacharosou. Pak byly alginátové kuličky dehydratovány 4 hodiny v proudu vzduchu v laminárním boxu nad silikagelem. Alginátové kuličky byly umístěny do kryozkumavky a rychle zamrazeny ponořením kryozkumavky do tekutého dusíku. Tání vzorků probíhalo pomalu, vytažením kryozkumavky z tekutého dusíku na laboratorní teplotu a ponecháním kryozkumavky 5 minut při této teplotě. Regenerace probíhala na mediu shodného složení jako při předkultivaci rostlin, včetně fytohormonů a sacharosy (0,5 μ M IBA, 4,4 μ M BAP). Po 30 dnech byly rostliny přeneseny na množicí medium. Autoři uvádějí, že výhodou této metody je využití sacharosy jako přirozeného kryoprotektantu bez nutnosti použití některých toxických kryoprotektantů a nenáročnost na přístrojové vybavení.

Metoda řízeného mrznutí (REED *et al.* 2003)

Vzrostlé vrcholy (0,8 – 1 mm) byly získány z otužených rostlin rostoucích 2 týdny při krátké fotoperiodě (8h/16h) a teplotě 22 °C/-1 °C (den/noc). Izolované vzrostlé vrcholy byly kultivovány na pevném mediu s 5% dimethylsulfoxidem (DMSO) po dobu 48 hodin za stejných světelných a teplotních podmínek jako mateřské rostliny. Pak byly vrcholy přemístěny do kryozkumavek s tekutým MS médiem a postupně přelity 10 % směsí kryoprotektantů (polyethylenglykol 8000, glukosa, DMSO) v MS mediu. Po 30 minutách ekvibrace na ledu byly vrcholy zchlazovány rychlostí 0,1 °C do -40 °C v programovatelném mrazícím zařízení s nukleací při -9 °C a pak byly vrcholy ponořeny do tekutého dusíku. Odtávání vzorků probíhalo ve vodní lázni o teplotě 45 °C po dobu 1 minuty a následně ve vodní lázni o teplotě 23 °C po dobu 2 minuty. Pak byl kryoprotektant odstraněn a nahrazen tekutým MS médiem. Regenerace probíhala na pevném mediu s přidávkou fytohormonů (4,4 μ M BA). Autoři uvádějí, že výhodou této metody je její aplikovatelnost na více rostlinných druhů jen s malými modifikacemi, tzn. že není nutné pro každou plodinu vytvářet speciální kryoprotokol. Na druhou stranu nevýhodou této metody je nutnost pořízení dosti nákladného zařízení pro řízené zmrazování vzorků. Jistou nevýhodou může být i použití toxického DMSO.

Kryokonzervace chmele v ČR

Kryobanka chmele v ČR

V souvislosti s počátkem řešení projektu QF3039 byla ve VÚRV Praha založena kryobanka chmele v ČR. V prvním roce řešení projektu byl optimalizován postup předkultivace rostlin chmele pro dosažení maximální životnosti a regenerace po kryoprezervaci. Pro kryoprezervaci chmele byla zvolena metoda ultra-rychlého mrznutí, která se osvědčila na pracovišti VÚRV již při kryoprezervaci bramboru.

Vývoj metody kryokonzervace

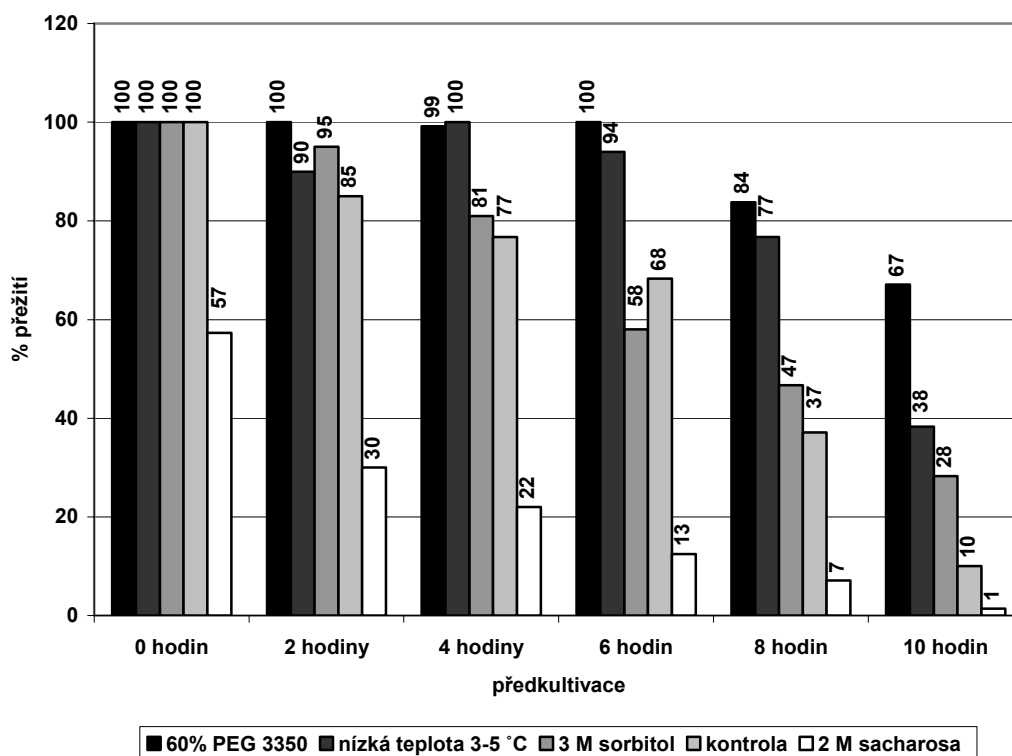
Vliv předkultivace na přežití rostlin

Byl testován vliv různých způsobů předkultivace chmele na životnost (Obr. 1) a regeneraci (Obr. 2) rostlin u modelového Osvaldova klonu (meriklon 4631). Byl zjišťován vliv 3M sorbitolu, 2 M sacharosy, 60 % polyethylenglykolu (PEG) a nízké teploty na přežití a regeneraci rostlin po různé době desikace vegetativních vrcholů. Desikace probíhala nad vysušeným silikagelem po dobu 0 - 10 hodin. Cílem předkultivace bylo dosáhnout osmotického přizpůsobení rostlin spojeného s poklesem obsahu vody v pletivech a tak otužit rostliny pro samotnou kryoprezervaci.

U kontrolních rostlin (bez předkultivace) docházelo k poklesu životnosti rostlin již po 2 hodinách desikace vzorků nad silikagelem. Po 6 hodinách desikace se životnost kontrolních rostlin blížila 50 % a po 10 hodinách desikace byla jejich životnost 10 %. Regenerace rostlin byla na úrovni 50 % již po 4 hodinách desikace a po 10 hodinách desikace u kontrolních rostlin nedocházelo k regeneraci vůbec.

Nejlepších výsledků bylo dosaženo při aplikaci 60 % polyethylenglykolu během předkultivace rostlin. Ještě po 6 hodinách desikace byly všechny rostliny životaschopné a po 10 hodinách desikace poklesla životnost rostlin na 67 %. V případě regenerace rostlin byla situace podobná. Po dobu 6 hodin desikace nedocházelo k poklesu regenerace rostlin a po 10 hodinách desikace byla regenerace rostlin ještě 61 %.

Vliv předkultivace na životnost rostlin po desikaci 0 - 10 hodin



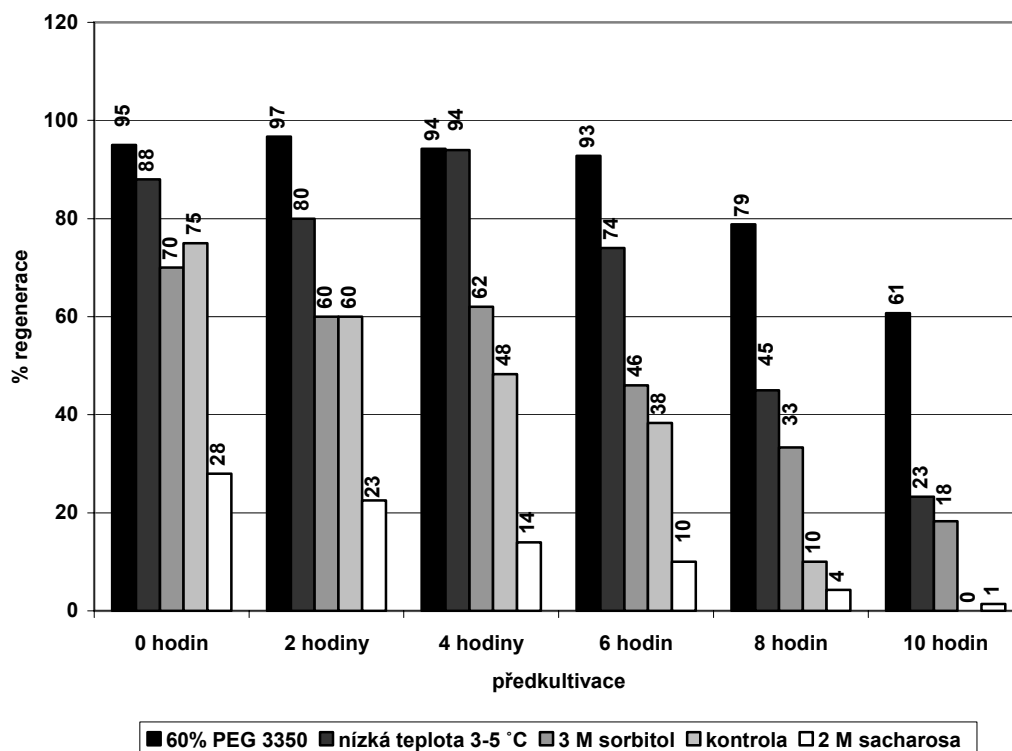
Obr. 1 Vliv jednotlivých způsobů předkultivace a doby desikace na životnost rostlin

Dobrych výsledků bylo dosaženo i při předkultivaci rostlin v nízké teplotě. Životnost rostlin začala významně klesat po 6 hodinách desikace. Po 8 hodinách desikace byla životnost rostlin po působení 60 % PEG a nízké teploty podobná a po 10 hodinách poklesla životnost rostlin na 38 %. Při hodnocení regenerace rostlin bylo také zjištěno, že k poškození rostlin dochází po 6 hodinách desikace. Po 10 hodinách desikace poklesla regenerace rostlin na 23 %.

Lepší výsledky než u kontroly byly zjištěny také po aplikaci 3 M sorbitolu. K poklesu životnosti došlo sice již po 2 hodinách desikace, ale ještě po 8 hodinách desikace byla životnost přibližně na úrovni 50 %. Po 10 hodinách desikace byla životnost rostlin po působení 3 M sorbitolu 28 %. Při hodnocení regenerace byl zjištěn pokles regenerace na úroveň 50 % již po 4 hodinách desikace a po 10 hodinách desikace rostliny regenerovaly z 18 %.

Nejhorších výsledků bylo dosaženo při aplikaci 2 M sacharosy. Rostliny byly poškozeny již při předkultivaci. Bez desikace byla životnost rostlin 57 %, regenerace dokonce jen 28 %. Po 10 hodinách desikace byla životnost i regenerace rostlin 1 %.

Vliv předkultivace na regeneraci rostlin po desikaci 0 - 10 hodin



Obr. 2: Vliv jednotlivých způsobů předkultivace a doby desikace na regeneraci rostlin

Metoda ultra-rychlého mrznutí (dvoustupňová předkultivace)

Na základě předchozích výsledků byla otestována metoda ultrarychlého mrznutí, modifikovaná pro chmel. Byly testovány dva faktory. Jednak předkultivace rostlin a pak sycení vzrostných vrcholů. Předkultivace probíhala buď za přítomnosti 60 % PEG, který vykázal nejlepší výsledky v předchozích pokusech, nebo za přítomnosti 0,7 M sacharosy. Při testování předkultivace byla použita 2 M sacharosa (podobně jako u bramboru), ale tato koncentrace sacharosy způsobovala poškození rostlin již při předkultivaci rostlin. Byla proto zvolena nižší koncentrace sacharosy (0,7 M), která byla shodná jako při následném sycení vzrostných vrcholů. Sycení vzrostných vrcholů na 0,7 M sacharose probíhalo 1 nebo 2 dny.

Vzrostné vrcholy (0,5 – 3 mm) byly získány z otužených rostlin rostoucích 2 týdny při dlouhé fotoperiodě (16h/8h) a teplotě 2 °C. Po týdnu otužování byly rostliny přelity roztokem 60 % PEG 3350 nebo 0,7 M sacharosy. Izolované vzrostné vrcholy byly umístěny na filtrační papír nasycený 0,7 M sacharosou do druhého dne. Pak byly vrcholy přemístěny na malé hliníkové plíšky a ty byly desikovány nad silikagelem po dobu 1 hodiny. Zamražení vrcholů probíhalo přímým ponořením hliníkových plíšků do tekutého dusíku. Odtávání vzorků se provádí ponořením plíšků do vodní lázně o teplotě 40 °C. Regenerace rostlin probíhá na pevném mediu s přísadkou fytohormonů (0,4 μM IBA, 4,4 μM BAP).

Předkultivace rostlin chmele s aplikací 60 % PEG nebo 0,7 M sacharosy měla podobný vliv na přežití a regeneraci rostlin po kryoprezervaci (Tab. 1), resp. mezi těmito variantami nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl. Byl však zjištěn vliv doby sycení vzrostných

vrcholů na 0,7 M sacharose na regeneraci rostlin po kryoprezervaci. Po dvou dnech sycení vegetativních vrcholů na 0,7 M sacharose došlo k statisticky významnému poklesu regenerace rostlin ve srovnání s jednodenním sycením vrcholů. Z hlediska životnosti rostlin nebyl tento pokles statisticky významný. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při jednodenním sycení vzrostných vrcholů na 0,7 M sacharose. V případě předkultivace s aplikací 60 % PEG byla životnost rostlin po kryoprezervaci 67 % a regenerace rostlin 28%, při předkultivaci s 0,7 M sacharosou byla dosažena životnost rostlin po kryoprezervaci 53 % a regenerace rostlin 37 %.

Tab. 1 Porovnání procenta přežití a regenerace rostlin chmele při použití různých kryoprezervačních postupů

Varianta	Podmínky pokusu		Hodnocení po kryoprezervaci	
	předkultivace	dny sycení na 0,7 M sacharose	% přežití	% regenerace
A	60 % PEG	1	67	28
B		2	50	0
C	0,7 M sacharosa	1	53	37
D		2	40	10

Závěr

Metoda kryoprezervace je perspektivní metodou pro uchování genových zdrojů chmele. Rozvoj této techniky v ČR souvisí se založením kryobanky chmele ve VÚRV Praha ve spolupráci s CHI Žatec. Provedené pokusy prokázaly vhodnost použité metody – dvoustupňové předkultivace. Výhodou této metody je její jednoduchost, využití přirozeného kryoprotektantu – sacharosy a nízké nároky na přístrojové vybavení. Bylo využito přirozené schopnosti chmele otužit se vůči mrazu v kombinaci s aplikací kryoprotektantu. Nejlepší kryoprotektivní účinky při předkultivaci rostlin byly zjištěny u 60 % PEG a 0,7 M sacharosy. Optimální doba sycení vzrostných vrcholů pro chmel byla 1 den. Životnost rostlin chmele po kryoprezervaci byla dobrá a další výzkum bude zaměřen na zvyšování regenerace rostlin po kryoprezervaci. Cílem kryobanky chmele je v první řadě kryoprezervovat genetické zdroje chmele domácího původu a následně další významné genotypy zahraniční.

Poděkování

Práce na tomto článku byla podporována projekty Národní agentury pro zemědělský výzkum (NAZV) QF 3039 a Ministerstva zemědělství ČR MZE 0002700602.

Literatura

MARTÍNEZ, D., SEVILLA, M.A., SPINA, ARÁNZAZU, JAIMEZ, E., GARCÍA, J.R.: Survival cryopreservation of hop shoot tips monitored by differential scanning calorimetry. *Thermochimica Acta* 317, 1998, 91-94

- MARTÍNEZ D, TAMES R.S., REVILLA M.A.: Cryopreservation of in vitro-grown shoot-tips of hop (*Humulus lupulus* L.) using encapsulation/dehydration. Plant Cell Rep. 19 (1), 1999, 59-63
- REED, B.M., OKUT, N., D'ACHINO, J., NARVER, L., DENOMA, J.: Cold storage and cryopreservation of hops (*Humulus* L.) shoot cultures through application of standard protocols. Cryo-Letters 24, 2003, 389-396

Kontaktní adresy autorů

Ing. Miloš Faltus, PhD, Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně

E-mail: faltus@vurv.cz

Ing. Petr Svoboda Chmelařský institut, s.r.o., Kadaňská 2525, 438 36 Žatec

E-mail: P.Svoboda@telecom.cz

Možnosti kryokonzervace ovocných dřevin

Alois Bilavčík¹, Jiří Zámečník¹, František Paprštejn², Jiří Sedlák²

¹⁾ Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha 6-Ruzyně

²⁾ Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o.

Souhrn

Ovocné dřeviny patří k významným plodinám. I když se v poslední době v České republice celkové pěstební plochy téměř všech ovocných druhů, kromě višní a švestek, snižují (anonym, 2002), je u nás tradičně zastoupeno široké druhové a odrůdové spektrum. Vzhledem ke strategii bezpečného zajištění rozsáhlého genetického potenciálu existují v současné době silné tendence k uchování odrůd a kultivarů ovocných plodin nejen standardními metodami ex situ - konzervací na stanovišti, ale také metodami in vitro a v poslední době také pomocí zamrazení do ultra nízkých teplot – kryoprezervací.

Byla porovnána úspěšnost kryoprezervace dormantních pupenů jabloní a hrušní metodou dvoustupňového kryoprotokolu s vitrifikační metodou enkapsulace a dehydratace in vitro kultur ovocných dřevin. U dvoustupňové metody pupeny jabloní přežívaly v průměru z 35% a pupeny hrušní přežívaly v průměru z 16%. Kryoprezervované dormantní pupeny odebrané z vnějších podmínek neregenerovaly v nové rostliny ani v in vitro podmínkách ani při očkování pupenů na podnož. Oproti tomu vzrostlé vrcholy z rostlin vypěstovaných v in vitro podmínkách měly průměrné přežití a růst po kryoprezervaci u jabloní 55%, resp. 43%, hrušní 41%, resp. 33%, višní 20%, resp. 14% a jahodníku 22%, resp. 15%. V kryobance bylo do roku 2004 uloženo 42 kultivarů od 4 druhů ovocných plodin s průměrnou regenerací 30% (u doposud zhodnocených 25 kultivarů).

Klíčová slova: kryoprezervace, enkapsulace-dehydratace, ovocné dřeviny

Summary

Growing of fruit trees and associated fruit production has a long tradition in the Czech Republic. Although the production area of fruit trees (except plums and cherries) has been decreasing (MAČR, 2002), many local cultivars and varieties remains. To maintain the broad genetic potential of fruit trees in the Czech Republic, a trend pertains to preserve this germplasm not only by conventional ex situ methods, but also more recently by in vitro techniques including cryopreservation. The aim of this work was to develop cryoprotocols for the safe maintenance of fruit crop genetic resources. Two approaches, cryopreservation of dormant buds and in vitro cultures were evaluated. Survival of dormant apple and pear buds cryopreserved by the two-step procedure was on average 35% respectively 16%. Regeneration in new plants was neither obtained by in vitro nor chip budding method. The mean frequencies of survival and regrowth of cryopreserved shoot tips of in vitro cultures of apples was 55% survival and 43% regrowth, pears 41% survival and 33% regrowth, cherries 20% survival and 14% regrowth, and strawberries 22% survival and 15% regrowth. It is necessary to adapt the cryopreservation method to the individual demands of species or cultivars according to thermal characteristic and dehydration tolerance of their shoot tips. Till 2004 there were 58 of cultivars of 4 species of fruit crops introduced in in vitro and 48 of them were cryopreserved and stored in the Cryobank. Twenty five cultivars evaluated for survival after cryopreservation had a mean post-thaw regrowth frequency of 30% and 16 cultivars were successfully reintroduced into ex vitro conditions.

Key words: cryopreservation, encapsulation-dehydration, fruit trees

Úvod

Vzhledem k potenciálnímu riziku nepříznivého působení biotických a abiotických faktorů na kolekci ovocných dřevin v sadu ve Výzkumném a šlechtitelském ústavu ovocnářském v Holovousích byla v rámci projektů Ministerstva zemědělství ČR ustavena spolupráce s Výzkumným ústavem rostlinné výroby v Praze – Ruzyni s cílem kryoprezervace

významné části kolekce ovocných dřevin. V rámci předchozích vyvinutých kryoprotokolů byly aplikovány postupy kryoprezervace dormantních pupenů a *in vitro* kultur.

Materiál a metody

Dormantní pupeny

Pro metodou dvoustupňové kryoprezervace bylo použito 10 kultivarů jabloní ('Golden Delicious', 'Idared', 'Jonagold', 'McIntosh', 'Melrose', 'Prima', 'Rubín', 'Šampion', 'Spartan' a 'Zvonkové') a 5 kultivarů hrušní ('Charneuská', 'Clappova', 'Koporečka', 'Lucasova' a 'Williamsova červená'). Dormantní výhony jabloní a hrušní byly otužovány při teplotě -4 °C po dobu minimálně 4 týdnů.

Obsah vody byl stanoven gravimetricky pomocí vysušení paralelního reprezentativního vzorku (3 pupeny po třech opakováních) dormantních pupenů při 105 °C po dobu 48 hodin. Pro kryoprezervaci bylo od každého kultivaru použito 10 pupenů ve 3 opakováních. Poté byly dormantní pupeny uzavřeny po 2 - 3 kusech (podle velikostí) do 5 ml krympulí s vlhkým filtračním papírem o velikosti cca 1 cm² (pro iniciaci ledové nukleace), krympule byly vloženy do hliníkových nosičů a vsunuty do skladovacích hliníkových trubek a následně zmrazovány rychlostí 2 °C hod⁻¹ do -30 °C. Pro vlastní řízené zmrazování dormantních pupenů s poklesem 2 °C h⁻¹ byl použit ultrakryomat Lauda RUK a počítačově řízený mrazicí box. Po zmrazení na danou teplotu v prvním kroku byly pupeny drženy při této teplotě 24 hodin. Následně byly celé ponořeny do kapalného dusíku (LN) do Dewarových nádob. V kapalném dusíku byly pupeny minimálně 24 hodin a poté bylo provedeno jejich odtání. Tání bylo provedeno vložením krympulí do +2 °C a ponecháním při této teplotě 24 hodin. Poté byly dormantní pupeny umístěny do vlhkého rašelinového substrátu a ponechány rehydratovat a regenerovat se při 100% relativní vzdušné vlhkosti. Po minimálně 48 hodinách bylo hodnoceno přežití vizuálně metodou hnědnutí. Metoda hnědnutí sestávala z longitudinálního řezu dormantním pupenem a zhodnocením jeho zelené či naopak hnědé barvy pletiv podle bonitační stupnice. Hodnotila se zelená barva pletiv pupene v rozsahu tří stupňů – 1- 5 - 9 (hnědé-hnědozelené-zelené) přičemž přežitým dormantním pupenům odpovídala hodnota č. 9.

***In vitro* kultury**

In vitro kultury jabloní ('Alkmene', 'Golden Delicious', 'Greensleeves', 'Chodské', 'Idared', 'Jonagold', 'McIntosh', 'Prima', 'Rubín', 'Zvonkové'), hrušní ('Ananaska česká', 'Clappova', 'Charneuská', 'Koporečka', 'Lucasova', 'Solanka'), višň ('Favorit', 'Mailot', 'Ostheimská', 'Vackova', *Ceropadus* x *Prunus avium* dále jen *Ceropadus*), a jahodníku ('Elsanta', 'Lidka', 'Maryša', 'Senga Sengana'), byly kultivovány ve 100 ml Erlenmayerových baňkách s 20 ml upraveného MS média (MURASHIGE a SKOOG, 1962) při 20 °C, světelné periodě 16/8 světlo/tma ve Výzkumném a šlechtitelském ústavu ovocnářském (SEDLÁK *et al.* 2001).

Po jednom až dvou týdnech subkultivace na čerstvém médiu byly převezeny do VÚRV v Praze Ruzyni, kde byly umístěny do podmínek indukujících otužení, 4 °C, krátká fotoperioda 8/16 světlo/tma a světelné intenzitě 25 μE s⁻² m⁻². V těchto podmínkách byly rostliny 4 – 6 týdnů. Poté byly z *in vitro* kultur extirpovány vzrostné vrcholy o velikosti 1 - 2 mm u jabloní a 2 mm u hrušní v longitudinálním směru a přibližně 1 - 2 mm v transversálním směru a poté byly nasazeny na standardní MS médium s 6 g l⁻¹ agaru, sacharózou 3% (w/v), s přísadkou kryoprotektivní směsi (2M sacharóza, 100 mg l⁻¹ a vitamin C jako antioxydant). Po dootoužení v kryoprotektivní směsi po dobu 48 hodin byly vzrostné vrcholy enkapsulovány 10 minut v alginátu sodném (3% alginát sodný v 0,75M sacharóze) s následným zesíťováním v CaCl₂ (0,1M CaCl₂ v 0,6M sacharóze) po dobu 10 minut. Enkapsulované vzrostné vrcholy

byly zlehka osušeny na sterilním filtračním papíru. V množství průměrně 20 kusů byly umístěny na Petriho misky o průměru 5 cm a řízeně dehydratovány proudem vzduchu v laminárním boxu za laboratorní teploty po dobu 4 - 6,5 hodin. Doba dehydratace byla upravována podle aktuálního průběhu dehydratačních křivek enkapsulovaných vzrostných vrcholů a kontrolních prázdných alginátových kuliček, které byly průběžně váženy. Dehydratace byla upravena tak, aby konec dehydratace byl přibližně po 2 hodinách od změny rychlosti vysychání. Stupeň vysušení byl stanoven na konci dehydratace také gravimetricky zvážením vysušeného vzorku a následným výpočtem obsahu vody.

Bylo odebráno minimálně 5 kontrolních dehydratovaných vzrostných vrcholů pro stanovení přežití po dehydrataci. Dále byl odebrán minimálně po dvou setech (vzrostný vrchol a alginát) vzorek od každého kultivaru v pokuse ke stanovení termických charakteristik v diferenčním skenovacím kalorimetru (DSC). Po uzavření v DSC pánvičce byl vzorek ponořen do LN a uložen v krympuli ve skladovací Dewarově nádobě pro pozdější DSC analýzu stability termických charakteristik po dlouhodobém skladování v LN. U několika zamrazování byl také změřen vzorek v DSC v den dehydratace s teplotním profilem zamrazování rychlostí $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Dehydratované enkapsulované vzrostné vrcholky byly uzavřeny po 10 až 20 kusech do 2 ml krympule a ponořeny do kapalného dusíku (o rychlosti mrazení přibližně $200\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$) (GROSPIETSCH *et al.*, 1999). Zde byly ponechány minimálně 24 hodin a následně bylo provedeno odtání. Odtání bylo provedeno rychle ponořením krympule do $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ teplé vody na dobu cca 1 minuty a pak byly enkapsulované vzrostné vrcholy nasazeny na standardní MS médium (s 6 g l^{-1} agaru, sorbitolem 3% w/v a přísadkou fytohormonu BAP 1 mg l^{-1}). Kontrolní vzrostné vrcholky po dehydrataci byly také ošetřeny ponořením do $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ teplé vody. Přežití a růst vzrostných vrcholů byly hodnoceny vizuálně pomocí metody hnědnutí *in vitro* kultury v Erlenmayerových baňkách a bylo sledováno jejich prorůstání v nové rostliny. Přežití rostlin bylo hodnoceno po 7 až 14 dnech tříbodovou stupnicí od plně zelených rostlin (9) přes nazelenalé (5) až po hnědé (1) rostliny. Růst byl hodnocen po 14 až 29 dnech tříbodovou stupnicí od plně prorůstajících rostlin nad 10 mm (9) přes špatně rostoucí do 10 mm (5) až po nerostoucí (1) rostliny.

Regenerované rostliny byly převezeny do VŠÚO Holovousy (Ing. Sedlák), kde byly převedeny do *ex vitro* podmínek s cílem pomologického porovnání kryoprezervovaných a nekryoprezervovaných rostlin (data neuvedena, neboť naočkované regenerované rostliny ještě nebyly v roce 2003 plodné, předpokládá se, že v roce 2004 již budou některé kultivary kvést).

Výsledky

Dormantní pupeny

U sledovaných kultivarů jabloní bylo přežití po kryoprezervaci dormantních pupenů dvoustupňovým kryoprezervačním postupem v průměru $35 \pm 12,6\%$. Nejvyššího přežití dosáhl kultivar ‘Idared’ ($59 \pm 13,6\%$) a nejnižší kultivar ‘Melrose’ ($14 \pm 11,0\%$). Růst kontrolních pupenů byl v průměru $95 \pm 7,5\%$. Nejvyšší hodnotu růstu kontrol ($100 \pm 0,0\%$) vykazovaly kultivary ‘Idared’, ‘McIntosh’, ‘Melrose’, ‘Prima’, ‘Šampion’ a ‘Zvonkové’ a nejnižší kultivar ‘Jonagold’ ($77 \pm 12,5\%$).

Přežití bylo u kultivarů hrušní po kryoprezervaci dormantních pupenů dvoustupňovým kryoprezervačním postupem v průměru $16 \pm 15,3\%$. Nejvyššího přežití dosáhl kultivar ‘Williamsova červená’ ($46 \pm 19,5\%$) a nejnižší kultivar ‘Lucasova’ ($3 \pm 3,8\%$). Růst kontrolních pupenů byl v průměru $99 \pm 1,6\%$. Nejvyšší hodnotu růstu kontrol ($100 \pm 0,0\%$) vykazovaly kultivary ‘Clappova’, ‘Koporečka’ a ‘Lucasova’ a nejnižší kultivary ‘Charneuská’ a ‘Williamsova červená’, obě $97 \pm 4,7\%$). U kryoprezervovaných dormantních pupenů jabloní a hrušní nebylo dosaženo regenerace v nové rostliny ani *in vitro* podmínkách ani při očkování pupenů na podnož.

***In vitro* kultury**

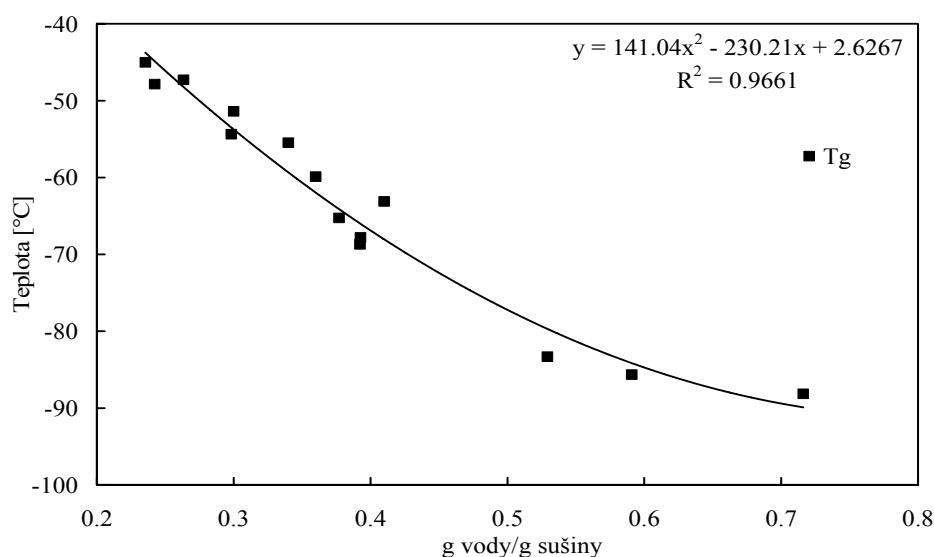
Přežití u kultivarů jabloní po kryoprezervaci vzrostných vrcholů *in vitro* kultur enkapsulačně dehydratačním postupem bylo v průměru $55 \pm 21,7\%$. Nejvyššího přežití dosáhl kultivar ‘McIntosh’ ($85 \pm 21,7\%$) a nejnižší kultivar ‘Alkmene’ ($6 \pm 0,4\%$). Růst jabloní byl v průměru $43 \pm 21,2\%$. Nejvyšší hodnotu růstu vykazoval kultivar ‘McIntosh’ ($85 \pm 21,7\%$) a nejnižší kultivar ‘Zvonkové’ ($4 \pm 5,4\%$).

U kultivarů hrušní bylo přežití vzrostných vrcholů *in vitro* kultur po zamrazení do LN enkapsulačně dehydratačním postupem v průměru $41 \pm 14,7\%$. Nejvyšší přežití měl kultivar ‘Koporečka’ ($68 \pm 18,0\%$) a nejnižší kultivar ‘Clappova’ ($21 \pm 8,1\%$). Růst hrušní byl v průměru $33 \pm 17,7\%$. Nejvyšší hodnotu růstu vykazoval kultivar ‘Koporečka’ ($67 \pm 4,0\%$) a nejnižší kultivar ‘Clappova’ ($14 \pm 12,6\%$).

Přežití u kultivarů višňi po kryoprezervaci vzrostných vrcholů *in vitro* kultur enkapsulačně dehydratačním postupem bylo v průměru $20 \pm 8,9\%$. Nejvyšší přežití měl *Cerpadus* ($42 \pm 14,2\%$) a nejnižší kultivar ‘Vackova’ ($5 \pm 0,4\%$). Růst višňi byl v průměru $14 \pm 12,4\%$. Nejvyšší hodnotu růstu vykazoval *Cerpadus* ($42 \pm 20,1\%$) a nejnižší kultivary ‘Vackova’ a ‘Ostheimská’ (0%).

Přežití u kultivarů jahodníku po kryoprezervaci vzrostných vrcholů *in vitro* kultur enkapsulačně dehydratačním postupem bylo v průměru $22 \pm 5,7\%$. Nejvyšší přežití měl kultivar ‘Lidka’ ($27 \pm 24,3\%$) a nejnižší kultivar ‘Senga Sengana’ (11%). Růst jahodníků po kryoprezervaci byl v průměru $15 \pm 12,4\%$. Nejvyšší hodnotu růstu vykazoval kultivar ‘Lidka’ ($30 \pm 18,5\%$) a nejnižší, nulovou, kultivar ‘Senga Sengana’.

U jabloní a hrušní bylo přežití a růst kontrolních vzrostných vrcholů po dehydrataci stejné. A to u jabloní $93 \pm 8,9\%$ a hrušní $92 \pm 12,8\%$. Mezikultivarové rozdíly nebyly zaznamenány. Oproti tomu u višňi a jahodníku byly zaznamenány rozdíly v regeneraci kontrolních vzrostných vrcholů po dehydrataci. Například kultivary ‘Mailot’ a ‘Vackova’ u višňi a ‘Senga Sengana’ a ‘Elsanta’ u jahodníků dosahovaly oproti ostatním kultivarům višňi a jahodníku velmi malého přežití (0-53%) i regenerace (0-20%). U dehydratovaných vzrostných vrcholů a obalového alginátu byly detekovány skelné přechody. Při hodnotách pod $0,6 \text{ g v g s}^{-1}$ se u vzorků začaly objevovat skelné přechody, u kterých teplota rostla od $-88 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ($0,6 \text{ g v g s}^{-1}$) do $-45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ($0,24 \text{ g v g s}^{-1}$) viz. Obr. 1.



Obr.1 Skelné přechody (Tg) enkapsulovaných vzrostných vrcholů ovocných plodin. Měřeno pomocí diferenčního skenovacího kalorimetru DSC TA2920 při ohřevu vzorků rychlostí $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$

Diskuse

Dormantní pupeny

Jabloně přežívaly po dvoustupňovém kryoprotokolu v průměru $35 \pm 12,6\%$, zatímco hrušně pouze $16 \pm 15,3\%$. U citlivějších kultivarů hrušní pravděpodobně docházelo k poškození již v průběhu prvního stupně použitého dvoustupňového kryoprezervačního postupu. Mezi nejvíce odolné kultivary po kryoprezervaci byly u jabloní ‘Prima’, ‘Spartan’. Kultivary ‘Zvonkové’ a ‘Melrose’ patřily k nejméně mrazuvzdorným po kryoprezervaci do LN. U hrušní byly se lišily pouze dvě skupiny, kdy v odolnější skupině po kryoprezervaci byla pouze ‘Williamsova červená’, která patří mezi méně mrazově odolné než ‘Clappova’, která naopak byla ve skupině, která vykazovala menší přežití po kryoprezervaci. Je možné se domnívat, že se kultivar ‘Clappova’ dostatečně neotužil, eventuálně došlo k odotužení v průběhu uchovávání materiálu před kryoprezervací oproti kultivaru ‘Williamsova červená’.

In vitro kultury

Rozdíly v přežití a regeneraci po vystavení ultranízké teplotě existují jak mezi druhy, tak mezi kultivary. Tyto rozdíly mohou být způsobeny jednak rozdílnou reakcí kultivarů na enkapsulačně dehydratační kryoprotokol nebo na otužovací podmínky či na *in vitro* kultivaci jako takovou. Například kultivar jabloně ‘McIntosh’, který patří mezi velmi odolné kultivary (BLAŽEK *et al.*, 1992), měl také v *ex vitro* podmínkách vysokou mrazuvzdornost dormantních pupenů, při testu mrazuvzdornosti dormantních pupenů vykazoval při teplotě -35 °C 65% přežití (BILAVČÍK nepublikováno). V *in vitro* kultuře vykazoval průměrnou mrazuvzdornost (-15 °C). Po kryoprezervaci vzrostných vrcholů u tohoto kultivaru byly také dosaženy jedny z nejvyšších hodnot přežití i růstu. V tomto případě koreluje udávaná schopnost *ex vitro* mrazuvzdornosti s regenerací po působení ultranízkých teplot. Tento závěr však nelze zobecnit, protože například kultivar jabloně ‘Zvonkové’, který v mrazových testech dormantních pupenů jako jediný z jabloní neměl žádné přežití po -35 °C se však v *in vitro* kultuře byl schopen otužit, neboť u jeho vzrostných vrcholů bylo dosaženo minimálních, i když blízcích se nule, hodnot přežití (6%) i růstu (4%).

Výše uváděné údaje svědčící o nutnosti adaptace jednotlivých kroků u různých kultivarů potvrzují také pokusy s kultivarem ‘Greensleeves’. Tento kultivar má ve standardních *in vitro* podmínkách odolnost do -5 °C . V prvních experimentech s kryoprezervací u takto málo odolných rostlin bylo dosahováno téměř nulového přežití a žádné regenerace (data neuvedena). Avšak v dalších pokusech bylo pomocí chladového otužování získáno přežití *in vitro* kultur již do -11 °C . Při dalších experimentech s dlouhodobější kultivací v indukčních podmínkách otužování se podařilo zvýšit odolnost *in vitro* kultury jabloně ‘Greensleeves’ až k hodnotám -25 °C . Následně při kryoprezervaci takto otužené *in vitro* kultury bylo dosaženo hodnot přežití až 75% a regenerace 53%.

Kontrolní vzrostné vrcholy jabloní a hrušní po dehydrataci měly v průměru přežití i prorůstání nad 90%. Oproti tomu kontrolní vzrostné vrcholy višňí a jahodníku vykazovaly vysoké přežití a růst pouze u některých kultivarů. Z výsledků je patrné, že některé kultivary (např. ‘Favorit’ u višně a ‘Maryša’ u jahodníku) měly vysoké přežití i regeneraci dehydratovaných kontrol, avšak velmi malé přežití po ponoření do LN. Regenerace těchto kultivarů byla proto pravděpodobně nejvíce limitována vlastním zmrazovacím krokem enkapsulačně dehydratačního kryoprotokolu.

Jinak reagovaly vzorky višně, např. *Ceropadus*, u kterého jsou hodnoty přežití i růstu kontrol po dehydrataci celkově nižší (49%, resp. 43%), avšak tytéž hodnoty vzrostných vrcholů vystavených působení LN jsou přibližně stejné (42%, resp. 42%), z čehož se dá usoudit, že došlo k limitaci regenerace již v kroku dehydratace a ne působením LN. Dalším typem regenerace vzrostných vrcholů *in vitro* kultur po jejich vystavení enkapsulačně

dehydratačnímu kryoprotokolu je malé přežití kontrol jak po dehydrataci, tak po následném zamrazení do LN. K tomuto jevu docházelo v jisté míře u všech druhů, např. u kultivarů jabloní 'Alkmene' a 'Zvonkové', u hrušní 'Clappova', u višně 'Vackova' a u jahodníku 'Senga Sengana'.

U jahodníku, kultivaru Lidka, bylo dosaženo větší hodnoty růstu než přežití. Tento výsledek je pravděpodobně způsoben tím, že vzrostné vrcholy jahodníku jsou oproti vzrostným vrcholům ostatních zkoumaných ovocných druhů více kryty okolními pletivy, která jsou hnědá a proto při hodnocení přežití vizuálně podle zelené barvy vzrostného vrcholu může docházet k podhodnocení.

Závěr

Dormantní pupeny jabloní kryoprezervované dvoustupňovou metodou přežívaly v průměru z 35%. Dormantní pupeny hrušní přežívaly v průměru z 16%. Nebylo dosaženo regenerace kryoprezervovaných dormantních pupenů v nové rostliny v *in vitro* podmínkách ani metodou očkování. Proto nebyl tento postup kryoprezervace zaveden do projektu kryobanky a byl aplikován postup s využitím *in vitro* kultur.

Reakce kultivarů ovocných dřevin na enkapsulačně dehydratační kryoprotokol byla různá. Průměrné přežití a růst kryoprezervovaných vzrostných vrcholů jabloní byl 55%, resp. 43%, hrušní 41%, resp. 33%, višně 20%, resp. 14% a jahodníku 22%, resp. 15%. Ze zkušeností získaných během kryoprezervace *in vitro* kultur druhů a kultivarů ovocných plodin vyplývá, že je nezbytné modifikovat kryoprotokol podle požadavků jednotlivých druhů a kultivarů v závislosti na termických charakteristikách a odolnosti k dehydrataci vzrostných vrcholů. V *in vitro* kultuře bylo do roku 2004 zavedeno 58 kultivarů od 4 druhů ovocných plodin, v kryobance je uchováno 42 kultivarů s průměrnou regenerací doposud zhodnocených 25 kultivarů 30%. Do *ex vitro* podmínek bylo zpětně regenerováno 16 kultivarů.

Poděkování

Práce na tomto článku byla částečně podporována projekty Ministerstva zemědělství ČR MZe 0002700602 a QC 1052.

Literatura

- Anonym (2002) Situační a výhledová zpráva, Ovoce, říjen Ministerstvo zemědělství České republiky, Praha
- BLAŽEK J, DVOŘÁK A, KALÁŠEK J (1992) Jabloň domácí. In KUTINA J, a kolektiv, eds, Pomologický atlas 2, Zemědělské nakladatelství Brázda, Praha, pp 8-101
- GROSPIETSCH M, BILAVČÍK A, ZÁMEČNÍK J (1999) Importance of high warming rates for survival of the cryopreserved shoot tips of potato (*Solanum tuberosum* L.). Cryobiology 39:338-339
- MAČR (2002) Future prospects - Fruit, October, Ministry of Agriculture of the Czech Republic, Prague. Situační a výhledová zpráva, Ovoce, říjen Ministerstvo zemědělství České republiky, Praha
- MURASHIGE T, SKOOG F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473-479
- SEDLÁK J, PAPRŠTEIN F, BILAVČÍK A, ZÁMEČNÍK J (2001) Adaptation of apple and pear plants to *in vitro* conditions and to low temperature. Acta Hort (ISHS), 560:457-460

Kontaktní adresy autorů

RNDr. Alois Bilavčík, PhD, Ing. Jiří Zámečník, CSc. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně

E-mail: bilavcik@vurv.cz, zamecnik@vurv.cz

Ing. František Paprštejn, CSc., Ing. Jiří Sedlák Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o., Holovousy 1, 508 01 Hořice v Podkrkonoší; E-mail: fp@vsuo.cz, sedlak@vsuo.cz

Metody a perspektivy konzervace kolekce bramboru

Miloš Faltus¹, Jaroslava Domkářová²

¹Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha 6 – Ruzyně

²Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod s.r.o

Souhrn

V uvedeném přehledu jsou popsány existující metody konzervace kolekce bramboru. Existují tři základní metody konzervace bramboru: polní kolekce, *in vitro* kolekce a kryoprezervace. U kryoprezervačních metod jsou uvedeny jednotlivé kryoprezervační postupy používané u bramboru ve světě. U jednotlivých metod konzervace jsou popsány jejich výhody a nevýhody a praktická využitelnost těchto metod. V příspěvku je popsán stav konzervace kolekce bramboru v České republice a informace o založení kryobanky bramboru, včetně prvních výsledků kryobanky.

Klíčová slova: konzervace, brambor, *Solanum*, kryoprezervace

Summary

Methods for conservation of potato collection are reviewed. Three basic methods are employed for conservation of potato genetic resources: field collection, *in vitro* collection and cryopreservation. Individual cryopreservation procedures for potato are described. Advantages and disadvantages of each cryopreservation procedure and their applicability are presented. Information about conservation of potato collection in the Czech Republic and the establishment of cryobank for potato including the first results of the cryobank are reported.

Key words: conservation, potato, *Solanum*, cryopreservation

Úvod

Brambor patří mezi naše hospodářsky významné plodiny. I když se nejedná o původní druh, dnes je již neodmyslitelnou součástí našeho jídelníčku i významnou plodinou pro krmné využití a průmyslové zpracování. Pod pojmem brambor máme namysli obvykle kulturní druh brambor hlíznatý (*Solanum tuberosum*, L.), ale označují se tak i další příbuzné plané druhy rodu *Solanum*.

Polní kolekce

Z pěstitelského hlediska se jedná o plodinu množenou vegetativně. To souvisí s tetraploidním charakterem odrůd *S. tuberosum* a jejich vysokou heterozygotností. Vegetativní množení plodiny je usnadněno tvorbou hlíz. I když rostliny tvoří také semena, ta nelze z výše uvedených důvodů heterozygotnosti použít pro uchování genotypů. Výjimkou jsou pouze některé plané, případně i kulturní druhy rodu *Solanum* (HOWARD, 1980). Tradičně byl proto brambor uchováván a množen ve formě hlíz. Prakticky to znamenalo, vzhledem k tomu, že se jedná o jednoletou bylinu, každoročně vysazovat hlízy na pole, a tak kolekce odrůd udržovat. Zde však byly rostliny vystaveny silnému tlaku škodlivých biotických i abiotických činitelů. Zejména vlivem patogenů docházelo ke ztrátě genotypů až už jejich zničením nebo jejich degradací. Proti tomu se uplatňovala řada opatření, jako například výběr pěstebních oblastí, chemická ochrana, negativní výběry. Tzv. polní kolekce se udržely do současnosti, ale jejich pěstební plochy se omezují.

Kolekce *in vitro*

Další metodou uchování kolekce brambor je technika *in vitro*. Jedná se o využití systému tkáňových kultur pěstovaných v aseptických podmínkách pro uchování genových zdrojů. Tento systém umožňuje prakticky po neomezenou dobu uchovat genotypy bez nebezpečí jejich ztráty v důsledku působení patogenů působících v polních kolekcích. Růstová média a kultivační teplota jsou optimalizované tak, aby subkultivační interval byl co

nejdelší, a tím se omezila nutnost rostliny přesazovat na čerstvá media. Takto lze uchovat rostliny v podmínkách *in vitro* přibližně jeden rok, v závislosti na genotypu, bez dalšího zásahu člověka. V současnosti se převádějí a uchovávají genové zdroje bramboru v kolekcích *in vitro* a zároveň se provádí jejich ozdravování od virů. Světová síť genových bank bramboru dnes pracuje výhradně na principu *in vitro* konzervace.

Využití umělých semen

Další potenciální možností konzervace genových zdrojů bramboru je využití tzv. umělých semen. Metoda spočívá v enkapsulaci vegetačních vrcholů bramboru pěstovaných *in vitro* do alginátu a jejich uchování při snížené kultivační teplotě. Tato metoda se zatím nezdá být příliš perspektivní, protože po roce kultivace umělých semen při snížené teplotě dochází k poklesu jejich regenerační schopnosti. Tato metoda je v podstatě jistou obdobou metody uchovávání *in vitro*, ale při vyšší pracnosti (tvorba alginátových kuliček z *in vitro* kultur) a s nižší efektivitou (po 1 roce pokles regenerační schopnosti). (NYENDE *et al.*, 2003)

Metody kryokonzervace

Kryokonzervací se rozumí uchovávání genových zdrojů při ultranízkých teplotách. V praxi jde o teplotu bodu varu tekutého dusíku, tj. -196 °C při uložení vzorků přímo v tekutém dusíku, případně -150 °C, při uložení v parách tekutého dusíku. Principem metody je existence skelné struktury v pletivech při ultranízkých teplotách. Sklo lze definovat jako vysoce viskózní kapalinu, a v tomto stavu jsou veškeré chemické reakce prakticky zastaveny. To umožňuje stabilizovat materiál a uchovat ho v nezměněné podobě po neomezenou dobu. Metody kryokonzervace musí vyřešit problém, jak dostat uchovávaný materiál do skelného stavu a po uskladnění ho opět vrátit do růstové fáze. Často se jedná o genetický materiál, který za přirozených podmínek nesnáší vystavení rostlin teplotám jen několik stupňů pod bodem mrazu. Příkladem mohou být rostliny bramboru. Přesto metody kryokonzervace umožňují dosáhnout i v tomto materiálu skelného stavu a uchovat je dlouhodobě při ultranízkých teplotách. Úspěšnost této metody (regenerace rostlin) není stoprocentní, ale je vyváжена prakticky neomezenou dobou uchování takto skladovaného materiálu.

Metody kryokonzervace bramboru ve světě

Metoda ultrarychlého mrznutí – metoda předkultivace-desikace

Tato metoda využívaná ve VÚRV je založena na 5-ti denní předkultivaci nodálních segmentů bramboru na mediu s přídavkem 2 M sacharosy. Izolované vzrostné vrcholy jsou syceny přes noc na 0,7 M sacharose a následující den dehydratovány na hliníkových plíšcích 3 hodiny nad silikagelem. Pak jsou vrcholy zamrazeny přímým ponořením do tekutého dusíku. Tání vzorků se provádí jejich přímým ponořením do vodní lázně o teplotě asi 40 °C. Regenerace probíhá na růstovém mediu s přídavkem fytohormonů (GROSPIETSCH *et al.*, 1999).

Metoda ultrarychlého mrznutí - kapková metoda

Tato metoda je rutinně používána v IPK Gatersleben. Nejprve se izolují vzrostné vrcholy a ty jsou přes noc inkubovány v tekutém živném mediu. Druhý den se vrcholy přenesou do stejného tekutého media s přídavkem 10% dimethylsulfoxidu (DMSO) na 2 hodiny. Každý vrchol se pak umístí do kapky 10% DMSO na hliníkovém plíšku. Ten se podobně jako u předchozí metody přímo ponoří do tekutého dusíku. Tání vzorků se provádí ponořením vrcholů do tekutého media o teplotě asi 40 °C. Regenerace probíhá na kapce agarosy v tekutém mediu s fytohormony. (SCHÄFER–MENUHR, 1996).

Metoda enkapsulace-dehydratace

Izolované vzrostné vrcholy bramboru jsou enkapsulovány v 3% alginátu sodném obsahujícím 0,7 M sacharosu. Alginátové kuličky jsou dehydratovány nad silikagelem. Po 8 hodinách sušení jsou enkapsulované vrcholy umístěny do kryozkumavek a ponořeny do tekutého dusíku. Ohřev vzorků se provádí ponořením alginátových kuliček do vodní lázně o teplotě asi 40 °C na 1 minutu. Regenerace rostlin probíhá na MS mediu s fytohormony (FABRE a DEREUDDRE, 1990).

Metoda vitrifikace

Izolované vrcholy jsou kultivovány 2 dny na tekutém mediu se sacharosou a manitolem. Pak jsou vrcholy postupně syceny dvěma vitrifikačními roztoky PVS2 (Plant Vitrification Solution 2). PVS2 obsahuje 30 % glycerol, 15 % ethylenglykol a 15% dimethylsulfoxid v tekutém MS mediu s 0,4 M sacharosou. Nejprve jsou vrcholy syceny 30 minut ve 20 % PVS2 a pak inkubovány 15 minut v 60 % PVS 2. Pak jsou vrcholy dehydratovány 5 minut v koncentrovaném PVS2. Vrcholy jsou pak umístěny do kryozkumavky a ponořeny do tekutého dusíku. Odtávání se provádí v tekutém MS mediu (MURASHIGE a SKOOG, 1962) s 1,2M sacharosou ohřátém na 35 °C. V tomto roztoku jsou vrcholy ponechány 30 minut pro vyplavení zbytků PVS2 roztoku. Regenerace probíhá na MS mediu s fytohormony (SARKAR a NAIK, 1998).

Metoda enkapsulace-vitrifikace

Nodální segmenty bramboru jsou pěstovány až do dosažení stadia objevení se 5 listových primordií. Izolované vegetační vrcholy jsou kultivovány přes noc na MS mediu s 0,3 M sacharosou a fytohormony. Pak jsou vrcholy enkapsulovány v 2% alginátu sodném. Alginátové kuličky jsou umístěny na 90 minut na MS medium s fytohormony, 0,6 M sacharosou a 2 M glycerolem před jejich dehydratací pomocí PVS2. Enkapsulované a vysušené meristémy jsou umístěny do kryozkumavek s PVS2 a pak ponořeny do tekutého dusíku. Tání probíhá ve vodní lázni o teplotě 38 °C a PVS2 roztok je z kryozkumavek odčerpán a nahrazen 2 x 1,2 M roztokem sacharosy pro odstranění PVS2 roztoku (HIRAI a SAKAI, 1998).

Konzervace genových zdrojů v ČR

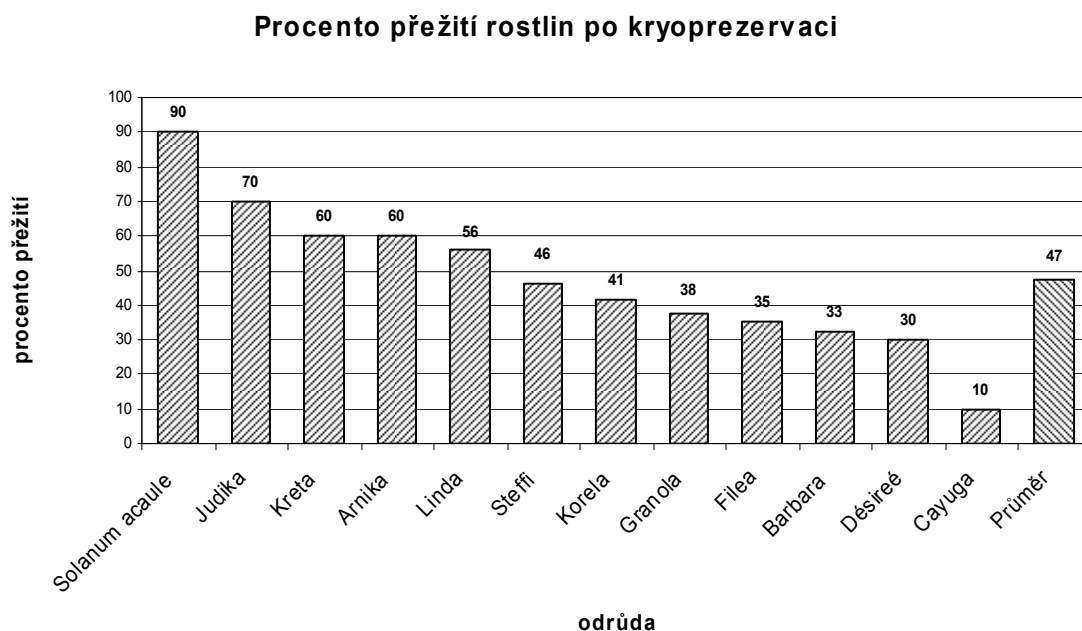
Genobanka bramboru v ČR

Garantem pro uchování kolekce bramboru v ČR je Výzkumný ústav bramborářský s.r.o. Havlíčkův Brod. V kolekci bramboru rodu *Solanum* je 2018 genových zdrojů udržovaných v kultuře *in vitro* (stav rok 2003). Z toho bylo v subkolekci „odrůdy *Solanum tuberosum*“ soustředěno 1 100 vzorků. Ve VÚB se podařilo shromáždit 94 odrůd pocházejících z domácího šlechtění, tj. 84,7 % originálních odrůd. Kolekce českých odrůd udržovaných v genové bance *in vitro* je viruprotá.

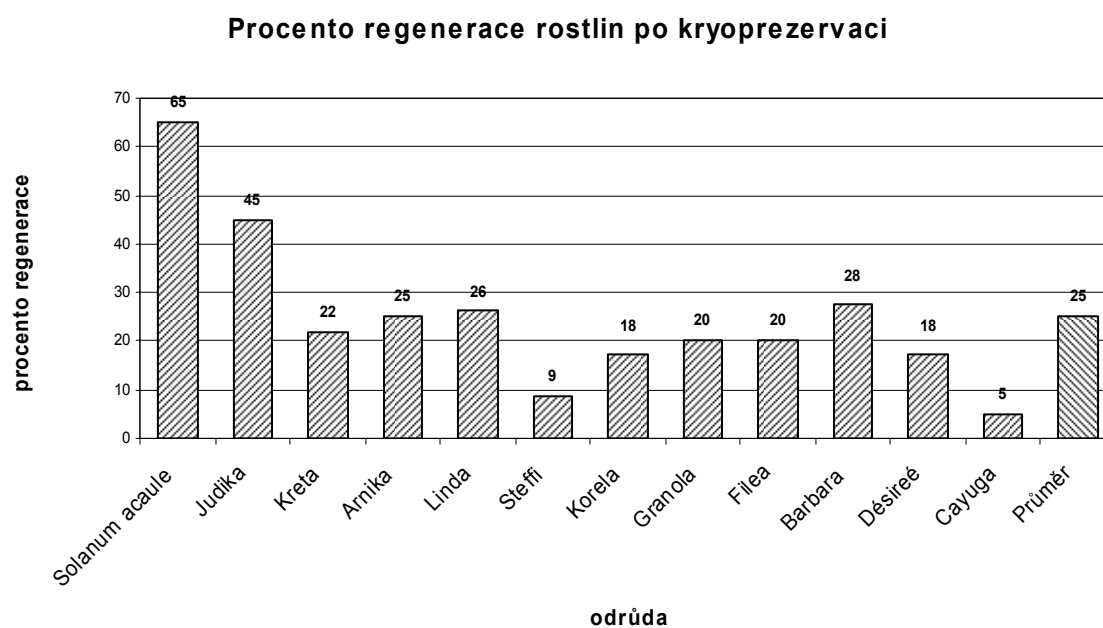
Kryobanka bramboru v ČR

V souvislosti s počátkem řešení projektu MZe QF 3039 došlo ve VÚRV k založení kryobanky bramboru v ČR. V prvním roce byla testována metoda ultrarychlého mrznutí na skupině vybraných genotypů. V prvním roce řešení bylo otestováno celkem 11 odrůd bramboru a jeden genotyp druhu *Solanum acaule*. Do tekutého dusíku bylo uloženo 8 odrůd v celkovém počtu 1120 meristémů. Dosažená průměrná životnost apikálních meristémů po jejich kryoprezervaci byla 47 % (Graf 1). Nejvyšší odolnost po kryoprezervaci měl planý genotyp *Solanum acaule* (90 %). Z kulturních odrůd měla nejvyšší životnost po kryoprezervaci odrůda Judika a to 70 %, nejnižší odrůda Cayuga 10 %. Průměrná regenerace

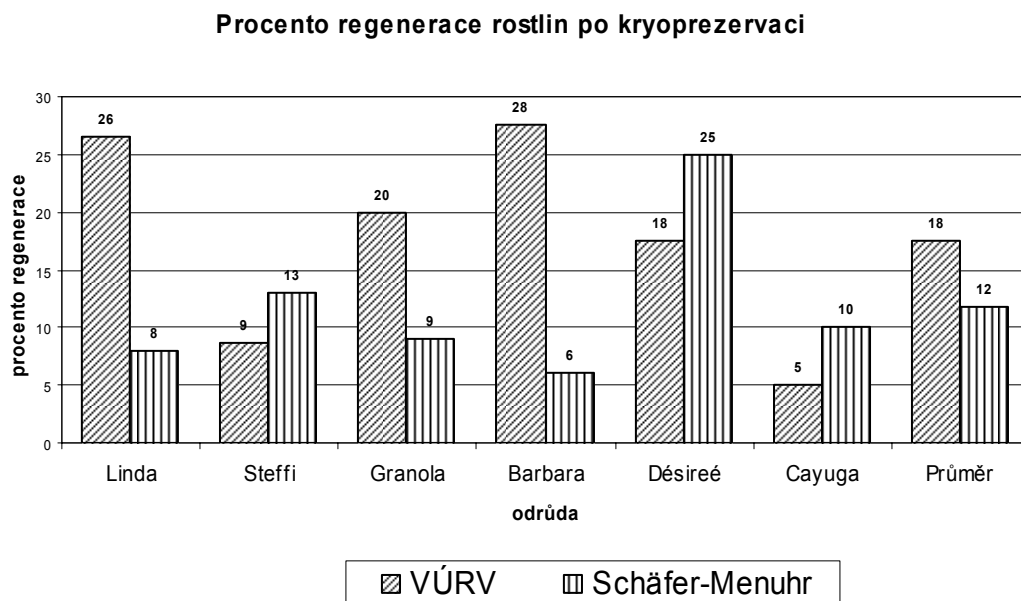
apikálních vrcholů bramboru byla u sledovaných genotypů 25 %. Maximální regenerace po kryoprezervaci byla zjištěna opět u planého genotypu *Solanum acaule* a to 65 %. Z kulturních odrůd měla, podobně jako v případě přežití, nejvyšší regeneraci po kryoprezervaci odrůda Judika, 45 % a nejmenší regeneraci odrůda Cayuga 5 %. Ze všech testovaných genotypů byly odvozeny živé rostliny po kryokonzervaci. Odrůda Barbara byla převedena do *ex vitro* podmínek a otestována na genetickou stabilitu pomocí bílkovinných markerů.



Graf 1 Procento přežití rostlin u jednotlivých odrůd bramboru po kryoprezervaci



Graf 2 Procento regenerace rostlin u jednotlivých odrůd bramboru po kryoprezervaci



Graf 3 Porovnání procenta regenerace rostlin u jednotlivých odrůd bramboru při použití dvou různých kryoprezervačních metod: metoda předkultivace-desikace (VÚRV) a „kapková metoda“ (SCHÄFER–MENUHR, 1996).

Část testovaných genotypů (Linda, Steffi, Granola, Barbara, Désirée, Cayuga) byla záměrně vybrána na základě výsledků dosažených pomocí „kapkové metody“ (Schäfer–Menuhr, 1996). Byly to genotypy, u nichž bylo dosaženo nízké úrovně přežití a regenerace po kryokonzervaci. To umožnilo srovnání výsledků dosažených oběma metodami, a tím i porovnání metod samotných (Graf 3). Průměrné procento regenerace rostlin po kryokonzervaci dosažené metodou používanou ve VÚRV bylo 18 % a kapkovou metodou bylo 12 %. Metodou používanou ve VÚRV bylo dosaženo v průměru mírně lepších výsledků v porovnání s „kapkovou metodou“. Nelze však jednoznačně říci, která z metod je efektivnější, neboť bylo porovnáno pouze 6 genotypů, přičemž 3 z nich vykazovaly lepší výsledky pomocí jedné metody a zbývající 3 genotypy měly lepší výsledky pomocí druhé metody. Lze z toho však usuzovat, že jednotlivé genotypy mohou reagovat odlišným způsobem na různé metody. Výhodou metody používané ve VÚRV je, že výsledků je dosaženo bez použití toxických kryoprotektantů (např. dimethylsulfoxid). Pro otužení rostlin se používá pouze sacharosa v kombinaci s desikací vzorků.

Závěr

Z uvedeného přehledu je patrné, že existují dvě perspektivní metody uchování kolekce bramboru. Především je to metoda uchování *in vitro*, která je v současnosti rutinně používaná ve VÚB v Havlíčkově Brodě. Tato *in vitro* kolekce obsahuje 2018 genových zdrojů rodu *Solanum*. V subkolekci „odrůdy *Solanum tuberosum*“ je soustředěno 1 100 vzorků. Podařilo se shromáždit 94 odrůd pocházejících z domácího šlechtění, tj. 84,7 % originálních odrůd. Druhou perspektivní metodou uchování kolekce bramboru je metoda kryoprezervace. Tato metoda umožňuje skladování genotypů po „neomezenou“ dobu. Limitující je odlišná reakce jednotlivých genotypů bramboru na kryoprezervaci. Pro genotypy, které vykazují nízkou regeneraci po kryoprezervaci, je třeba metody optimalizovat pro dosažení uspokojivé úrovně regenerace. Významným úspěchem bylo založení kryobanky bramboru ve VÚRV v Praze ve spolupráci s VÚB v Havlíčkově Brodě. Výsledky z prvního roku ukázaly srovnatelnost výsledků použité metody s metodou vyvinutou Schäfer–Menuhr (1996) a používanou rutinně

v kryobance v IPK v Gaterslebenu (Německo). Cílem kryobanky bramboru pro nejbližší léta je kryoprezervovat všech 94 odrůd pocházejících z domácího šlechtění a metodicky přizpůsobovat postupy pro zvýšení úrovně regenerace rostlin bramboru po kryoprezervaci u odrůd vykazujících nízkou regeneraci.

Poděkování

Práce na tomto článku byla částečně podporována projektem MZe ČR QF 3039 a grantem GAČR 522/02/D089.

Literatura

- FABRE, J., DEREUDDRE, J.: Encapsulation-dehydration: A new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot tips. *Cryo-Letters* 11, 413–426, 1990
- GROSPIETSCH M., STODULKOVÁ, E., ZÁMEČNÍK, J.: Effect of osmotic stress on the dehydration tolerance of *Solanum tuberosum* shoot tips. *CryoLetters* 20, 339–346, 1999
- HIRAI, D., SAKAI, A.: Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of potato (*Solanum tuberosum* L.) by encapsulation-vitrification. *Proceedings of the JIRCAS/IPGRI Joint International Workshop, held in Tsukuba, Japan, 20–23 October, 205–211, 1998*
- NYENDE, A.B., SCHITTENHELM, S., MIX-WAGNER, G., GREEF, J.M.: Production, storability, and regeneration of shoot tips of potato (*Solanum tuberosum* L.) encapsulated in calcium alginate hollow beads. *In Vitro Cellular and Development Biology - Plant*, 39, 540–544, 2003
- SARKAR, D., NAIK, P.S.: Cryopreservation of Shoot Tips of Tetraploid Potato (*Solanum tuberosum* L.) Clones by Vitrification. *Annals of Botany* 82, 455–461, 1998
- SCHÄFER–MENUHR, A.: Refinement of cryopreservation techniques for potato. Final Report for the period 1 Sept. 1991–31 Aug. 1996. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, 1996

Kontaktní adresy autorů

Ing. Miloš Faltus, PhD Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně
E-mail: faltus@vurv.cz

Ing. Jaroslava Domkářová, PhD Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod s.r.o., Dobrovského 2366, 580 03 Havlíčkův Brod
E-mail: domkarova@vubhb.cz

Možnosti kryokonzervace zelenin rodu *Allium*

Jiří Zámečník¹, Helena Stavělíková²

¹Výzkumný ústav rostlinné výroby Praha 6 – Ruzyně

²Výzkumný ústav rostlinné výroby, pracoviště Olomouc

Summary

Recently wide spread methods being used in cryopreservation of plants are based on vitrification. There are two main methods how to involve vitrification status in plants. The most promising results were obtained by the first method, which uses the cryoprotectants to involve glassy state during freezing to ultra low temperatures. By the second method lower regeneration was obtained. This method is based on encapsulation and dehydration of shoot tips to the cell content resulting in glassy state involvement. Tissue cultures of *Allium* plants are an important biotechnological step before and after cryopreservation

Key words: cryopreservation, *Allium*, garlic, vitrification

Souhrn

Metoda vitrifikace doznala v nedávné době velkého rozšíření při kryoprezervaci rostlin. Testovány byly dvě hlavní metody kryoprezervace založené na vitrifikaci. Lepších výsledků bylo dosaženo při použití metody, která využívá kryoprotektivní látky vyvolávající v rostlinách tvorbu skelných struktur. Nižší regenerace rostlin rodu *Allium* bylo dosaženo při použití metody enkapsulace-dehydratace. Pro přípravu rostlin před kryoprezervací a jejich regeneraci po kryoprezervaci bylo použito metod kultivace rostlin v *in vitro* podmínkách.

Klíčová slova: kryoprezervace, *Allium*, česnek, vitrifikace

Úvod

Klasický způsob uchování genofondu rostlin rodu *Allium* v polních podmínkách vyžaduje velký vklad práce a rozsáhlé kultivační plochy. Tento způsob udržování kolekce je rizikový s nejistým výsledkem vzhledem k působení nepříznivých biotických a abiotických podmínek prostředí. Proto jsou hledány alternativní možnosti pro bezpečné uchování kolekce.

Polní kolekce

Kolekce *Allium*, která je udržovaná na pracovišti genové banky v Olomouci, čítá 621 položek a řadí se k velkým světovým sbírkám. Má status mezinárodní kolekce pro vegetativně množené rostliny druhu *Allium* v podmínkách dlouhého dne. Uchování v polních podmínkách má vysoké riziko ztráty jednotlivých položek vlivem výskytu chorob, škůdců a nepříznivých klimatických faktorů. Např. v roce 1997 byla existence této kolekce vážně ohrožena povodněmi. Vzimě 2002/2003 byla kolekce ohrožena znovu, když holomrazy byly vystřídány intenzivním deštěm, který následně zmrzl a porost byl po dva měsíce uzavřen v ledové vrstvě.

Převod do *in vitro* podmínek

Alternativou polních kolekcí pro uchování genofondu vegetativně množených rostlin je zachování tkáně nebo celé rostliny v podmínkách *in vitro* s normálním nebo omezeným růstem. *In vitro* podmínky pro konzervování rostlin *Allium* nejsou optimální pro dlouhodobé skladování, vzhledem k potřebě časté subkultivace, případné kontaminaci mikroorganismy, vyšší pravděpodobnosti mutace, somaklonální variability a případným omylům souvisejícím s manipulací s tkáňovou kulturou. Tkáňových kultur však lze s úspěchem využít k namnožení rostlin *Allium* a jejich standardní přípravu před zamrazením do ultranízkých teplot. Tkáňové kultury jako předstupeň pro kryoprezervaci mají mnoho důležitých výhod. Během zavedení rostlin do podmínek *in vitro* jsou tyto zbaveny kontaminací houbami a bakteriemi. Někdy se však i u symptomaticky zcela zdravé kultury při několikanásobném pasážování rostlin v *in*

in vitro podmínkách mohou projevit vnitřní kontaminace, které nejsou zjevné po zavedení rostlin do sterilních podmínek. Díky těmto vnitřním kontaminacím se i přes všechno úsilí a dodržení aseptických podmínek často nedaří udržet kulturu zdravou. Někteří autoři poukazují, že vnitřní kontaminace se vyskytují i po několika letech po vícenásobném pasážování (FELLNER *et al.* 1996), tento fakt podporují také naše zkušenosti. Vnitřní kontaminace mohou mít vliv i na úspěšnou regeneraci rostlin po kryoprezervaci (HANNAN a GAROUTTE 1998). Rostliny v tkáňové kultuře se využívají k namnožení materiálu pro kryoprezervaci. Namnožení rostlin v *in vitro* kultuře nese s sebou také určitá rizika, například výskyt tzv. hyperhydricity (LUTHAR a BOHANEK, 1999), která má za následek deformaci rostlin vedoucí k jejich degeneraci až úhynu.

Konzervace v *in vitro* podmínkách

První zmínky v literatuře o kulturách rodu *Allium* v podmínkách *in vitro* se datují již od sedmdesátých let. Existuje mnoho literárních údajů týkajících se pěstování rodu *Allium* v *in vitro* kulturách, ale je jen málo zmínek o konzervaci rostlin v *in vitro* podmínkách (MAKOWSKA *et al.* 1999). U druhu *Allium cepa* jsou známy údaje o uchování při teplotě -1°C po předchozí kultivaci na médiu s vysokým obsahem sacharózy. Podobně jako se tvoří mikrohřízky u brambor v *in vitro* kultuře, tvoří rostliny česneku mikrocibulky, které je možné také skladovat. Lze z nich vypěstovat zdravé rostliny i po době skladování delší než jeden rok. Nevýhodou této metody je, že během skladování mikrocibulek dochází k nekontrolované ztrátě regenerační schopnosti a musí se u nich stimulovat růst při novém napěstování v *in vitro* podmínkách se všemi riziky spojenými s uchováváním rostlin v tkáňových kulturách.

Pro kryoprezervaci je možné použít vzrostné vrcholy extirpované z pacibulek. Vzrostné vrcholy z pacibulek jako výchozí materiál pro kryoprezervaci mají nevýhodu v posklizňové dormanci, možné kontaminaci, velikostní nevyrovnanosti a ne všechny rostliny rodu *Allium* tvoří toulce s pacibulkami. Nejméně vhodným výchozím materiálem pro kryoprezervaci jsou vzrostné vrcholy extirpované ze stroužků. Vedle nevýhod zmíněných u pacibulek se u vzrostných vrcholů ze stroužků přidružuje častá kontaminace. Použití vzrostných vrcholů z pacibulek je výhodné vzhledem k menším kontaminacím oproti stroužkům z palic, které mají kontakt se zemí.

Metody kryokonzervace

Jako perspektivní způsob uchování genofondu rostlin se jeví jejich uložení v ultranízkých teplotách pomocí metod kryoprezervace. Metody kryoprezervace rostlin rodu *Allium* jsou založeny na zamrazení vzrostných vrcholů obsahujících meristematické buňky v tekutém dusíku a jejich úspěšné regeneraci po odtátí vzorků.

Kryoprezervace je založena na podstatném snížení až zastavení metabolických pochodů, a tím i genetických změn biologického materiálu uloženého v ultra-nízkých teplotách. Cíl kryoprezervace je kryogenní uchování rostlinných částí po dlouhé období bez podstatné změny genetické informace a s možností následné regenerace rostlin.

Metody vitrifikace

V poslední době se rozšířily v konzervaci biologických objektů významně metody zmrazení založené na vitrifikaci (zeskelnění). Sklo je amorfni stav hmoty, v kterém je při nízkých teplotách omezena tvorba letálních krystalů ledu v pletivech rostlin. Sklo je kapalina s viskozitou pevné látky (HIRSH 1982), nebo sklo je viskózní kapalina s nekystalickou strukturou pevné látky (WILLIAMS a LEOPOLD 1995). Vitrifikace je vhodná pro dlouhodobé uchování biologického materiálu při zanedbatelné difúzi a z toho vyplývající genetické stabilitě uchovávaných rostlin.

K vyvolání skelného stavu v rostlinách se používá řada metod, z nichž dvě vybrané byly odzkoušeny pro rostliny rodu *Allium*. První metoda je **enkapsulace-dehydratace**, při které se aktuální obsah buněčného roztoku odvodněním koncentruje až na úroveň, kdy konečná vysoká koncentrace látek napomáhá vytvářet sklovitou bezkrystalickou strukturu při poklesu teplot pod 0 °C. Druhá metoda je **vitřifikační s použitím chemických kryoprotektantů**, které v buňkách napomáhají vytvářet skelný stav. Obecné metodické zásady a teoretická východiska jsou popsány v příspěvku „Teoretické základy uchování rostlin a jejich částí v ultranízkých teplotách“ a v příspěvku „Metody kryoprezervace“. Dále budou popsána specifika týkající se kryoprezervace rostlin *Allium* s cílem konzervace zmrazením.

Metoda enkapsulace-dehydratace

Izolované vzrostné vrcholy *Allium* byly obaleny v 2% alginátu sodném zesíťovaném v 100 mM CaCl₂ s 0,7 M sacharózou. Enkapsulované vzrostné vrcholy v alginátových kuličkách byly dehydratovány nad silikagelem. Po 1-4 hodinách sušení byly enkapsulované vrcholy umístěny do kryozkumavek a ponořeny do tekutého dusíku. Ohřev vzorků se prováděl ponořením alginátových kuliček do vodní lázně o teplotě 40 °C na 1 minutu (FABRE a DEREUDDRE, 1990). Regenerace rostlin probíhala na MS mediu s fytohormony. Enkapsulace vzrostných vrcholů v alginátových kuličkách brání rychlé dehydrataci a s největší pravděpodobností se příznivě podílí i při regeneraci vzrostných vrcholů. Poměr koncentrace alginátu a roztoku CaCl₂ je optimalizován pro takovou tuhost alginátových kuliček, kterou jsou vzrostné vrcholy schopné růstem při regeneraci překonat. Dehydratace vyvolá amorfní stav buněk, který je vhodný pro zamrazení vzrostných vrcholů do teplot tekutého dusíku a pro dlouhodobé skladování položek *Allium*. Skelný stav dosažený jednoduchou dehydratací byl navozen i v dalších plodinách (BILAVČÍK a ZÁMEČNÍK 2001, GROSPIETSCH a ZÁMEČNÍK 2001, ZÁMEČNÍK *et al.* 2001).

Metoda vitřifikační s použitím chemických kryoprotektantů

Při dlouhodobém výzkumu kryoprezervace se osvědčily některé látky s kryoprotektivním účinkem, které mají pozitivní vliv na přežití a regeneraci biologických objektů skladovaných v ultranízkých teplotách. Některé kryoprotektanty se používají pro přímou ochranu rostlin při jejich konzervování zamrazením. Nejvíce rozšířenou kryoprotektivní látkou je dimethylsulfoxid (DMSO), který se používá samotný nebo častěji ve směsích. Z dalších látek s kryoprotektivním účinkem lze jmenovat etylenglykol, glycerol, sacharózu a sorbitol v různých kombinacích a koncentracích. Směs kryoprotektivních látek používaná při vitřifikační metodě kryoprezervace vyvolá v buňkách skelný stav, který je nezbytný pro zachování regenerace rostlin po odtátí z ultranízkých teplot.

NIWATE (1995) se poprvé zmiňuje o kryoprezervaci meristémů česneku s použitím směsi kryoprotektivních látek označované jako PVS2 (z anglické zkratky Plant Vitřification Solution), která obsahuje (30% glycerol, 15% etylen glykol, 15% DMSO a 0,4 M sacharózy v MS mediu (SAKAI *et al.* 1990). HAMMAN and GAROUTE (1998) zopakovali stejný postup a dosáhli přežití až 72%. Podobně jsme v našich pokusech dosáhli 84% regenerovaných rostlin po ponoření rostlin v PVS2 roztoku do tekutého dusíku (viz Tab.1).

Tab. 1 Procento přežití a regenerace vzrostných vrcholů *Allium* 1669 kryoprezervovaných dvěma vitřifikačními metodami. (Tři nezávislé experimenty s 200 vzrostnými vrcholy.)

Vitřifikační metody	Přežití %	Regenerace %
Vitřifikační roztok (PVS2)	89	82
Enkapsulace – dehydratace	48	45

MAKOWSKA *et al.* (1999) získala vyšší hodnoty přežití při použití jiné směsi kryoprotektivních látek tzv. PVS3 (50% sacharózy a 50% glycerolu v tekutém MS médiu) podle NISHIZAWA *et al.* 1993 ve srovnání s PVS2. Delší doba dehydratace až 120 min při 20 °C je nutná pro dosažení vitrifikovaného stavu při použití PVS3 (KELLER a ZÁMEČNÍK nepublikováno). MAKOWSKA *et al.* (1999) dosahovala nejvyšší regenerace (80%) po 240 minutách ovlivnění PVS3 vzrostných vrcholů extirpovaných ze stroužků a pouze 37% regeneraci u vzrostných vrcholů extirpovaných z pacibulek.

Doba pobytu rostlin ve vitrifikačním roztoku je velmi důležitá, protože optimální inkubační čas pro vytvoření skelného stavu v rostlinách je velmi krátký. Kratší pobyt vzrostných vrcholů ve vitrifikačním roztoku nemá příznivý vliv na přežití rostlin po působení ultranízkých teplot. Po delším pobytu vzrostných vrcholů rostlin *Allium* ve vitrifikačním roztoku může dojít k hluboké dehydrataci, která má negativní vliv na životnost kryoprezervovaných vzrostných vrcholů. Dalším nepříznivým vlivem kryoprotektivních látek obsažených ve vitrifikačním roztoku je jejich toxické působení, hlavně působení dimetylsulfoxidu. Nepříznivý účinek kryoprotektivních látek lze zmírnit nízkou kladnou teplotou při ovlivnění vzrostných vrcholů rostlin *Allium*. Při nízkých teplotách aplikace vitrifikačního roztoku se celý proces difúze do rostlin zpomalí, takže se prodlouží optimální doba pro pobyt vzrostných vrcholů ve vitrifikačním roztoku, a tím lze zpřesnit i optimální čas pro vitifikaci. Nevýhoda použití nízkých teplot pro ošetření rostlin vitrifikačním roztokem je v 6 až 10 násobném prodloužení doby celého protokolu přípravy rostlin pro zamrazení. Rostlinné části ve stavu skla se tak vyhnou tvorbě ledových krystalů při ponoření do tekutého dusíku.

Tání a regenerace

Odtávání se provádělo v tekutém MS médiu (MURASHIGE a SKOOG, 1962) s 1,2 M sacharózy ohřátém na 40 °C. V tomto roztoku byly vrcholy ponechány 30 minut pro vyplavení zbytků roztoku PVS2. Pro zvláště citlivé druhy je nutné k vymývání zbytků PVS2 použít odstupňované koncentrace sacharózy od 1,2 M po 0,2 M po 20 minutových krocích. Regenerace probíhala na MS médiu s fytohormony (SARKAR a NAIK, 1998). Nevýhodou použití PVS roztoku je nezbytnost jeho odstranění z rostlin. Vitrifikační médium může být vysoce toxické pro rostlinné buňky zvláště při laboratorní teplotě. Vzrostné vrcholy rostlin se inkubují ve vymývacích médiích pro odstranění toxických kryoprotektivních látek. Osmotický potenciál obklopujícího roztoku je pak v rovnováze s vodním potenciálem buněk vzrostného vrcholu, a ty mohou být přeneseny do příznivých podmínek pro jejich regeneraci a následný růst.

Po rozmrazení rostlin z ultranízkých teplot jsou používány metody kultivace rostlin v *in vitro* kultuře. Složení médií se může lišit od složení kultivačního média při napěstování rostlin před kryoprezervací. Vynechávají se rostlinné hormony, které se přidávají až při druhé pasáži. V regenerační fázi jsou rostliny nejnáchylnější k ostatním stresům, například je může poškodit vysoká intenzita světla. Z tohoto důvodu se rostliny po převedení do regeneračních podmínek 2-3 dny zastíňují, aby nedocházelo k fotoinhibici.

Po odtátí jsou aseptické podmínky pro regeneraci rostlin výhodnější. Čistá kultura prostá bakteriálních, houbových a kvasinkových kontaminací má lepší předpoklad pro regeneraci rostlin po odtátí. Některé buňky jsou poškozené či mrtvé po odtátí z ultranízkých teplot, čímž se stávají vhodnou přirozenou živnou půdou pro rozvoj mikroorganismů. Po reparaci poškozených buněk rostlin je možné je namnožit v *in vitro* podmínkách. Rostliny z podmínek *in vitro* s téměř 100 % relativní vlhkostí je nutné nechat častým větráním přizpůsobit se na nízkou relativní vzdušnou vlhkost. K přesazení se používají vysterilizované substráty ošetřené antibakteriálními a fungicidními přípravky, které jsou používány též k zabránění rozvoje patogenů na zeslabených rostlinách. Rostliny se pak přepichují do

sadbovačů a dopěstovávají se ve skleníku pro následnou výsadbu do polních podmínek (obr1).



Obr.1 Vlevo regenerovaná kontrolní rostlina *Allium* a vpravo po kryoprezervaci

Regenerace vzrostných vrcholů po kryoprezervaci závisí také na velikosti pacibulek. Zatímco MAKOWSKA *et al.* (1999) dosahovala lepší regenerace vzrostných vrcholů z větších pacibulek, tak ZÁMEČNÍK (nepublikováno) dosahoval lepší regeneraci u meristémů získaných z malých pacibulek. Příčina těchto rozdílů je pravděpodobně v lepší regenerační schopnosti vzrostných vrcholů z větších pacibulek a nebo větší rychlosti mrazení dosahovaných u menších vzrostných vrcholů získaných z menších pacibulek

Závěr

Tkáňové kultury rostlin rodu *Allium* se ukázaly jako vhodný výchozí zdroj rostlin pro kryoprezervaci a používají se také pro regeneraci rostlin po odtátí z teplot tekutého dusíku. Pro kryoprezervaci je nezbytné mít vyrovnaný materiál z řízených podmínek dostupný po celou dobu roku.

U rostlin rodu *Allium* byla v naší laboratoři zvládnuta technika převodu rostlin do *in vitro* a jejich namnožení v *in vitro* podmínkách. Problémy lze spatřovat v interní latentní kontaminaci bakteriálního původu v *in vitro* kultuře, projevující se někdy až po jednom roce pěstování rostlin v *in vitro* podmínkách. Zásadním problémem je výskyt virových chorob u *Allium* a jejich ozdravení.

Pro uchování rostlin rodu *Allium* v ultranízkých teplotách s následnou regenerací byly odzkoušeny dva kryoprezervační postupy. Pro kryoprezervaci je využíván postup vyvolání

vitrifikovaného stavu rostlin. Výhodou vitrifikační metody je, že není náročná na přístrojové vybavení a je možné kryoprezervovat rostliny i bez jejich otužování. Nevýhodou je toxicita některých kryoprotektivních látek a jejich potenciální negativní vliv na genetickou stabilitu.

Poděkování

Práce byla částečně podporována výzkumným záměrem MZe 0002700602 a grantem GAČR 522/04/0384

Literatura

- BILAVČÍK A., ZÁMEČNÍK J., (2001) Thermal characteristics of encapsulated apple meristems in alginate beads during air flow dehydration. *Cryobiology*, 43,379
- FABRE J., DEREUDDRE J. (1990) Encapsulation-dehydration: A new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot tips. *Cryo-Letters* 11, 413–426
- FELLNER M., KNEIFEL W., GREGORITS D., LEONHARDT W. (1996) Identification and antibiotic sensitivity of microbial contaminants from callus cultures of garlic *Allium sativum* L. and *Allium longicuspis* Regel. *Plant Science*, 113, 2, 193-201
- GROSPIETSCH M., STODŮLKOVÁ E., ZÁMEČNÍK J. (1999) Effect of osmotic stress on the dehydration tolerance and cryopreservation of *Solanum tuberosum* shoot tips. *Cryo-Letters*, 20,339-346
- GROSPIETSCH M., ZÁMEČNÍK J. (2001) The real water content of encapsulated potato shoot tips after desiccation. *Cryobiology*, 43, 379-380
- HANNAN R., GAROUTTE D. (1998) Long-term storage of garlic (*Allium sativum* L.) using cryopreservation and regeneration in tissue culture. In.: *Proceedings Natl. Onion Res. Confer.* Sacramento USA, 292-298
- HIRSH A.G. (1987) Vitrification in plants as a natural form of cryoprotection. *Cryobiology*. 24, 3, 214-28
- LUTHAR Z., BOHANEK B. (1999) Induction of direct somatic organogenesis in onion (*Allium cepa* L.) using a two-step flower or ovary culture. *Plant Cell Reports*. 18,10, 797-802
- MAKOWSKA Z., KELLER J., ENGELMANN F. 1999. Cryopreservation of apices isolated from garlic (*Allium sativum* L.) bulbils and cloves. *Cryo-Letters*. 20,3, 175-182
- MURASHIGE T., SKOOG F. (1962) Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 15,473-497
- NISHIZAWA S., SAKAI A., AMANO Y., MATSUZAWA T. (1992) Cryopreservation of asparagus (*Asparagaus officinalis* L.) embryogenic cells and subsequent plant regeneration by a simple freezing method. *Cryo-Letters*, 13, 379-388
- NIWATA E. (1995) Cryopreservation of apical meristems of garlic (*Allium sativum* L.) and high subsequent plant regeneration. *Cryo-Letters* 16: 102–107
- SAKAI A, KOBAYASHI S., OIYAMA I. (1990) Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports*. 9(1): 30-33
- SARKAR D., NAIK P.S. (1998) Cryopreservation of shoot tips of tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) *Annals of Botany* 82: 455–461
- WILLIAMS R.J., LEOPOLD A.C. (1995) Changes in glass transition temperatures in germinating pea seeds. *Annals of Botany* 74, 531–540
- ZÁMEČNÍK J., GROSPIETSCH M., BILAVČÍK A., (2001) Dehydration and glass transition of encapsulated garlic shoot tips. *Cryobiology* 43, 328-329

Kontaktní adresy autorů

Ing. Jiří Zámečník, CSc. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně
E-mail: zamecnik@vurv.cz

Ing. Helena Stavěliková, PhD Výzkumný ústav rostlinné výroby, pracoviště Olomouc, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc - Holice
E-mail: stavelikova@genobanka.cz

Konzervace genetických zdrojů vegetativně množených okrasných travin

Magdalena Ševčíková, Šárka Kramolišová

OSEVA PRO s.r.o., Výzkumná stanice travinářská Rožnov - Zubří

Souhrn

Sbírka genetických zdrojů okrasných travin, představuje nejnovější část kolekce shromážděné v rámci Národního programu konzervace a uchování genofondu rostlin a agrobiodiversity na pracovišti OSEVA PRO s.r.o., ve Výzkumné stanici travinářské v Zubří (dále jen VST). Počet položek trvale narůstá v souvislosti se současným trendem utlumení produkční funkce zemědělství a s rozšiřujícím se uplatňováním rostlinných okrasných prvků v životním prostředí člověka. Z počátečního stavu několika položek v roce 1990 se jejich počet zvýšil k 31. 10. 2003 na 146 položek více než sta druhů. Podstatnou část této kolekce představují vegetativně množené druhy (119 položek). Tato sbírka rozšířila kolekci genetických zdrojů pícních a travníkových trav o zcela nové atraktivní druhy s odlišným způsobem praktického využívání v sadovnictví a květinářství. Navázali jsme na práci Výzkumného ústavu Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví v Průhonicích, kde byly okrasné trávy a příbuzné druhy hodnoceny v rámci světových sortimentů trvalek, avšak nebyly evidovány v národním informačním systému pro kolekce genetických zdrojů EVIGEZ a dále udržovány.

Klíčová slova: okrasné traviny, konzervace genetických zdrojů, vegetativně množené druhy, čeleď Poaceae, Cyperaceae, Juncaceae, Sparganiaceae

Summary

Collection of ornamental grasses represents the new part of genetic resources of grasses gathered in the framework of the National Programme for Conservation and Utilization of Plant Genetic Resources and Agro-biodiversity at OSEVA PRO Ltd. Grassland Research Station Zubří. The new sub-collection consists of 146 accessions belonging to more than 100 botanical species. Major part (119 accessions) are vegetatively propagated species maintained in the field collection. Responsibility for ornamental grasses was overtaken from the Silva Tarouca Research Institute for Landscape and Ornamental Gardening in Průhonice, where grasses have created part of perennials collection. Common utilization of grasses as fodder or lawn was enlarged by the new orientation to decorative characters in accordance with the recent trend of gradual decrease of agricultural production and strengthening environmental and landscaping functions.

Key words: ornamental grasses, plant genetic resources conservation, vegetatively propagated species, Poaceae, Cyperaceae, Juncaceae, Sparganiaceae family,

Složení kolekce

Kolekce okrasných travin konzervovaná *ex situ* v Zubří obsahuje položky trav a travám podobných druhů několika různých čeledí:

1. trávy - čeleď Poaceae (lipnicovité),
2. ostřice - čeleď Cyperaceae (šáchorovité),
3. sítiny a biky - čeleď Juncaceae (sítinovitě),
4. zevary - čeleď Sparganiaceae (zevarovitě).

Přehled druhů a počet shromážděných položek uvádí Tabulka 1.

Tab. 1 Seznam druhů okrasných travin a počet položek ve VST Zubří

Trávy (<i>Poaceae</i>)	Počet	Druhy travám podobné	Počet
<i>Agropyron junceum</i>	1	<i>Cyperaceae</i>	
<i>Achnatherum calamagrostis</i>	1	<i>Carex buechananii</i>	1
<i>Arrhenatherum elatius</i> subsp. <i>bulbosum</i>	1	<i>Carex comans</i>	1
<i>Arundinaria pumila</i>	1	<i>Carex conica</i>	1
<i>Arundinaria viridistriata</i>	1	<i>Carex divulsa</i>	1
<i>Avenella flexuosa</i>	1	<i>Carex elata</i>	1
<i>Beckmannia eruciformis</i>	1	<i>Carex flacca</i>	1
<i>Briza media</i>	1	<i>Carex grayii</i>	1
<i>Calamagrostis brachytricha</i>	1	<i>Carex montana</i>	1
<i>Calamagrostis x acutiflora</i>	2	<i>Carex morrowii</i>	1
<i>Cortaderia selloana</i>	6	<i>Carex muskingumensis</i>	1
<i>Corynephorus canescens</i>	1	<i>Carex ornithopoda</i>	1
<i>Deschampsia cespitosa</i>	5	<i>Carex pendula</i>	1
<i>Elymus canadensis</i>	1	<i>Carex petriei</i>	1
<i>Festuca amethystina</i>	1	<i>Carex plantaginea</i>	1
<i>Festuca gautieri</i>	2	<i>Carex pseudocyperus</i>	1
<i>Festuca glauca</i>	3	<i>Carex sylvatica</i>	1
<i>Festuca mairei</i>	1	<i>Carex umbrosa</i>	1
<i>Festuca pallens</i>	1	<i>Scirpus lacustris</i> subsp. <i>tabernaemontani</i>	1
<i>Festuca pumila</i>	1	 Celkem <i>Cyperaceae</i>	18
<i>Glyceria maxima</i>	1		
<i>Hakonechloa macra</i>	1	<i>Juncaceae</i>	
<i>Helictotrichon sempervirens</i>	2	<i>Juncus conglomeratus</i>	1
<i>Chasmanthium latifolium</i>	1	<i>Juncus trifidus</i>	1
<i>Koeleria glauca</i>	1	<i>Luzula luzuloides</i>	1
<i>Koeleria</i> sp.	1	<i>Luzula nivea</i>	1
<i>Leymus arenarius</i>	1	<i>Luzula pilosa</i>	2
<i>Melica altissima</i>	2	<i>Luzula sylvatica</i>	1
<i>Melica ciliata</i>	1	<i>Luzula ulophylla</i>	1
<i>Miscanthus floridulus</i>	2	 Celkem <i>Juncaceae</i>	8
<i>Miscanthus sacchariflorus</i>	2		
<i>Miscanthus sinensis</i>	18	<i>Sparganiaceae</i>	
<i>Molinia arundinacea</i>	3	<i>Sparganium emersum</i>	1
<i>Molinia caerulea</i>	4	 Celkem <i>Sparganiaceae</i>	1
<i>Panicum virgatum</i>	2		
<i>Pennisetum alopecuroides</i>	4		
<i>Pennisetum flaccidum</i>	1		
<i>Phalaris arundinacea</i>	2		
<i>Poa badensis</i>	1		
<i>Poa chaixii</i>	1		
<i>Sesleria autumnalis</i>	1		
<i>Sesleria caerulea</i>	1		
<i>Sesleria heufflerana</i>	1		
<i>Sesleria nitida</i>	1		
<i>Spartina pectinata</i>	1		
<i>Spodiopogon sibiricus</i>	1		
<i>Stipa barbata</i>	1		
<i>Stipa capillata</i>	1		
 Celkem <i>Poaceae</i>	92		

Dokumentace a hodnocení kolekce

Dokumentace pasportních dat s sebou někdy přináší problémy s taxonomickým určením položek a pravostí zahradnických kultivarů, neboť genetické zdroje jsou do kolekce získávány převážně nákupem v okrasných školkách, kde toto nebývá prioritou. Částečným řešením je důsledné počáteční prověření genetického zdroje a pečlivé vedení veškerých údajů.

Okrasné traviny vegetativně množené jsou hodnoceny v trvalých výsadbách, které současně představují polní kolekci *ex situ*. Vytrvalé traviny se hodnotí 4 – 6 užitkových let po výsadbě, neboť některé druhy se vyvíjejí i řadu let (*Cortaderia*, *Miscanthus* aj.). K hodnocení popisných znaků se využívá Klasifikátoru - Trávy (*Poaceae*). Z morfologických znaků jsou nejvýznamnější habitus růstu, výška rostlin, šířka a barva (případně vzor) listu a barva květenství. Z biologických vlastností se zaznamenává rychlost jarního růstu, začátek a intenzita metání a odolnost vůči biotickým a abiotickým stresům, které určují pěstitelskou úspěšnost druhu. Z okrasných znaků jsou subjektivně bodově hodnoceny celková estetická hodnota rostlin a prvky, které ji tvoří (habitus růstu, olistění, květenství), hlavní okrasné období a vhodnost květenství k sušení.

Pro zpracování popisných dat do EVIGEZ se berou v úvahu údaje získané z plně vyvinutých rostlin po 3 vegetační sezóny. V dalších letech se hodnotí jen pěstitelská vytrvalost a odolnost vůči biotickým a abiotickým stresům v letech s extrémním průběhem počasí a při výskytu patogenního činitele.

Regenerace vegetativně množených travin

I když se jedná o vytrvalé druhy, jejich životnost je různá. Starší rostliny některých druhů začínají přirozeně odumírat od středu, vytvářejí méně květenství, jsou nevzhledné a je potřeba je obnovit. Introdukované druhy nejsou v našich podmínkách vždy dostatečně zimovzdorné. Na záhonech nejsou vždy dostatečně splněny požadavky druhu na stanoviště, což rovněž snižuje jejich životnost a pěstitelskou vytrvalost.

Regenerace genetických zdrojů v kolekci je tedy podle druhu nezbytná za 3 - 5 let po výsadbě. Vegetativní způsob rozmnožování se provádí klonováním, kterým se získá homogenní, geneticky identické potomstvo s vlastnostmi mateřské rostliny:

- a) dělením matečné rostliny na několik životaschopných dílů u malých (např. *Festuca*) a středně vzrůstných druhů (např. *Deschampsia caespitosa*) nebo odběrem části matečné rostliny u vzrůstných trsnatých druhů (např. *Cortaderia selloana*, *Miscanthus sinensis*),
- b) odběrem dceřiných rostlin vyrůstajících z podzemních oddenků (rhizomů), např. *Glyceria maxima*, *Phalaroides arundinacea* nebo zakořeňujících z nadzemních výběžků (stolonů) mateřské rostliny u výběžkatých druhů (např. *Buchloe dactyloides*),
- c) z vegetativních částí mateřské rostliny, jako např. oddenkovými řízků (např. *Leymus*, bambusy), hlízkami u *Arrhenatherum elatius* subsp. *bulbosum*.

U druhů pocházejících z mírného pásma je ideální dobou množení časně jaro, případně i počátek podzimu. Klony se vysadí do kontejnerů, umístí do pařeniště, přistíní a zalévají. U velmi pozdě rašících druhů se klonuje koncem jara nebo koncem podzimu ve skleníku. Po řádném prokořenění se rostliny začátkem podzimu nebo až na jaře vysazují na stanoviště.

Záměr

Narůstající počet položek v kolekci vyžadoval v posledních letech trvalé rozšiřování nejen pěstebních ploch, ale i dalších manipulačních prostor (přípravna, pařeniště, skleník). Současná kolekce vegetativně množených okrasných travin nyní navíc vyžaduje převedení na standardní stav ve smyslu zákona nově schváleného zákona 148/2003 Sb.; podle § 13 zákona je každý účastník Národního programu povinen zajistit konzervaci shromážděných vegetativně množených genetických zdrojů uchováním *ex situ* v polní kolekci, zajistit

minimální velikost vzorku (počet rostlin) genetického zdroje pro potřeby konzervace, regenerace a poskytování uživatelům, chránit je a v případě potřeby regenerovat. Na základě těchto povinností přistoupilo naše pracoviště k přípravě vybudování samostatného areálu pro polní kolekci okrasných travin, který by odpovídal předepsaným požadavkům.

K tomuto účelu byl vybrán vlastní pozemek v bezprostředním sousedství VST o výměře cca 2 000 m², který je nutno oplotit. Záhony pro výsadbu okrasných travin budou volně začleněny do větších trávníkových ploch, aby se mohly v budoucnu podle potřeby rozšiřovat. Projekční záměr počítá s vybudováním jezírka pro vlhkomilné a vodní druhy, horské druhy budou vysazovány do kamenných koryt.

Nový areál poskytne dostatečně velkou pěstební plochu s možností výběru stanoviště podle světelných a vlhkostních nároků jednotlivých druhů, umožní další rozšiřování kolekce o nové genetické zdroje a zajistí manipulační prostory a komunikační plochu pro provoz maloparcelní mechanizace i pohyb pracovníků a návštěvníků k záhonům. Bude představovat funkčně i esteticky vyhovující komplex, umožňující nejen vlastní odbornou práci s genetickými zdroji v polní kolekci, ale i využití pro potřeby vzdělávání studentů a zájemců z řad veřejnosti.

Využití okrasných travin

V sadovnictví jsou využívány jak druhy domácí flóry, tak exotické druhy, které byly introdukovány z jiných zemí či dokonce světadílů. U některých druhů byly v zahraničí vyšlechtěny desítky kultivarů (např. u *Miscanthus sinensis*), u většiny se však využívají přirozené formy. V zahradách se traviny jako ozdobné prvky začaly ve větší míře používat až ve 20. století. V současné době využívá zahradní architektura přes 250 druhů. U nás však jejich použití v sadovnických úpravách stále není rozšířeno tak, jak by si tyto druhy zaslouhovaly. Na rozdíl od kosených trávníků jsou okrasné traviny pěstovány podobně jako víceleté nebo jednoleté květiny, tj. na záhonech, ve skupinách nebo solitérně v jednotlivých trsech a během vegetace se nesesekávají. Ohromná morfologická variabilita okrasných travin, které se liší výškou a charakterem růstu, barvou a texturou listů i typem a barvou květenství umožňuje jejich široké uplatnění zvláště v zahradách a partiích přírodního rázu. Okrasné traviny se vysazují do stepních partií (např. druhy rodů *Festuca*, *Helictotrichon*, *Koeleria*, *Leymus*, *Stipa*), skalek (*Carex*, *Festuca*, *Sesleria*), volných trvalkových skupin (*Calamagrostis*, *Deschampsia*, *Molinia*, *Spodiopogon*) - u domácích druhů i v krajině, často do zastíněných zákoutí parků (*Carex*, *Luzula*), k vodním plochám (*Carex*, *Glyceria*, *Juncus*, *Scirpus*, *Spartina*) ap. Výraznými solitéry jsou vzrůstné druhy *Cortaderia selloana*, *Miscanthus sinensis*, *Panicum virgatum*, ale i nižší *Pennisetum alopecuroides*. Stále větší oblibu nalézají trávy v tzv. mobilní zeleni; v nádobách se mohou efektně zkombinovat např. s jehličnany (*Deschampsia*, *Festuca*) nebo pěstovat samostatně (*Hakonechloa*). Při výběru vhodných druhů dosáhneme zajímavých, esteticky působivých efektů od jara do podzimu a dokonce i v zimě jsou zaschlá ojíňená nebo zasněžená květenství zvláštní ozdobou spící zahrady (např. *Miscanthus sinensis*). Kromě okrasného efektu v sadovnictví poskytují mnohé druhy i nádherná květenství využitelná v sušeném stavu k aranžování (*Cortaderia*, *Chasmanthium*, *Miscanthus*, *Panicum* aj. a většina jednoletých trav).

Závěr

Shromažďování a hodnocení sbírky okrasných travin nás obohatilo o nový pohled na dekorativní vlastnosti těchto druhů, které jsou pro využívání v sadovnické praxi často přehlíženy. Zvyšující se zájem veřejnosti o kolekci nás přesvědčuje, že tyto druhy se stále častěji začínají uplatňovat v našich zahradách a parcích.

Literatura

- CHANG, Y., BARKER, R. E., REED, B. M. (2000). Cold acclimation improves recovery of cryopreserved grass (*Zoysia* and *Lolium* sp.). *Cryo-Letters* 21:107-116.
- REED, B. M., DENOMA, J., CHANG, Y. (2000) Application of cryopreservation protocols at a clonal genebank. In: *Cryopreservation of Tropical Germplasm. Current research progress and application*, ENGELMANN F. and TAKAGI H., eds., Japan International Research Center for Agricultural Sciences and International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, 246-249.

Kontaktní adresy autorů

Ing. Magdalena Ševčíková, Mgr. Šárka Kramolišová OSEVA PRO s.r.o., Výzkumná stanice travinářská Rožnov-Zubří, Hamerská 698, 756 54 Zubří
E-mail: sevc@iol.cz

Využití genofundu trav v lučních porostech neprodukčního charakteru

Pavel Šrámek, Magdalena Ševčíková

OSEVA PRO s.r.o., Výzkumná stanice travinářská, Zubří

Souhrn

Trvalé louky a pastviny zahrnují relativně mladá, převážně člověkem vytvořená polopřirozená společenstva, jejichž existence je vázána na určitý hospodářský režim (kosení, pastvu, hnojení). Většinou jsou náhradními společenstvy lesních formací. V České republice zaujímají trvalé travní porosty 22,3 % výměry zemědělské půdy, což představuje 676 tisíc ha trvalých luk a 295 tisíc ha pastvin (2001). Jsou cenným rezervoárem rostlinných druhů. V jejich druhové skladbě dominuje čeleď lipnicovitých (Poaceae), která je na území České republiky a Slovenska zastoupena 266 druhy. Je úkolem pracovníků VST Zubří, která je garantem za kolekci genetických zdrojů trav v ČR, podchytit genofondové bohatství často ohrožených travinných společenstev. Semenný materiál je přímo nebo postupně po přemnožení ukládán do genové banky ve VÚRV v Praze. Pokusně bylo vyzkoušeno využití planých druhů trav a bylin pro obnovu druhově bohatého lučního porostu při zatravňování úhorů výsevem směsí různého složení a použitím různých technik výsevu.

Klíčová slova: trvalé travní porosty, rostlinná společenstva, genetické zdroje rostlin, obnova travních porostů, tvorba krajiny, druhově bohaté směsi

Summary

Permanent grasslands include relatively young semi-natural plant communities developed by human activity mainly as substitution of forests. Their existence is related to the certain management practices (mowing, grazing, fertilization). In the Czech Republic, permanent grasslands cover 22,3% of total agricultural land, i.e. 676 000 ha of meadows and 295 000 ha of pastures (2001). They are valuable source of plant species. Dominating vegetation element are Poaceae family with 266 botanical species on the territory of Czech and Slovak republics. Grassland Research Station in Zubří is responsible for plant genetic resources collection of grasses in the CR including conservation of endangered species. Seed materials are put directly or after necessary regeneration into Gene Bank RICP Prague. Practical use of wild meadow grasses and herbs to restore species-rich grassland was experimentally tested by sowing different seed mixtures and using different establishment techniques in fallows.

Key words: permanent grasslands, plant communities, plant genetic resources, grassland restoration, landscaping, species rich mixture

Genofond trav

Sortiment 29 travních druhů, které se v ČR šlechtitelsky i pěstitelsky využívají, je velmi široký a odpovídá pestrým půdním i klimatickým podmínkám naší republiky. Současná druhová i odrudová skladba umožňuje sestavování lučních i pastevních směsí diferencovaných v ranosti, vhodných pro různé stanovištní podmínky i různý způsob a intenzitu obhospodařování. Rovněž je možné sestavování kvalitních směsí pro nejrozličnější typy trávníků od nejjemnějších okrasných až po zatěžované sportovní. Složení směsí pro druhově bohaté krajinné porosty, jejichž funkce je převážně ekologická a estetická, však vyžaduje podle stanovištních podmínek použití nejen dostupných odrud základních a doplňkových píceňích i trávníkových druhů, ale i zařazení druhů planých trav, které nejsou předmětem šlechtění, ale jejichž přítomnost v polopřirozených travních porostech je typická (např. kostřava žlábkatá *Festuca rupicola*, ovsíře *Helictotrichon* spp., smělky *Koeleria* spp., světep vzpřímený *Bromus erectus*, třeslice prostřední *Briza media*, válečka prapořitá *Brachypodium pinnatum*).

Do trvalých travních porostů krajinného charakteru jsou velmi vhodné odrůdy vytrvalých travních druhů, které byly původně vyšlechtěny pro trávníkové účely. Základními

komponentami směsí jsou drnotvorné druhy kostřava červená, lipnice luční a psineček obecný, na vlhkých loukách se uplatní kostřava rákosovitá, medyněk vlnatý, metlice trsnatá, ve vyšších polohách na krátkostébelných pastvinách jílek vytrvalý, lipnice luční, pohánka hřebenitá a tomka vonná, na výsušných, chudých stanovištích kostřava ovčí. Lipnice smáčkutá se uplatní pro nezemědělské zatravnění na štěrkovitých půdách s obsahem vápníku. Z pícních druhů se využívají na horské louky a pastviny bojínek luční, kostřava červená, lipnice luční a trojštět žlutavý, na čerstvě vlhkých stanovištích kostřava luční, ovsík vyvýšený i srha laločnatá, na vlhkých loukách lipnice bahenní, psárka luční, psineček veliký. K rekultivačnímu zatravňování výsypek, suchých svahů apod. lze využít odrůdy sveřepu bezbranného.

Pro neluční společenstva (lesoparky, stinné parkové partie, zastíněné lemy krajinných trávníků) jsou potřebné i některé lesní druhy trav např. sveřep Benekenův *Bromus benekenii*, sveřep větevnatý *B. ramosus*, srha hajní *Dactylis polygama*, širokolisté kostřava lesní *Festuca altissima* a kostřava obrovská *F. gigantea*, úzkolisté kostřava vláskovitá *F. filiformis* a kostřava různolistá *F. heterophylla*, lipnice hajní *Poa nemoralis*, metlička křivolaká *Avenella flexuosa*, válečka lesní *Brachypodium sylvaticum* i ostřic, z nichž většina rovněž není šlechtěna a množena

Tab. 1 Přehled planých položek v kolekci genetických zdrojů trav a jejich možné využití

Rod		Počet dostupných položek v kolekci	Pícní	Krajin- né	Trávníko- vé	Okrasné
<i>Agrostis</i>	psineček	20	•	•	•	
<i>Alopecurus</i>	psárka	6	•	•		
<i>Arrhenatherum</i>	ovsík	42	•	•		
<i>Anthoxanthum</i>	tomka	2		•		
<i>Avenella</i>	metlička	2		•		•
<i>Brachypodium</i>	válečka	12		•		•
<i>Briza</i>	třeslice	3		•		•
<i>Bromus</i>	sveřep	23	•	•		•
<i>Corynephorus</i>	paličkovec	1		•		•
<i>Cynosurus</i>	pohánka	13		•		
<i>Dactylis</i>	srha	34	•	•		
<i>Danthonia</i>	plevnatec	2		•		
<i>Deschampsia</i>	metlice	5		•	•	•
<i>Elytrigia</i>	pýr	3		•		•
<i>Festuca</i>	kostřava	63	•	•	•	•
<i>Helictotrichon</i>	ovsír	2		•		•
<i>Hierochloa</i>	tomkovice	3		•		
<i>Holcus</i>	medyněk	3		•		•
<i>Koeleria</i>	smělek	3		•	•	•
<i>Lolium</i>	jílek	44	•	•	•	
<i>Melica</i>	strdivka	5		•		•
<i>Molinia</i>	bezkolenec	3		•		•
<i>Nardus</i>	smilka	1		•		
<i>Phalaris</i>	chrastice	1	•	•		•
<i>Phleum</i>	bojínek	41	•	•	•	
<i>Poa</i>	lipnice	83	•	•	•	•
<i>Sesleria</i>	pěchava	1		•		•
<i>Stipa</i>	kavyl	1		•		•
<i>Trisetum</i>	trojštět	11	•	•		
Celkem		433				

Všechny zmíněné druhy jsou předmětem sběrů. V letech 1993 – 2004 jsme se na území ČR zúčastnili čtrnácti sběrových expedic, zaměřených mimo jiné na sběr planých druhů trav, jetelovin a léčivých bylin v přirozených a polopřirozených travinných porostech. Dosud bylo do kolekce zařazeno 433 položek celkem 59 druhů (Tab. 1).

Travinné ekosystémy

Výskyt planých populací je vázán na travinné ekosystémy, z nichž nejvýznamnější jsou společenstva různých typů přirozených a polopřirozených lučních porostů. Hospodářsky nejčastěji využívané travní porosty shrnuje třída *Molinio-Arrhenatheretea*, zahrnující pravidelně nebo občas kosené louky a produktivní pastviny na vlhkých až čerstvě vlhkých stanovištích. Jejich druhové složení a další diferenciaci ovlivňuje nejvýrazněji vodní režim půdy (půdní vlhkost, kolísání hladiny podzemní vody) a dále pastva, která výrazně modifikuje složení porostů výběrem druhů snášejících soustavné mechanické poškozování okusem a sešlapem. Patří k nejlabilnějším polopřirozeným společenstvům, která citlivě reagují na změny ekologických podmínek i na režim obhospodařování. Jsou ohroženy převodem na ornou půdu, odvodněním, přehnojením, ale i ponecháním ladem, protože pak rychle přecházejí ve vysokobylinné nivy nebo předlesní stádia dřevinných porostů. Jsou cenným rezervoárem druhového bohatství našich luk a poskytují velké možnosti pro nalezení ekotypů především kulturních druhů trav, přizpůsobených různým ekologickým podmínkám i různému způsobu a intenzitě využívání.

Čerstvě vlhké typy luk a pastvin řádu *Arrhenatheretalia* na nepodmáčených a nevysychavých stanovištích jsou většinou pícninářsky velmi kvalitní porosty s hodnotnými kulturními druhy trav, jetelem lučním, štírovníkem růžkatým, kopretinou bílou, chrpou luční, řebríčkem obecným aj., které se dále diferencují na:

a) úrodné dvojsečné ovsíkové louky svazu *Arrhenatherion* s převládajícím ovsíkem vyvýšeným, dále kostřavou luční i červenou, srhou laločnatou, psárkou luční;

b) jedno- až dvojsečné květnaté horské louky svazu *Polygono-Trisetion* na půdách se střední zásobou živin s trojštětem žlutavým;

c) krátkostébelné pastviny nížin až horských poloh svazu *Cynosurion* vyrovnaného druhového složení s jíllem vytrvalým, pohánkou hřebenitou, lipnicí luční, bojínkem lučním, jetelem plazivým, na méně úrodných půdách s psinečkem obecným, kostřavou červenou, tomkou vonnou a třeslicí prostřední.

Vlhkomilné louky řádu *Molinietalia* mokrých až střídavě mokrých stanovišť byly odvodňováním a rozoráváním značně redukovány. Jejich význam je převážně mimoprodukční, především hydrologický, filtrační, estetický, na svažitých polohách též protierozní a některé typy jsou významné i produkcí kvalitní píce. Podle vodního režimu se dělí na další podskupiny:

a) krátkodobě zaplavované louky svazu *Alopecurion pratensis*, vyskytující se od nížin do hornatin, s celoročně příznivým vlhkostním režimem, v nichž na lehčích půdách převažuje psárka luční nebo kostřava luční, na těžších půdách se šíří pícninářsky nekvalitní metlice trsnatá;

b) pravidelně vícekrát ročně zaplavované, v létě značně vysychající louky svazu *Cnidion venosi* v aluviích velkých říčních toků v nejsušších oblastech naší republiky, v jejichž druhové skladbě se vyskytují hodnotné pícní trávy psárka luční, lipnice bahenní, psineček veliký, na poněkud sušších stanovištích též kostřava luční;

c) extenzivně obhospodařované střídavě vlhké bezkolencové louky svazu *Molinion* s výrazným kolísáním hladiny podzemní vody a slabším proschnutím půdního profilu

v období sucha, s výskytem vzácných druhů rostlin z čeledi vstavačovitých, jejichž charakteristickým travním druhem je bezkolenec modrý, na sušších lokalitách kostřava červená a kostřava žlábkatá;

d) mokré louky pramenišť a vysokobylinné potoční nivy svazu *Calthion palustris* s jarním přemokřením horní části půdního profilu a bez dalších výrazných výkyvů v průběhu roku, pro něž jsou typické pcháče, blatouchy, skřípina lesní a tužebník jilmový.

Extenzivní louky, pastviny a vřesoviště na chudých kyselých půdách zahrnuje třída *Nardo-Callunetea*. Jsou to krátkostébelná společenstva, která se vyznačují přítomností smilky tuhé, metličky křivolaké, plevnatce poléhavého, vřesu obecného a různých druhů brusnic. Významná je skupina **smilkových luk a pastvin** řádu *Nardetalia*. Patří sem jednak původní až člověkem ovlivněná společenstva horských až subalpínských poloh svazu *Nardion*, případně *Nardo-Agrostion tenuis* s psinečkem obecným a dále druhotné smilkové pastviny a velmi chudé louky v podhorském a horském stupni svazu *Violion caninae* s kostřavou ovčí a kostřavou vláskovitou. Některá společenstva mohou být ohrožena zánikem extenzivního hospodaření (ovčí pastva, jednosečné kosení), hnojením, turistickým ruchem, výsadbou dřevin. Z hlediska genofundu trav jsou zdrojem ekotypů méně vzrůstných druhů, adaptovaných na drsnější podmínky, vhodných pro krajinné trávníky v horských polohách (např. zatravnění sjezdovek).

Suchomilná travinná společenstva se vyskytují v teplých oblastech republiky v rámci nížinného až podhorského stupně na suchých, výhřevných, většinou jižně exponovaných stanovištích, na půdách s vysokým obsahem vápníku. Druhově nejpestřejší xerothermní stepní společenstva náleží do třídy *Festuco-Brometea*, u nichž převažuje mimoprodukční protierozní a estetická funkce vzhledem k bohaté přítomnosti bylin. Zahrnují a) vysokostébelné sveřepové porosty řádu *Brometalia*, zastoupená společenstva svazů *Bromion erecti* se sveřepem vzpřímeným, válečkou prapořitou na bohatších půdách a *Koelerio-Phleion* se smělky, bojínkem tuhým, ovsířem lučním na chudších půdách, b) různé typy porostů řádu *Festucetalia valesiaceae* s převahou úzkolistých teplomilných kostřav (k. walliská, k. žlábkatá, k. sivá), s kavyly, strdivkami, ostřicí nízkou aj. V období intenzifikace došlo k jejich výraznému ústupu, protože tyto porosty v minulosti extenzivně obhospodařované pastvou nebo na výnosnějších půdách kosením byly na hlubších půdách rozorány a na pastvinách došlo po ukončení pastvy k zarůstání křovinami a ruderalizaci. Suchomilná společenstva jsou zdrojem travních druhů, které většinou nebyly v ČR šlechtěny a při zatravňování v nejteplejších oblastech jsou však nepostradatelné a dále ekotypů kulturních druhů trav, které jsou přizpůsobeny suchu a vysokým teplotám.

Mokřadní travinné porosty se vyskytují ve snížených reliéfech, prameništích, rašeliništích a pobřežních zónách rybníků a vodních toků, kde se podzemní voda udržuje většinou nad půdním povrchem. Z druhotných polopřirozených, extenzivně obhospodařovaných luk v pahorkatinách a vrchovinách sem patří některá společenstva třídy *Scheuchzerio-Caricetea fuscae*, řádu *Caricetalia fuscae* s nízkými ostřicemi, suchopýry, sítinami a dále třídy *Pragmito-Magnocaricetalia* s rákosem, orobincem, vysokými ostřicemi nebo trávami (chrastice rákosovitá, zblochan vodní) v nížinných oblastech. V minulosti byly využívány jako stelivové louky, dnes převažuje jejich hydrologická funkce. Mokřadní louky jsou ohroženy odvodněním, regulací vodních toků a rekultivací. Společenstva mokřadů jsou poměrně druhotně chudá, sběr je zaměřen na pícninářsky hodnotnější travní druhy.

Využití planých populací jako výchozího šlechtitelského materiálu

U 30 % odrůd trav českého šlechtění jsou uvedeny jako jediný výchozí šlechtitelský zdroj ekotypy. Do této skupiny patří především staré odrůdy tradičních pícních druhů, které

nesou označení Táborský(-á) a Rožnovský(-á). U nově povolených odrůd pícího charakteru z posledních pěti let se jedná téměř vždy o druhy nově zaváděné v ČR do pěstování (*Bromus* spp., *Dactylis polygama*, *Phalaris canariensis*). U trávnickových odrůd byly využity především u doplňkových druhů, určených pro trávnický do speciálních podmínek (*Poa compressa*, *P. nemoralis*) nebo rozšiřujících druhovou diverzitu krajinných trávníků (*Anthoxanthum odoratum*, *Cynosurus cristatus*, *Deschampsia cespitosa*, *Holcus lanatus*), ale i u několika odrůd základních druhů (*Agrostis capillaris* a *Lolium perenne*). U 18 % odrůd se v rodokmenu vyskytuje kombinace ekotypů se šlechtěnými materiály domácího i zahraničního původu. Tato kombinace byla využita již u nejstarších odrůd větrovského šlechtění (Větrovský, -á), křížením planých typů z lučních porostů v jižních Čechách s typy pocházejícími z obchodního osiva různého původu. V pozdější době vznikly tímto způsobem převážně odrůdy pícího charakteru druhů *Lolium perenne*, *Arrhenatherum elatius*, *Dactylis glomerata*, *Festuca arundinacea*. Ekotypy spolu s domácími i zahraničními kultivary se objevují i v rodokmenu odrůd rodových kříženců *Lolium* x *Festuca*.

Využití planých druhů trav a bylin na příkladu zatravnění úhorů

V souvislosti se snižováním stupně zornění zemědělské půdy, přesunem hospodaření do úrodnějších oblastí a také následkem průmyslové činnosti člověka narůstají výměry nevyužívané půdy bez vegetačního krytu. Nejsou-li takové úhorové plochy nijak dále ošetřovány, vyvíjí se jejich rostlinný pokryv spontánně; zpravidla je však silně ovlivněn půdní zásobou semen a oddenků plevelů z předcházejícího období. Včasné zatravnění těchto ploch je účinným prostředkem k zakonzervování výrobně nevyužívané půdy, omezení půdní eroze, rozšiřování plevelných rostlin a zvýšení jejich ekologické funkce v krajině a životním prostředí. Jeden z možných postupů zatravnění je použití druhově pestrých směsí pro založení porostů s vyšší druhovou diverzitou, určených především k plnění zmíněných nevýrobních funkcí. Předpokladem je získání dostatečného množství osiva příslušných lučních druhů, včetně planých, např. Sběrem semen na zachovaných přírodních loukách v daném regionu a jejich namnožením. V případě dostatku osiva je možno zaset celou zatravněvanou plochu, jinak jen její část, např. V pásech a počítat s přirozeným rozšiřováním vysetých komponent do neosetého okolí v dalších letech. Pro ověření vhodnosti různých postupů zatravnění úhorů byla použita metoda polního pokusu, který byl založen na stanovišti v Zubří a poloprovozního pokusu v malé vrbce. K výsevu byl použit rostlinný materiál:

- regionální bylinná směs s nižším podílem bylinné složky: 6 planých druhů trav (83 %), 3 plané jeteloviny (7 %) a 22 druhů lučních bylin (10 %), cena 337 Kč.kg⁻¹, (Tab. 2)
- obchodní bylinná směs s vysokým podílem bylinné složky: 6 planých druhů trav (10 %), 3 jeteloviny (16 %) a 18 druhů lučních bylin (74 %), cena 1560 Kč.kg⁻¹
- obchodní luční směs, pícninářská, bez zastoupení bylinné složky: 6 druhů pících trav (86 %) a 2 druhy jetelů (14 %), cena 99 Kč.kg⁻¹

Použité pokusné varianty zahrnovaly:

1. celoplošný osev
 - a) bylinnou směsí regionálního původu, dvojí výsevek 20 nebo 40 kg.ha⁻¹
 - b) obchodní bylinnou směsí, výsevek 10 kg.ha⁻¹
2. částečný osev regionální bylinnou směsí do pásů (12 % plochy parcely), výsevek 20 nebo 40 kg.ha⁻¹
 - a) do úhoru (v okolí samovolná sukcese)
 - b) do obchodní luční směsi
3. spontánní úhor (kontrolní varianta)

Tab. 2 Složení regionální bylinné směsi a uplatnění jednotlivých druhů (konec května)

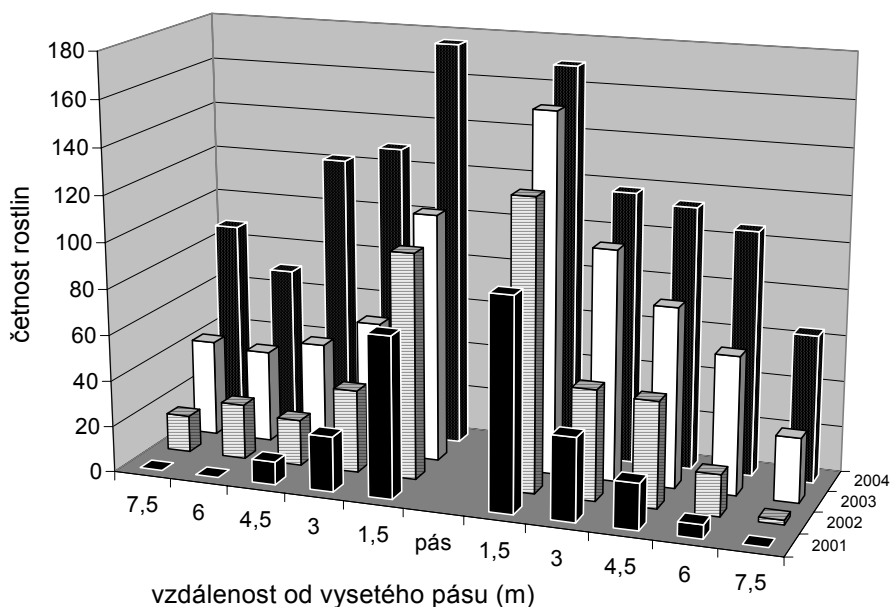
Druh	Hmotnostní podíl ve výsevku (%)	Pokryvnost druhu v porostu			
		2001	2002	2003	2004
Trávy (6 druhů)	82,86				
<i>Anthoxanthum odoratum</i>	3,77	3	3	3	2
<i>Briza media</i>	3,77	2	1	2	1
<i>Bromus erectus</i>	47,10	2	2	2	1
<i>Festuca rupicola</i>	14,10	1	1	3	3
<i>Koeleria pyramidata</i>	4,70	1	1	1	1
<i>Poa angustifolia</i>	9,42	1	1	2	2
Jeteloviny (4 druhy)	7,05				
<i>Anthyllis vulneraria</i>	0,28	2	2	2	2
<i>Onobrychis viciifolia</i>	4,70	1	0	0	0
<i>Trifolium montanum</i>	0,94	1	2	2	2
<i>Trifolium rubens</i>	1,41	2	2	2	3
Byliny (21 druhů)	10,09				
<i>Betonica officinalis</i>	0,47	0	1	1	1
<i>Campanula glomerata</i>	0,20	0	1	1	1
<i>Centaurea scabiosa</i>	0,94	2	1	1	1
<i>Cirsium pannonicum</i>	0,47	1	1	1	1
<i>Dianthus carthusianorum</i>	0,28	0	1	2	1
<i>Galium verum</i>	0,47	2	2	2	2
<i>Helianthemum nummularium</i>	0,28	1	1	1	1
<i>Hypericum perforatum</i>	0,38	2	2	1	1
<i>Jacea pratensis</i>	1,41	3	3	3	3
<i>Knautia kitaibelii</i>	0,28	0	0	0	0
<i>Leontodon hispidus</i>	0,47	2	2	2	2
<i>Leucanthemum corymbosum</i>	0,28	2	2	2	1
<i>Leucanthemum vulgare</i>	0,47	2	1	2	2
<i>Plantago lanceolata</i>	0,47	3	3	2	2
<i>Primula veris</i>	0,47	0	0	0	1
<i>Prunella laciniata</i>	0,47	2	2	2	2
<i>Ranunculus arvensis</i>	0,47	1	0	0	0
<i>Salvia verticillata</i>	0,47	2	1	1	1
<i>Sanguisorba officinalis</i>	0,20	1	0	0	0
<i>Silene vulgaris</i>	0,20	1	1	2	1
<i>Tragopogon orientalis</i>	0,66	2	1	1	1
Celkem	100,00	3 velmi dobrá, 2 dobrá, 1 slabá, 0			

Přirozené rozšiřování vysetých rostlinných druhů z částečně osetých ploch bylo podporováno opožděnou první sečí porostů umožňující dozrávání semen a je znázorněno v Grafu 1. Nejlepším rozšiřováním do úhoru se z trav vyznačovaly *Anthoxanthum odoratum*, *Festuca rupicola* a *Poa angustifolia*, z jetelovin *Anthyllis vulneraria* a *Trifolium rubens*, z bylin *Jacea pratensis*, *Plantago lanceolata*, *Leontodon hispidus* a *Leucanthemum vulgare*.

Pětiletý pokus ukázal odstupňovanou úspěšnost použití lučních komponent při osidlování ploch orné půdy a umožnil posoudit vhodnost různých postupů jejich zatravňování. Luční druhy regionální bylinné směsi se dobře uchytily v celoplošných i částečných výsevech. Některé luční druhy se úspěšně rozšířily z pásů do okolních ploch, zvláště do úhorového okolí. Kolonizace se zvyšovala s postupem času. V pokusech se zjistilo, že porosty

zakládán se sníženým výsevkem bylinné regionální směsi ($20 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$) dosahují od druhého roku parametrů plně srovnatelných s dvojnásobným výsevkem. Na dobře předsetově připravené stanoviště lze u nákladné bylinné obchodní směsi použít i výsevek $10 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$.

Z dosažených výsledků vyplývá, že nejen celoplošným výsevem, ale i částečným výsevem v pásích je možné úspěšně vytvořit druhově bohatou louku s neprodukčním využíváním, je k tomu však třeba delšího období.



Graf 1 Šíření lučních druhů z pásu regionální směsi do úhorového okolí (Malá Vrbka)

Závěr

Travní porosty nevýrobního charakteru s vysokou druhovou diverzitou tvoří významnou součást kulturní krajiny, našeho životního prostředí a celospolečenského genofondového bohatství. Porosty, založené s použitím druhově pestrých směsí plní řadu důležitých nevýrobních funkcí v krajině a představují významný příspěvek ke zvyšování její celkové biodiversity. Zemědělec, který při obhospodařování květnatých luk dodržuje stanovené zásady, se tak významně podílí na tvorbě a ochraně krajiny; na této činnosti, která do jisté míry omezuje intenzitu jeho hospodaření, by měl být v každém případě odpovídajícím způsobem zainteresován.

Poděkování

Práce je výsledkem „Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agrobiodiversity - kolekce travin“ a celé řady navazujících projektů NAZV (např. QD0006, 1G46066).

Literatura

RYCHNOVSKÁ, M. a kol.: Ekologie lučních porostů. Academia, Praha 1985.
MORAVEC, J. a kol.: Rostlinná společenstva České republiky a jejich ohrožení. Severočeskou přírodou, Litoměřice 1995.

Kontaktní adresy autorů

Ing. Pavel Šrámek, Ing. Magdalena Ševčíková, OSEVA PRO s.r.o., Výzkumná stanice travinářská
Rožnov-Zubří, Hamerská 698, 756 54 Zubří
E-mail: sramek@iol.cz, sevc@iol.cz

Možnosti využití druhů čeledi *Fabaceae* při setrvalém rozvoji zemědělství a tvorbě krajiny

Jan Pelikán, Tomáš Vymyslický, Pavlína Gottwaldová, Jan Nedělník

Výzkumný ústav pícninářský, spol. s r. o., Troubsko

Souhrn

Druhy čeledi Fabaceae jsou ceněny nejen z hlediska pícninářského a potravinářského, ale také pro jejich předplodinovou hodnotu a mimoprodukční přínosy, které jsou v příspěvku široce diskutovány. Pro tyto vlastnosti jsou důležitým prvkem tvorby a ochrany krajiny. Dále jsou stručně uvedeny některé výzkumné projekty NAZV ČR, případně mezinárodní projekty, úzce navazující na Národní program ČR „Konzervace a využití genofondu rostlin“, řešené ve Výzkumném ústavu pícninářském spol. s r. o. v Troubsku.

Klíčová slova: *Fabaceae, předplodinová hodnota, mimoprodukční přínosy, tvorba krajiny, setrvalé zemědělství*

Summary

The species of the Fabaceae family are widely used as fodder and food crops. Their alternative utilisation as preceding crops and other non productive benefits are discussed in the paper. Fabaceae species play the role of important elements in landscape formation and protection. Research projects supported by the Czech National Agency for Research in Agriculture and related to the National Programme for Conservation and Utilization of Plant Genetic Resources and Agro-biodiversity, as well as international projects executed in the Research Institute for Fodder Crops Ltd. at Troubsko are mentioned.

Key words: *Fabaceae family, non productive utilization, landscape protection, sustainable agriculture*

Fabaceae – bobovité (dříve také *Papilionaceae* – motýlokvěté, *Viciaceae* – vikvovité, případně *Leguminosae* – luštinaté) je čeleď rostlin, která zahrnuje asi 350 rodů a na 10 000 druhů, rostoucích většinou v mírném pásmu severní polokoule, řidčeji v tropech. U nás roste přibližně 120 druhů této čeledi. Patří sem byliny nebo dřeviny s listy střídavými, palistnatými, většinou zpeřenými, řidčeji dlanitě složenými, s květy uspořádanými v hroznech nebo hlávkách. Květy jsou pětičetné, souměrné, s největším horním korunním plátkem (pavéza), dvěma postraními menšími (křídla) a dvěma dolními plátky, srostlými ve žlábkovitý člunek. Plodem je lusk, nebo struk, případně nažka. Semena mají pevné osemení, bílek je vyvinut nepatrně, nebo zcela chybí. Na kořenech jsou často bakteriální hlízky, obsahující nitrogenní bakterie, které jsou schopny vázat vzdušný dusík a tím obohacovat půdu o dusík. Jedná se o rostliny cizosprašné, opylované hmyzem.

Poměrně velké množství u nás se vyskytujících druhů této čeledi je v současné době chráněno (12 druhů), celá řada je jich uvedena v Červené knize (8 druhů). Mezi druhy ohrožené v ČR je zařazen jeden druh, mezi silně ohrožené také jeden a mezi kriticky ohrožené je zařazeno šest druhů této čeledi. Přehled těchto druhů je uveden v tabulce 1.

Rostlinné druhy této čeledi mají velký význam v zemědělské výrobě a při tvorbě krajiny. V tabulce 2 je uveden přehled u nás se vyskytujících druhů, které jsou, nebo dříve byly využívány nejen v zemědělské výrobě, ale i v jiných oborech lidské činnosti. Jako pícniny je více či méně využíváno 49 druhů této čeledi, 11 druhů je využíváno jako lidské potraviny, 13 druhů je využíváno ve farmaceutickém průmyslu, případně v lidovém léčitelství, 24 druhů se využívá jako okrasné rostliny a 5 druhů má jiné využití.

Tab. 1 Přehled druhů čeledi *Fabaceae*, využívaných v zemědělství a v dalších oborech lidské činnosti

Pícniny	Pícniny – pokrač.	Zeleniny	Léčivé rostliny	Okrasné rostliny	Jiné využití
<i>Lupinus luteus</i>	<i>Astragalus cicer</i> *	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Galega officinalis</i>	<i>Wistaria chinensis</i>	<i>Genista tinctoria</i> * (barviva)
<i>Galega officinalis</i>	<i>Cicer arietinum</i>	<i>Phaseolus coccineus</i>	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	<i>Lathyrus latifolius</i>	<i>Glycyrrhiza glabra</i> (potravinářství)
<i>Galega orientalis</i>	<i>Vicia tetrasperma</i> *	<i>Cicer arietinum</i>	<i>Melilotus officinalis</i>	<i>Tetragonolobus purpureus</i>	<i>Laburnum anagyroides</i> (řezbářství)
<i>Vicia pannonica</i> *	<i>Vicia hirsuta</i> *	<i>Lens culinaris</i>	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	<i>Lupinus polyphyllus</i>	<i>Robinia pseudacacia</i> (dřevo)
<i>Vicia articulata</i> *	<i>Vicia glabrescens</i> *	<i>Pisum sativum</i>	<i>Anthyllis vulneraria</i>	<i>Sophora japonica</i>	<i>Trigonella foenum-graecum</i> (koření)
<i>Vicia sativa</i>	<i>Faba vulgaris</i>	<i>Arachis hypogaea</i> *	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Sarothamnus scoparius</i>	<i>Trigonella coerulea</i> (potravinářství)
<i>Vicia villosa</i>	<i>Lathyrus sylvestris</i> *	<i>Lathyrus sativus</i> *	<i>Ononis spinosa</i>	<i>Laburnum anagyroides</i>	
<i>Vicia sepium</i>	<i>Lathyrus pratensis</i>	<i>Glycine soja</i>	<i>Sophora japonica</i>	<i>Laburnum alpinum</i>	
<i>Vicia angustifolia</i>	<i>Pisum sativum</i>	<i>Lathyrus tuberosus</i> *	<i>Genista tinctoria</i>	<i>Chamaecytisus ratisbonensis</i>	
<i>Lathyrus sativus</i>	<i>Trifolium fragiferum</i> *	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	<i>Coronilla varia</i>	<i>Chamaecytisus purpureus</i>	
<i>Melilotus alba</i>	<i>Trifolium medium</i>		<i>Melilotus altissima</i>	<i>Genistella sagittalis</i>	
<i>Melilotus officinalis</i>	<i>Trifolium rubens</i> *		<i>Trifolium repens</i>	<i>Spartium junceum</i>	
<i>Medicago lupulina</i>	<i>Lotus borbasii</i> *			<i>Ulex europaeus</i>	
<i>Medicago sativa</i>	<i>Onobrychis arenaria</i>			<i>Robinia pseudacacia</i>	
<i>Medicago falcata</i>	<i>Lupinus albus</i> *			<i>Robinia viscosa</i>	
<i>Medicago x varia</i>	<i>Lupinus angustifolius</i>			<i>Robinia hispida</i>	
<i>Trifolium pratense</i>				<i>Galega officinalis</i>	
<i>Trifolium incarnatum</i>				<i>Caragana arborescens</i>	
<i>Trifolium alexandrinum</i>				<i>Caragana frutex</i>	
<i>Trifolium hybridum</i>				<i>Amorpha fruticosa</i>	
<i>Trifolium repens</i>				<i>Phaseolus coccineus</i>	
<i>Trifolium resupinatum</i>				<i>Lathyrus odoratus</i>	
<i>Lotus corniculatus</i>				<i>Lathyrus tingitanus</i>	
<i>Lotus ornithopodioides</i>				<i>Trifolium rubens</i>	
<i>Anthyllis vulneraria</i>					
<i>Ornithopus sativus</i>					
<i>Coronilla varia</i>					
<i>Onobrychis viciifolia</i>					
<i>Trigonella foenum-graecum</i>					
<i>Sarothamnus scoparius</i> *					
<i>Lupinus polyphyllus</i>					

(*) dříve hospodářsky využívané

Tab. 2 Přehled chráněných a ohrožených druhů čeledi *Fabaceae* a druhů uvedených v Červené knize

Chráněný	Uveden v Červené knize	Ohrožený	Silně ohrožený	Kriticky ohrožený
<i>Astragalus arenarius</i> <i>Astragalus austriacus</i> <i>Astragalus danicus</i> <i>Astragalus excapus</i> <i>Astragalus onobrychis</i> <i>Coronilla vaginalis</i> <i>Hedysarum hedysaroides</i> <i>Chamaecytisus albus</i> <i>Lathyrus heterophyllus</i> <i>Lathyrus palustris</i> <i>Lathyrus pannonicus</i> <i>Vicia oreophila</i>	<i>Astragalus arenarius</i> <i>Astragalus excapus</i> <i>Genistella sagittalis</i> <i>Lathyrus heterophyllus</i> <i>Lathyrus palustris</i> <i>Lathyrus pannonicus</i> <i>Lathyrus pisiformis</i> <i>Trigonella monspeliaca</i>	<i>Lathyrus palustris</i>	<i>Astragalus excapus</i>	<i>Astragalus arenarius</i> <i>Genistella sagittalis</i> <i>Lathyrus heterophyllus</i> <i>Lathyrus pannonicus</i> <i>Lathyrus pisiformis</i> <i>Trigonella monspeliaca</i>

Hlavní zemědělsky využívané druhy jsou ceněny především z hlediska výnosů kvalitní píce pro hospodářská zvířata, případně jako potraviny pro lidskou výživu. Pícní výkonnost je u jednotlivých druhů rozdílná a nejvyšší je u vojtěšky seté a jetele lučního, potravinářská je nejvyšší u hrachu a fazolu. Z hlediska obsahu a výroby živin patří zástupci čeledi *Fabaceae* k rozhodujícím producentům bílkovin. Vedle vysokého obsahu dusíkatých látek je u nich také příznivý obsah tzv. esenciálních aminokyselin, popelovin a vitamínů.

Kulturní druhy čeledi *Fabaceae* jsou však vysoce ceněny také pro jejich předplodinovou hodnotu a mimoprodukční přínos, které jsou dány několika faktory:

- Jak už bylo uvedeno výše, na kořenech převážné většiny těchto druhů se vyskytují hlízkové bakterie (hlavně *Rhizobium* sp.), které jsou již v raných fázích růstu hostitelských druhů schopny uchytit se na jejich kořenech. Tyto bakterie jsou schopny vázat vzdušný dusík a obohacovat jím půdu. Proces vázání vzdušného dusíku je odvislý od druhu rostliny, na ekologických podmínkách při pěstování, zejména příznivé neutrální půdní reakci, obsahu živin, vlhkosti apod. V rámci řešení projektu NAZV ČR EP0960006288 byla ve Výzkumném ústavu pícninářském, spol. s r. o. měřena fixace vzdušného dusíku u 49 druhů čeledi *Fabaceae*. Jako nejlépe fixující se ukázaly druhy *Lathyrus sativus*, *Trifolium incarnatum*, *Lotus corniculatus*, *Trifolium hybridum*, *Trifolium pratense*, *Trifolium repens*, *Trifolium ambiguum* a jednoleté druhy *Trifolium resupinatum* a *Trifolium alexandrinum* (PELIKÁN et HOFBAUER 1999).
- Velkou předností je také to, že celá řada těchto druhů hluboko koření. Hlavní (kůlový) kořen proniká do hloubky 1 – 3 m (u vojtěšky a vičence 8 – 10 m a více), v půdním profilu se větví a u některých druhů se navíc vytvářejí dlouhé podzemní kořenové výběžky (např. čičorka pestrá – *Securigera varia*). Díky tomu jsou schopny tyto druhy půdu provzdušňovat, prokypřovat a vynášet méně přístupné formy živin z hloubky do horních vrstev půdy. Toto meliorační působení je důležité jak na půdní vlastnosti, koloběh živin, ale i na celkovou ochranu prostředí (odčerpání nitrátů splavených do hlubších vrstev) a vytváří efekt hloubkového kypření půdy.
- Kořenový systém, posklizňové zbytky a zbytky strniště jsou po zaorání důležitým materiálem pro tvorbu humusu a zúrodnění půdy. Kořeny obsahují i velké množství živin, které jsou s organickou kořenovou hmotou zdrojem velmi kvalitního humusu.
- Celá řada druhů této čeledi je v zemědělství využívána jako meziplodiny na zelené hnojení.

- Významným mimoprodukčním faktorem je také odplevelovací činnost, která je dána vícesečností pícejších kulturních druhů (2 – 4 seče za rok), víceletostí (2 - 3 roky pěstování), velkou pokryvností listové plochy (LAI 5 – 7 m²/m²/seč) a její rychlou obnovou po seči (HRABĚ *et al.* 2004).
- Důležitým faktorem je protierozní vliv kulturních pícejších druhů, který je dán jednak vysokou pokryvností půdy (70 - 100 %) a dále pak i opadem odumřelé biomasy po sklizni a na konci vegetačního období.
- Neméně důležitým faktorem je také vliv zdravotní, který je dán přerušením dotace minerálních hnojiv, pesticidů a herbicidů a dále přerušením kalamitního rozvoje některých škůdců.
- Některé druhy čeledi *Fabaceae* jsou pro svoji nenáročnost vyhledávány jako rekultivační plodiny na půdách poškozených antropogenní činností (komonice bílá – *Melilotus albus*, jetel plazivý – *Trifolium repens*, vičenec ligrus – *Onobrychis viciifolia* apod.). Toto se potvrdilo při řešení výše uvedeného projektu NAZV ČR (PELIKÁN *et al.* 2000).
- Dalším kladem celé řady druhů této čeledi je to, že patří mezi vyhledávané medonosné rostliny (trnovník akát – *Robinia pseudacacia*, komonice bílá – *Melilotus albus*, komonice lékařská – *Melilotus officinalis*, jetel plazivý – *Trifolium repens* aj.).
- Nezanedbatelnou předností je také vytrvalost celé řady těchto druhů, pro niž jsou žádány jako komponenty trvalých jetelotravních porostů, kde navíc působí do značné míry i vysoce dekorativně pro pestrou barevnou škálu svých květů.

Na druhé straně je však několik druhů řazeno mezi plevely na orné půdě. Jedná se o vikev čtyřsemennou – *Vicia tetrasperma*, vikev chlupatou – *Vicia hirsuta*, hrachor hlíznatý – *Lathyrus tuberosus*, hrachor pačočkový – *Lathyrus aphaca*, ale i kulturní druhy (vikev setá – *Vicia sativa*, tollice dětelová – *Medicago lupulina*) aj.

Výskyt mnoha druhů jako plevelů na orné půdě je dán jejich tvrdosemenností a tudíž schopností přežívat v půdě po mnoho let. U tzv. tvrdých semen (dočasně neklíčivých) jsou palisádové buňky osemení prostoupeny kutinem a suberinem, které jsou nepropustné pro vodu a brání klíčení. Tvrdých semen se může vytvářet velké množství (u hrachorů a vikví až 90 %, u vojtěšky až 60 %) a své vlastnosti si mohou uchovávat až několik desítek let. To pak způsobuje, že i několik let po pěstování druh zapleveluje následné plodiny.

Z výčtu výše uvedených vlastností je vidět, že čeleď *Fabaceae* je velmi významná nejen pro zemědělství, ale i pro tvorbu krajiny a ochranu přírody. Proto se naše pracoviště zaměřuje při podávání návrhů výzkumných projektů na problematiku řešící setrvalé zemědělství, tvorbu krajiny a ochranu přírody.

Od roku 2003 je například ve Výzkumném ústavu pícninářském, spol. s r. o. v Troubsku a v OSEVĚ PRO, spol. s r. o., Výzkumné stanici travinářské Rožnov-Zubří řešen projekt NAZV ČR “Zvyšování diverzity jetelovinotravních společenstev”. Cílem projektu je prověřit možnost pěstování některých planě se vyskytujících druhů čeledí *Fabaceae* a *Poaceae* v čistých kulturách na semeno a jejich uplatnění v jetelovinotravních společenstvech. Do projektu je zařazeno 21 druhů čeledi *Fabaceae* a 14 druhů čeledi *Poaceae*, jejichž výčet je uveden v tabulce 3. Semena zkoušených druhů byla získána převážně sběrovými expedicemi a individuálními sběry uskutečněnými na území České republiky v předchozích letech.

V tabulce 4 jsou uvedeny počty lokalit, na nichž byly sbírány tyto druhy, dále nejmenší a největší nadmořská výška, kde se druh vyskytoval a konečně frekvence výskytu těchto druhů v ČR uváděných literaturou (SLAVÍK 1998).

Tab. 3 Přehled druhů zařazených do projektu NAZV ČR na pracovišti Troubsko

<i>Fabaceae</i>	<i>Poaceae</i>
1 <i>Astragalus cicer</i>	22 <i>Agrostis stolonifera</i>
2 <i>Astragalus exscapus</i>	23 <i>Brachypodium pinnatum</i>
3 <i>Galega officinalis</i>	24 <i>Briza media</i>
4 <i>Galega officinalis</i>	25 <i>Bromopsis erecta</i>
5 <i>Lathyrus sylvestris</i>	26 <i>Festuca rupicola</i>
6 <i>Lathyrus tuberosus</i>	27 <i>Festuca valesiaca</i>
7 <i>Lotus uliginosus</i>	28 <i>Helictotrichon pubescens</i>
8 <i>Lupinus polyphyllus</i>	29 <i>Koeleria macrantha</i>
9 <i>Medicago falcata</i>	30 <i>Koeleria pyramidata</i>
10 <i>Melilotus officinalis</i>	31 <i>Phalaroides arundinacea</i>
11 <i>Trifolium campestre</i>	32 <i>Phleum phleoides</i>
12 <i>Trifolium dubium</i>	33 <i>Poa angustifolia</i>
13 <i>Trifolium fragiferum</i>	34 <i>Poa trivialis</i>
14 <i>Trifolium medium</i>	
15 <i>Trifolium montanum</i>	
16 <i>Trifolium rubens</i>	
17 <i>Vicia angustifolia</i>	
18 <i>Vicia cracca</i>	
19 <i>Vicia pisiformis</i>	
20 <i>Vicia tenuifolia</i>	
21 <i>Vicia villosa</i>	

Tab. 4 Charakteristiky výskytu jednotlivých studovaných druhů

Druh	Počet lokalit	Nadmořská výška (m)		Frekvence výskytu (%) v ČR
		nejmenší	největší	
<i>Astragalus cicer</i>	12	193	540	24,15
<i>Astragalus onobrychis</i>	4	250	320	8,1
<i>Lathyrus pratensis</i>	50	245	1050	98,86
<i>Lathyrus sylvestris</i>	10	280	810	81,73
<i>Lathyrus tuberosus</i>	12	225	400	57,43
<i>Lotus uliginosus</i>	4	620	880	63,47
<i>Lupinus polyphyllus</i>	18	300	1000	74,96
<i>Medicago x varia</i> & <i>M. falcata</i>	22	220	550	41,38 (51,54)
<i>Melilotus officinalis</i>	31	230	755	87,62
<i>Onobrychis arenaria</i>	2	250	290	6,03
<i>Trifolium alpestre</i>	26	257	860	60,23
<i>Trifolium aureum</i>	38	260	920	81
<i>Trifolium campestre</i>	32	230	685	82,17
<i>Trifolium dubium</i>	7	215	435	88,07
<i>Trifolium fragiferum</i>	4	193	279	28,71
<i>Trifolium medium</i>	45	230	1133	91,45
<i>Trifolium montanum</i>	24	260	701	76,58
<i>Trifolium rubens</i>	5	210	550	24,44
<i>Vicia angustifolia</i>	31	245	670	84,68
<i>Vicia cracca</i>	55	240	1050	99,55
<i>Vicia pisiformis</i>	6	257	435	34,02
<i>Vicia sepium</i>	31	280	1050	93,81
<i>Vicia tenuifolia</i>	8	250	440	35,64
<i>Vicia villosa</i>	6	275	420	58,17

V roce 2004 byly založeny polní pokusy a byla provedena první hodnocení. V čistých kulturách byly hodnoceny růstové a vývojové fáze, zdravotní stav, napadení škůdci a zápoj porostu. Další hodnocení a vlastní sklizně na semeno budou prováděny v následujících letech. Pro podmínky obou zúčastněných pracovišť byly sestaveny dvě travní směsky a do nich přidáno vždy 50 klíčivých semen druhů čeledi *Fabaceae*, případně 100 klíčivých semen druhů čeledi *Poaceae*. Ve směskách byl v roce založení hodnocen u zástupců čeledi *Fabaceae* výskyt zájmových druhů, který je uveden v tabulce 5 a byly provedeny tři odplevelovací seče. Také v tomto pokuse budou další hodnocení probíhat v následujících letech řešení.

Tab. 5 Počty rostlin (průměr ze 3 opakování) ve směsi vyseté v pokusu na pracovišti Troubsko

Druh	60 dnů po výsevu	12 dnů po 1. seči	14 dnů po 2. seči
<i>Astragalus cicer</i>	1	0,3	1
<i>Astragalus excapus</i>	0,5	0,5	0
<i>Galega officinalis</i>	0	0	0,3
<i>Lathyrus sylvestris</i>	0,3	0	0
<i>Lathyrus tuberosus</i>	0	4,5	0
<i>Lotus uliginosus</i>	1	1	0
<i>Lupinus polyphyllus</i>	11	6,7	5,7
<i>Medicago falcata</i>	1,5	0	0
<i>Melilotus officinalis</i>	5	3	2
<i>Trifolium alpestre</i>	1,7	1	0,3
<i>Trifolium campestre</i>	4,3	3	2,3
<i>Trifolium dubium</i>	2	2,3	2,7
<i>Trifolium fragiferum</i>	0,7	2,3	1,7
<i>Trifolium medium</i>	1,7	0	0,3
<i>Trifolium montanum</i>	0,3	0	0
<i>Trifolium rubens</i>	4,3	0,7	0
<i>Vicia angustifolia</i>	11	8,7	5,7
<i>Vicia cracca</i>	7	1,7	1,7
<i>Vicia pisiformis</i>	0	0,3	0
<i>Vicia tenuifolia</i>	0	19	33
<i>Vicia villosa</i>	25,3	11	7,3

Od roku 2004 je na našem pracovišti řešen pod koordinací VÚRV Praha - Ruzyně výzkumný projekt NAZV ČR „Konzervace biodiverzity rostlin v systému trvale udržitelného zemědělství a krajinářství“. V rámci tohoto úkolu jsou vyhledávány a monitorovány dosud existující lokality ohrožených planých druhů z čeledi *Fabaceae*, jsou vyhledávány a přemnožovány krajové formy a tradiční odrůdy zemědělských plodin, ale i nové druhy perspektivní pro zemědělství. Na našem pracovišti jsme se soustředili na druhy lékořice lysá – *Glycyrrhiza glabra*, hrachor setý – *Lathyrus sativus*, hrách setý – *Pisum sativum* a bob obecný – *Faba vulgaris*. U druhů jsou hodnoceny jejich růstové a vývojové fáze, jsou množeny a bude vypracován projekt na jejich *in situ* a on-farm konzervaci. Na základě monitorování lokalit ohrožených planých druhů rostlin čeledi *Fabaceae* se zvažuje potřeba *in situ* konzervace pro tyto druhy a případně se realizuje jejich účelová on farm konzervace. Podle možností budou repatriovány ztracené nebo neklíčivé původní sběrové materiály a krajové odrůdy z genových bank okolních států.

V roce 2004 byla založena polní školka lékořice – *Glycyrrhiza glabra* a probíhalo množení hrachoru setého – *Lathyrus sativus*, hrachu setého – *Pisum sativum* a bobu obecného – *Faba vulgaris*. Dále byly založeny výsadby odrůd vojtěšky seté (*Medicago sativa*) a

vojtěšky srpovité (*Medicago falcata*) za účelem sklizně semen a detailního popisu rostlin. Opylování je zajištěno čmeláky a jednotlivé původy jsou izolovány pod klecemi.

Vybrané lokality ohrožených druhů čeledi *Fabaceae* na jižní Moravě jsou monitorovány již od roku 2000. Na lokalitách jsou na trvalých plochách zapisovány fytoocenologické snímky a je hodnocen stav populací zájmových druhů. Z předchozích let řešení úkolu již pocházejí návrhy na ochranu dvou dosud nechráněných lokalit s výskytem ohrožených druhů čeledi *Fabaceae*, které byly předány k posouzení Agentuře ochrany přírody a krajiny ČR.

V následujících letech se soustředíme na namnožení a distribuci osiv a sadby zájmových druhů mezi pěstitelé. V případě planých ohrožených druhů budou podány návrhy ochrany a managementu na lokalitách jejich výskytu s cílem zachování životaschopnosti populací.

Dalším projektem NAZV ČR, vztahujícím se k dané problematice řešeným od roku 2003 je „Vitalita osiva, kvalita sadby a jejich význam u tradičních a vybraných netradičních perspektivních plodin pro šlechtění, semenářství a pěstitelé“, jehož koordinátorem je Výzkumný ústav rostlinné výroby v Praze-Ruzyni. Kromě našeho pracoviště se na tomto úkolu podílí Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Ústav experimentální botaniky AV ČR, Česká univerzita v Praze a Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod. V rámci hodnocení kvality osiva vybraných plodin je naše pozornost zaměřena také na problematiku snížení počtu tvrdých semen v osivu. Je zkoumán vliv různých způsobů ošetření, zvláště pak vliv působení vyšších teplot. Cílem je stanovit rozsah teplot a délku jejich působení. Dosavadní výsledky byly prezentovány formou posteru na konferenci v Praze (GOTTWALDOVÁ 2004).

Některé druhy z čeledi *Fabaceae* jsou testovány také v člověkem postižených oblastech a na půdách kontaminovaných různými polutanty. Výsledky mezinárodních projektů se spoluúčastí Výzkumného ústavu pícninářského, spol. s r. o. jsou k dispozici u autorů příspěvku nebo na www.vupt.cz.

Literatura

- ČEŘOVSKÝ, J., FERÁKOVÁ, V., HOLUB, J., MAGLOCKÝ, Š., PROCHÁZKA, F. (1999): Červená kniha ohrožených a vzácných druhů rostlin a živočichů ČR a SR. Vol. 5. Vyšší rostliny. Příroda a. s., Bratislava.
- GOTTWALDOVÁ, P. (2004): Možnosti zvýšení klíčivosti semen u některých netradičních píceň. In: Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin (sborník příspěvků). ČZU Praha.
- HRABĚ, F. et al. (2004): Trávy a jetelovino trávy v zemědělské praxi. Ing. Petr Baštan, Olomouc.
- KUBÁT, K. et al. (2002): Klíč ke květeně České republiky. Academia, Praha.
- PELIKÁN, J. et HOFBAUER, J. (1999): The fixation of atmospheric nitrogen in some *Fabaceae* species. Rostlinná výroba, 45 (9): 411 - 414.
- PELIKÁN, J. et al. (2000): Využití pícních a dalších rostlinných druhů v zemědělské výrobě a při tvorbě krajiny. Závěrečná zpráva projektu NAZV ČR, Troubsko.
- SLAVÍK, B. et al. (1995): Květena České republiky. Vol. 4. Academia, Praha.
- SLAVÍK, B. (1998): Phytocartographical syntheses of the Czech Republic. Academia, Praha.

Kontaktní adresy autorů

Ing. Jan Pelikán, CSc., Mgr. Tomáš Vymyslický, Ing. Pavlína Gottwaldová, RNDr. Jan Nedělník, PhD
Výzkumný ústav pícninářský, spol. s r. o., Troubsko
E-mail: pelikan@vupt.cz, vymyslicky@vupt.cz, gottwaldova@vupt.cz, nedelnik@vupt.cz

Konzervace domácího druhu *Populus nigra* L. ssp. *nigra* v podmínkách *in situ* a jeho další využití ve šlechtění a krajině

Vojtěch Benetka

Výzkumný ústav S. Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví, Průhonice

Souhrn

Původní domácí dřevina topol černý postupně mizí z našeho území. Zásahy při regulaci vodních toků jsou příčinou zániku přirozených stanovišť topolu černého. Jeho snadná křížitelnost s introdukovanými druhy spolu s masivní výsadbou hybridních odrůd jsou příčinou genetické eroze druhu. Aktivita zaměřená na konzervaci *in situ* mají za úkol přípravu kontrolovaného materiálu *Populus nigra* a jeho navrácení do původních lokalit.

Klíčová slova: topol černý, *Populus nigra*, *in situ* konzervace, reintrodukce

Summary

Populus nigra, domestic wood species, is disappearing slowly from its original territory. Human activities including stream regulations cause loss of black poplar natural localities. Its high ability to crossing with other introduced poplar species in combination with massive planting of hybrid cultivars leads to genetic erosion of the species. The main task of activities *in situ* conservation is preparation of controlled planting material *Populus nigra* and its re-introduction into original localities.

Key words: black poplar, *Populus nigra*, *in situ* conservation, re-introduction

Topol černý je naše domácí dřevina, která se dnes vyskytuje spíše ojediněle. Topoly, které vidíme vysazené kolem silnic, vodních toků nebo i volně v krajině, jsou téměř výhradně mezidruhovými hybridy původem ze samovolného nebo i záměrného křížení mezi evropským druhem *Populus nigra* a americkým druhem *Populus deltoides*. To co většinou považujeme za topol, je úzkokorunný klon topolu černého, nazvaný topol vlašský (*P. nigra* var. *italica*) původem patrně ze střední Asie.

Populus nigra L. je euroasijská dřevina, jejíž areál je na severu vymezen asi 60° severní šířky a na východě dosahuje až po povodí Jeniseje. Na jihu končí oblastí Středozemního moře. Druh *P. nigra* rozděluje Bugala na tři poddruhy:

P. nigra L. ssp. *nigra* nacházející se ve střední a východní Evropě

P. nigra L. ssp. *betulifolia* (Porsch) rostoucí hlavně ve Francii a Anglii

P. nigra L. ssp. *caudina* (Ten) Bugala rostoucí v oblasti Středozemního moře

Dnes tento druh mizí z krajiny a místy je ohrožen, hlavně v západní Evropě. Dokladem ohrožení, ale i významu tohoto druhu je vytvoření pracovní skupiny *Populus nigra* network v rámci organizace EUFORGEN, zabývající se problematikou zachrany topolu černého.

Práce na záchraně tohoto druhu a jeho návratu do krajiny jsou v České republice staršího data a jsou spojeny s VS v Uherském Hradišti (VÚLHM). Na začátku devadesátých let minulého století část práce se přenesla i do ÚKOZ v Průhonicích. Průzkum výskytu této dřeviny proběhl v sedmi hlavních oblastech a je spojen hlavně se jménem Ing. Mottla (viz obr.1). Výsledkem bylo popsání a zmapování výskytu topolu černého v ČR. Dalším krokem bylo založení matečnic ve VS Uherské Hradiště a menší část i ve VÚKOZ v Průhonicích, kam byli shromážděni vegetativně přemnožení jedinci.

Příčiny úbytku topolu černého v krajině

Topol černý má poměrně vyhraněné nároky na prostředí. Je to světlomilná pionýrská dřevina, která v přirozených podmínkách obsazuje semenáčky nové náplavy neobsazené

konkurenčním porostem, plně osvětlené a dobře zásobené pohyblivou ne stojatou vodou. Takováto stanoviště však v důsledku regulace vodních toků zanikají. Je schopen růst i na druhotných stanovištích, kde dočasně je odstraněn půdní pokryv v důsledku lidské činnosti. Na takových místech většinou bývá brzy odstraněn. Další příčinou je vysazování nových odrůd od mezidruhových hybridů na úkor topolu černého.

Topol černý je dvoudomý, cizosprašný a větrosnubný druh. V rámci rodu *Populus* dochází ke snadnému samovolnému křížení mezi některými druhy, především mezi evropským druhem *P. nigra* a americkým *P. deltoides*. Kříženci tohoto typu tvoří samostatný druh *P. × canadensis*. Zatím co druh *P. deltoides* se u nás vyskytuje vzácně, druh *P. × canadensis*, díky některým hospodářským vlastnostem je uměle vysazován na úkor domácího druhu. Vzhledem k snadné křížitelnosti mezi topolem kanadským a topolem černým se předpokládá, že s vysokou pravděpodobností mladé rostliny, nacházející se v přírodě, jsou potomky mezidruhového křížení a že toto křížení je příčinou genetické erose druhu *P. nigra*. Při křížení mezi topolem kanadským a topolem černým jde v podstatě o zpětné křížení [*(P. deltoides × P. nigra) × P. nigra*]. V důsledku toho potomstva z uvedeného křížení se morfologicky velmi málo liší od topolu černého a je obtížné je odlišit.

Zde se naskytla možnost využít, pro vyloučení případných hybridů, současnou analýzu několika enzymových systémů studovaného vzorku. Vzhledem ke kodominantnímu charakteru dědičnosti izoenzymů při analýze tří izoenzymů můžeme s 87,5 % pravděpodobností odhalit zpětného hybridu. S využitím této metody podařilo se nám prokázat, že introgrese (pronikání) jednoho druhu do druhého je možná hlavně v případě, kdy matkou je druh *P. × canadensis* a otcem druh *P. nigra*. V případě odstranění samičích stromů topolu kanadského, snižuje se nebezpečí genetické erose topolu černého.

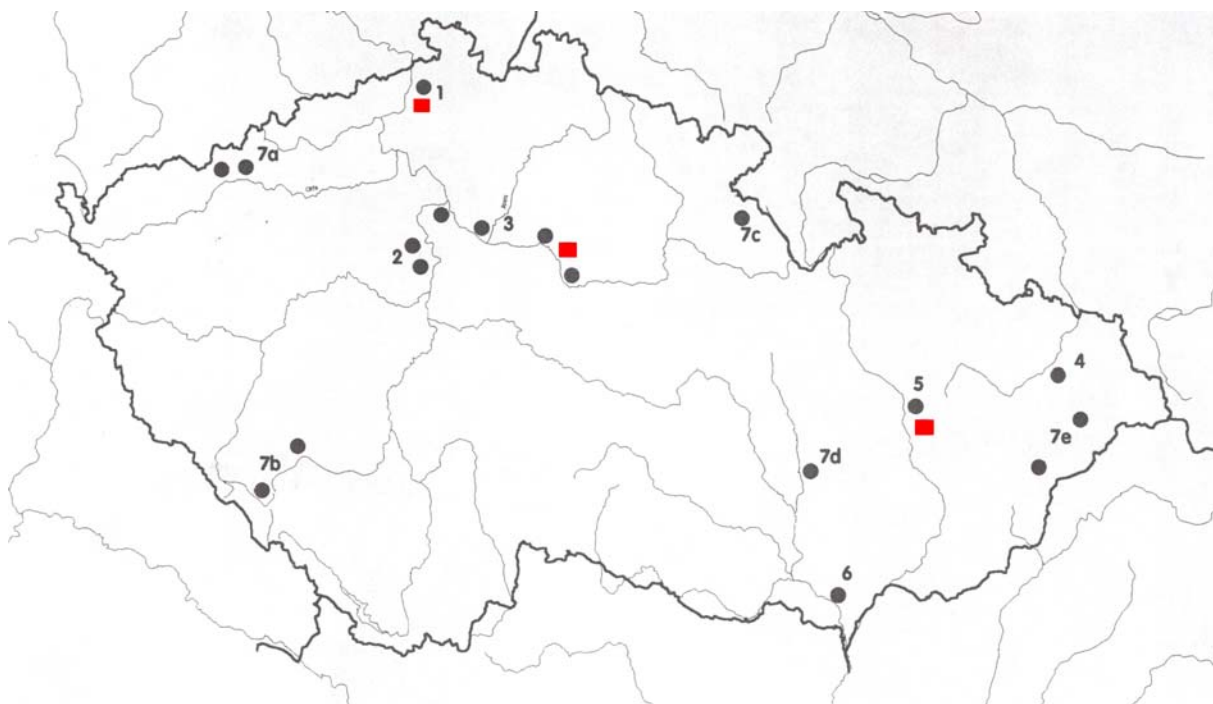
Konzervace *in situ*.

Pro konzervaci topolu černého v podmínkách *in situ* jsme použili generativní potomstvo z kontrolovaného opylení (na odříznutých větvích ve skleníku). Za rodiče byly zvoleny stromy z místní populace. Vypěstované sazenice se vysazují buď přímo na stanoviště, případně do matečnice, odkud se vegetativně přemnožené rostliny vysadí na konečné místo. Zatím byla výsadba provedena na třech místech CHKO Labské Pískovce, CHKO Libický Luh, CHKO Litovelské Pomoraví (viz obr. 1)

Při této práci se setkáváme s několika nevyřešenými otázkami. Otázkou je, stanovit minimální velikost populace a jak definovat areál původní populace.

Využití topolu černého ve šlechtění

Rod *Populus* řadíme mezi rychle rostoucí dřeviny, které se využívají v programech obnovitelných zdrojů energie. Topol černý je významným genetickým zdrojem při šlechtění. Ačkoliv se dosud prakticky neuplatnil jako čistý druh, 60 % mezidruhovných hybridů má za jednoho rodiče topol černý. V současné době probíhá šlechtitelský program s čistým topolem černým ve VÚKOZ v Průhonicích. Cílem je získat odrůdy pro oblasti, kde zákon o ochraně přírody zakazuje pěstovat nepůvodní druhy.



Obr. 1
Mapka testovaných oblastí výskytu topolu černého

Legenda:

- Místa s výskytem topolu černého, na kterých byl doposud prováděn terénní průzkum:
 1. dolní tok Labe, oblast Labských pískovců (nalezeno 5 stromů)
 2. Praha a dolní tok Vltavy (evidováno 12 jedinců)
 3. střední Polabí (Starý Kolín – Mělník; nalezeno 57 stromů)
 4. horní Poodří (evidováno 12 stromů)
 5. střední Pomoraví (CHKO Litovelské Pomoraví, NPR Zástudánčí u Lobodic, oblast říčky Bystřice + její ústí do řeky Moravy; vybráno 50 stromů)
 6. větrolamy Hrušky, Podivín, Tvrdonice (evidováno 97 stromů)
 7. podhorské oblasti (evidováno 14 stromů)
- obnovené místní populace

Kontaktní adresa autora

Ing. Vojtěch Benetka, CSc. Výzkumný ústav S. Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví, Květnové nám. 391, 252 43, Průhonice
E-mail: benetka@vukoz.cz

Možnosti uplatnění *in situ* a *on farm* konzervace v ČR

Vojtěch Holubec¹ a František Paprštejn²

¹Výzkumný ústav rostlinné výroby Praha-Ruzyně

²Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o.

Souhrn

Uchování genetických zdrojů rostlin je z metodického hlediska možné dvěma způsoby: mimo místo původu (*ex situ*) nebo na místě původu (*in situ*). V poslední době se uplatňuje další možnost – pěstovat rostliny v regionu původu (*on farm*). Příspěvek cituje definice *in situ* a *on farm*, diskutuje přednosti a nevýhody a vhodnost jejich uplatnění v rámci jednotlivých plodin a v rámci České republiky. Zatímco tradiční konzervace genetických zdrojů v genových bankách je statická, konzervace *in situ* a *on farm* jsou dynamické, umožňující koevoluci ostatních organismů. *Ex situ* je jistá metoda s definovanými stálými podmínkami prostředí, metody v přírodě podléhají nejrůznějším vlivům prostředí a negativním vlivům lidské činnosti. Z hlediska uchování maximální šíře genofondu je *in situ* nezastupitelná. Funkční *on farm* vyžaduje jinou podmínku - tržní prostředí.

Klíčová slova: konzervace *in situ*, *on farm*, ovocné dřeviny, Chráněné krajinné oblasti, Národní parky

Abstract

Conservation of plant genetic resources is methodically possible by two ways: out of place of origin (*ex situ*) or on the place of origin (*in situ*). In the recent time, another possibility gets more attention by conservationists: to grow plants within the region of their origin (*on farm*). This contribution cites definitions of both *in situ* and *on farm*, discusses positives and negatives and suitability of their use for particular plants/crops in the framework of the Czech Republic. While traditional conservation of plant genetic resources in gene banks is static, conservation *in situ* and *on farm* are dynamic, enabling co-evolution of other organisms. *Ex situ* is a sure method with defined constant environmental conditions, while conservation in the nature is liable to various environmental influences and negative factors of human activity. From the point of near - total genetic conservation, *in situ* is not replaceable. Functional *on farm* requires another condition - a market environment.

Key words: *in situ*, *on farm* conservation, fruit trees, Protected areas, National Parks

Úvod

Genofondy v rezortu zemědělství jsou rutinně uchovávány v genových bankách tzv. *ex situ*. V případě semenných plodin jde o uchování semen v klimatizovaných podmínkách a v případě vegetativně množených druhů jde o permanentní kolekce, genofondové školky. V posledních letech získává stále větší pozornost uchování materiálů na místě jejich růstu, na původních přírodních lokalitách či na místě jejich setrvalého, dlouhodobého a tradičního pěstování. Tyto netradiční metody uchování genetických zdrojů rostlin (GZR) v zemědělství, *in situ* a *on farm* se staly právoplatnými členy v systému konzervace genofondu v České republice v rámci Národního programu rostlin a byly zahrnuty do nově vydaného zákona o genofondech.

In situ konzervace

Zákon č. 148/03 Sb. „Zákon o konzervaci a využívání GZ rostlin a mikroorganismů významných pro výživu a zemědělství...“ definuje *in situ* konzervaci následovně:

„Konzervaci genetických zdrojů *in situ* se rozumí jejich dlouhodobé uchování v místě jejich původního výskytu“ (ochranou konkrétního ekosystému na dané lokalitě, regionu).

Ryze botanické pojetí vztahuje *in situ* konzervaci pouze na původní plané rostliny. Pro účely konzervace genofondu v zemědělství tuto definici chápeme v širším pojetí, aby zahrnovala i historické vysazené materiály, jako uchování genetických zdrojů rostlin v jejich přirozených biotopech nebo na místě jejich dlouhodobého historického pěstování.

In situ konzervace je

- ◆ dynamický způsob uchování
- ◆ umožňuje spontánní hybridizaci a další koevoluci druhu s doprovodnými druhy, pleveli a zejména patogenními mikroorganismy
- ◆ je to nejlepší a přirozená metoda
- ◆ je doprovázena konzervací *ex situ* jako statická pojistka uchování materiálů – *ex situ* je zpravidla primární metodou

Subjekt zajišťující *in situ*

Konzervaci planých rostlin *in situ*, památných stromů a cenných přírodních celků v ČR zajišťuje Správa ochrany přírody podléhající Ministerstvu životního prostředí.

V rámci existující sítě chráněných objektů lze realizovat program ochrany zemědělsky cenných druhů, jednotlivých rostlin nebo objektů na základě vzájemné a oboustranně výhodné dohody. Tuto síť lze rozšířit podáním návrhu na zřízení nového objektu ochrany.

Mimo síť Chráněných krajinných oblastí (CHKO) a Národních parků (NP) mohou zajistit *in situ* konzervaci

- regionální odbory ochrany přírody spadající pod MŽP
- místní samospráva – obce
- nevládní organizace (NGO) – národní a mezinárodní organizace a spolky
- botanické zahrady (např. Liberec)
- skanzeny, muzea

Zodpovědnost za materiály zemědělského významu má účastník Národního programu.

Předmět konzervace *in situ* – materiál

Předmětem setrvalého uchování GZR v podmínkách *in situ* mohou následující kategorie:

- ◆ Plané druhy GZR domácího (autochtonního) původu, (příbuzné kulturním rostlinám, jejich přímí předchůdci, druhy potenciálně využitelné přímo nebo šlechtitelsky jako nové užitkové plodiny, včetně pícních a pastevních druhů a komponentů bohatých luk, druhy pro okrasné účely, popř. plevelné druhy původních agrofytocenóz).
- ◆ Krajové a primitivní formy kulturních rostlin domácího původu.
- ◆ Kulturní materiály i původu neznámého, ale které byly v teritoriu České republiky historicky a dlouhodobě pěstovány (např. historické kultivary révy vinné, ovocných dřevin).
- ◆ Staré restringované šlechtěné odrůdy.

Dokumentace *in situ*

Podobně jako u *ex situ* uchovávaných vzorků je nezbytnou podmínkou přijetí do Národního programu rostlin jejich dokumentace, materiály zahrnuté do programu *in situ* musí být řádně zdokumentovány. Nezbytnou podmínkou je přidělení národního evidenčního čísla (ECN) a vyplnění pasportní údaje informačního systému EVIGEZ. Důraz je kladen na pasportní údaje analogické sběrovým deskriptorům, tj. geografická lokalita, podrobné souřadnice z GPS, ekologické údaje o lokalitě, a speciální údaje týkající se *in situ*

Plané a zplanělé druhy:

- ◆ datum založení *in situ*
- ◆ cílový druh/druhy
- ◆ zodpovědná osoba/instituce
- ◆ charakteristika populace
- ◆ fytoocenologické charakteristiky
- ◆ fytopatologické hodnocení
- ◆ možné faktory ohrožení
- ◆ charakter a stupeň ohrožení
- ◆ údaje o pravidelném monitorování lokality
- ◆ existující opatření na ochranu, případně návrh na změnu

Historické výsadby dřevin:

- ◆ druhy a kultivary, krajové formy
- ◆ charakteristika materiálu
- ◆ minulé a současná vegetace
- ◆ fytopatologické hodnocení a odolnost / poškození mrazem

Lokalizace *in situ*

Vyhledání vhodných materiálů, které si zasluhují zvláštní péči jako je *in situ* konzervace a lokalizovat je, závisí na typu materiálu.

- ◆ Krajové populace a primitivní kultivary – eroze genofondu značně snížila šance na nalezení těchto materiálů. V současnosti jsou největší předpoklady jejich výskytu v odlehlých oblastech, nejčastěji v pohraničí, v podhorských a horských regionech. Jedná se především o staré sady, aleje a roztroušené stromy v extravilánu.
- ◆ Zplanělé materiály – lze nalézt v místech minulé a historického pěstování, zejména v místech zaniklých sídlišť. Tyto materiály mohou mapovat zaniklé usedlosti např. na Šumavě.
- ◆ U planých druhů je nutno preferovat výběr stanoviště s co možno nejpůvodnější vegetací.

Půdní držba a legislativa

- ◆ Je třeba respektovat vlastnická práva k pozemkům. Nutno preferovat lokality s vyjasněnými vlastnickými právy a kde se lze s majitelem (např. obec, stát, zemědělský podnik, soukromník, Správa ochrany přírody atd.) snadněji dohodnout.
- ◆ *In situ* musí být s majitelem pozemku legislativně ošetřena smlouvou.

On farm konzervace

Metoda uchování genetických zdrojů rostlin v zemědělském provozu je specifická pro zemědělství. Duplikuje a rozvíjí *ex situ* konzervaci, umožňuje uchovávat mnohem větší rozsahy materiálu a větší variabilitu různých ekologických a mikroregionálních forem. Lze ji definovat následovně:

“On farm” konzervaci je uchování krajových a primitivních odrůd (populací) jejich systematickým hospodářským využíváním v přírodních podmínkách a za použití pěstitelských technologií blízkých podmínkám, za kterých tyto odrůdy vznikaly a vyvíjely se. Tato “dynamická” konzervace umožňuje pokračování vývoje krajových odrůd (populací) pod vlivem podmínek prostředí a užívaných technologií.

Použití on farm

Metodu on farm uchování GZR lze aplikovat na všechny druhy plodin polní, zahradní a ovocné dřeviny. Doporučeny jsou technologie pěstování, které jsou extenzivního typu, jsou analogické původním technologiím a mají povahu organického zemědělství. Zejména se jedná o malé vstupy – charakterizované nízkou úrovní hnojení, minimální ochranou a zejména dobrou agrotechnikou.

On farm konzervace GZR má největší uplatnění u ovocných dřevin. Obzvláště krajové odrůdy a staré kultivary byly charakteristické pro určitý region a byly zde po generace pěstovány. Tento způsob konzervace navazuje na staré tradice a soustřeďuje materiál v nově založeném sadu v daném regionu. Při výrobě sadbového materiálu a jeho výsadbě je třeba dodržet staré technologie:

- ◆ roubovat odrůdy na semenáče
- ◆ pěstovat stromky jako vysokokmeny
- ◆ lze využít možnosti kmenotvorné odrůdy – na semenáč se naroubuje stará odrůda, která vytváří pevný a zdravý kmen, na který se v požadované výšce roubuje cílová odrůda
- ◆ vysazovat stromky ve velkých rozestupech a sad zatravnit

Subjekty on farm konzervace

Subjekty on farm konzervace mohou být státní i nestátní organizace i privátní osoby s vyjasněnou půdní držbou, které splní technologické podmínky výsadby a pěstování, s perspektivou dlouhodobého uchování materiálu.

- ◆ skanzeny
- ◆ národní parky a CHKO
- ◆ regionální muzea
- ◆ zemědělské podniky
- ◆ soukromníci hospodařící organicky

Doporučuje se ekonomická návaznost na zpracovatele produkce (např. moštárny) s koncovkou jako jsou např. obchody zdravé výživy.

Ekonomika on farm produkce je u těchto firem podmínkou.

Příklady on farm konzervace

Několik projektů on farm konzervace v ČR již bylo realizováno v rámci ochrany přírody a několik jich je rozpracovaných. Velké potenciální možnosti se naskýtají ve skanzenech. V obou případech sady slouží kromě ochrany materiálu i pro demonstraci návštěvníkům a ne pro vlastní produkci plodů. V jednom případě sad starých odrůd v Bílých Karpatech vlastní soukromník jako dědictví po otci a produkci plodů prodává do moštárny. Sad je zatravněn a využíván pro pasení. Hospodaření má charakter organického zemědělství, přestože to není oficiálně deklarováno. Rentabilita provozu je mírně aktivní.

- ◆ KRNAP Vrchlabí
- ◆ CHKO Bílé Karpaty
- ◆ CHKO a NP Šumava
- ◆ Soukromý vlastník sadu, Bílé Karpaty

Problémy a rentabilita on farm konzervace

- ◆ malá rentabilita provozu
- ◆ nezbytnost dotace na zřízení a provoz sadu
- ◆ pro rentabilitu je prospěšné zajištění víceúčelovosti výsadby
 - NP, CHKO: i pro demonstraci návštěvníkům
 - skanzeny a muzea: komplexní konzervace: materiálů, technologií, řemesel a vše současně pro demonstraci návštěvníkům
 - NGO: sponzorované nebo dotované, založené na entusiasmu, realizující části produkce
 - agroturistika: konzervace materiálů, staveb, řemesel aj. je podkladem pro jiné podnikání
 - soukromník: jen je-li zajištěna návratná realizace produkce
- ◆ šanci mají ovocné dřeviny

Závěr

In situ a on farm konzervace jsou perspektivní metody uchování genofondu. Z biologického hlediska jsou správné a opodstatněné. Měly by navazovat na systém *ex situ* konzervace genofondů v národním měřítku. Je třeba zajistit jejich ekonomiku v komplexu s dalšími činnostmi, jinak dříve či později zkrachují. Světové trendy v rozvinutých zemích jdou tímto směrem, ale tam je zase málo materiálu k ochraně. V rozvojových zemích naopak materiály jsou, ale chybí financování.

Kontaktní adresa autorů

Ing. Vojtěch Holubec, CSc. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 161 06 Praha 6–Ruzyně

E-mail: holubec@vurv.cz

Ing. František Paprštejn, CSc. Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o.,

Holovousy 1, 508 01 Hořice v Podkrkonoší

E-mail: fp@vsuo.cz

Pěstování tradičních kulturních rostlin ve Valašském muzeu v přírodě v Rožnově pod Radhoštěm

Radoslav Vlk

Valašské muzeum v přírodě, Rožnov p. R.

Souhrn

Valašské muzeum v přírodě shromažďuje veškeré doklady o tradicích na území karpatské části Moravy a Slezska. Součástí činnosti zemědělského oddělení je pěstování regionálních druhů a odrůd, obilovin, luskovin a jiných užitkových plodin, léčivých a okrasných rostlin, ale i rostlin plevelných. Prezentovány jsou sortimenty, které byly spojeny s obyvatelstvem a především regionem Valašska, pozornost je věnována i tradičnímu posklizňovému zpracování a využití zemědělské produkce.

Klíčová slova: *Valašské muzeum, agrikultura, genofond, staré a krajové odrůdy, polní plodiny*

Summary

Activities of the Wallachian Open Air Museum are aimed at gathering all available evidence of traditions in Carpathian part of Moravia and Silesia. The department of agriculture is involved in planting regional species, obsolete cultivars and landraces of cereals, legumes, medicinal and ornamental plants and weeds. Traditional crops connected to the Wallachian region are included in exposition. Shown are traditional methods post-harvest manufacturing and utilization of agricultural production.

Key words: *Wallachian Open Air Museum, agriculture, genetic resources, obsolete cultivars and landraces, field crops*

Valašské muzeum v přírodě se stalo pro návštěvníky, kteří přijeli na Valašsko a do malebného města Rožnov pod Radhoštěm, něčím na co se nezapomíná. Muzeum shromažďuje všechny doklady o tradiční lidové kultuře, o způsobu života, práci, obyčejích a umění z karpatského území Moravy a Slezska. Hlavním cílem činnosti zůstává věrohodná rekonstrukce a pravdivá informace o původním životním prostředí vesnice a malého města. Tento záměr také vedl ke vzniku a vybudování tří areálů muzea – Dřevěné městečko, Mlýnská dolina, Valašská dědina.

Způsoby hospodaření, života, doplňkových činností a bydlení obyvatel valašských vesnic přibližuje areál – Valašská dědina, která patří mezi nejrozsáhlejší areály muzea. Jednotlivé hospodářské usedlosti, mlýn, kovárna a další objekty jsou umístěny v krajině, která svou členitostí, cestami i shluky stromů připomíná mnohé vesnice na Valašsku. Její budování započalo v roce 1962 se záměrem naplnit myšlenku zachrany tradičních roubených domů, hospodářských a speciálních staveb, které byly v původním prostředí ohroženy. V muzeu pak byly doplněny dalšími komponenty s cílem obnovit na základě terénních zjištění jejich původní historické prostředí. Z toho důvodu jsou obohaceny o tradiční chov ovcí plemene Valaška, skotu, drůbeže a v neposlední řadě o pěstování typických kulturních plodin, které doprovázejí člověka do současnosti.

Rozvoj studia agrikultury a genofondů ve Valašském muzeu začíná na počátku sedmdesátých let, kdy bylo vypracováno libreto areálu a nastal tak nový pohled na aktivity a prezentaci jevů.

V roce 1974 se zakládá zemědělské oddělení. Vznik tohoto oddělení – zatím v muzeích ojedinělého typu, byl podmíněn nutností sadovnické a zemědělské údržby celého areálu muzea, zhruba 80 ha. Další náplní oddělení je průzkum druhů a tradičních užitkových a okrasných rostlin v zájmovém regionu a pak je spolu s historicko-etnografickými výsledky bádání aplikovat v žádoucí, historicky doložené podobě v jednotlivých intravilánových expozicích prezentovat.

V současné době je situace na poli agrikultury Valašského muzea jiná než v roce 1974 a následujících letech. V období založení zemědělského oddělení byly položeny základy genofundu kulturních rostlin regionu Valašska nebo dalších v rámci celé České republiky. Návštěvník se seznamuje během prohlídky s jednotlivými usedlostmi, které charakterizují různé sociální skupiny obyvatel valašské vesnice. Získává informace o způsobu života, obživy obyvatel usedlostí, ale také zjišťuje v čem spočívala obživa rodiny, co se pěstovalo. Právě na této úrovni tzv. agrikultury se snažíme formou tradičního zemědělství (způsoby hospodaření na Valašsku do roku 1945) prezentovat z pohledu muzejního již zapomenuté polní a zahradní plodiny (živý sbírkový inventář).

Od roku 2001 obnovujeme postupně jednotlivé genofondové plochy v areálu Valašské dědiny. Jedná se především o pěstování tradičních druhů a odrůd rostlin, obilovin, luskovin a jiných užitkových plodin z našeho regionu, léčivých rostlin, okrasných rostlin v zahrádkách i za okny a rostlin plevelných. Důležitou a významnou složkou těchto výsadeb budou a jsou ovocné stromy. Jedná se hlavně o tzv. staré a krajové odrůdy z regionu Valašska nebo odrůdy v regionu nejvíce rozšířené. Měl by tak vzniknout agrohistorický areál, který bude doplňovat nemovitosti a neživý materiál muzea. Přičteme-li k těmto tradičním plodinám i složku živočišnou, ovce (plemeno Valaška, největší chovné stádo v republice a na světě, zapsáno v Evropské genové knize), kozy, koně (plemeno Slezský norik), krávy, vznikne tak opravdu živé muzeum ve všech jeho směrech.

Aby se nejednalo jen o bezmyšlenkové pěstování takto získaného rostlinného materiálu, musíme na veškerou vegetaci muzea pohlížet jako na celek, kterým se snažíme zachovat kulturně historický prvek krajiny a na straně druhé vyjádřit a obohatit v intravilánech objektů nové biologické hodnoty. Z tohoto důvodu v podmínkách muzea rozlišujeme tři druhy vegetace:

1. Vegetace původní – do které řadíme původní rostlinné společenstvo a ráz areálu, původní park nebo vegetaci na původním pozemku na kterém je muzeum vybudováno.
2. Vegetace speciální – zde zařazují rostliny, které dotvářejí charakter intravilánu objektů. Jedná se o květiny a rostliny zahrádek, za okny, tradiční zemědělské plodiny, ovocné stromy a zeleň charakteristická pro region, který prezentujeme.
3. Vegetace doplňková – pod tímto pojmem mám na mysli rostlinný materiál, nově vysazovaný se záměrem dotvoření a obnovení krajinného rázu. Zde je nutno používat druhy charakteristické pro vegetaci původní, tj. vegetaci patřící k bodu 1.

Při zachování tradičních způsobů hospodaření je možno navracet tzv. vegetaci speciální na políčka areálu Valašské dědiny. Cílem je prezentovat v rámci našich možností sortimenty, které byly spojeny s obyvatelstvem a především regionem Valašska.

Při záchraně starých a krajových odrůd ovocných dřevin se řeší:

1. Nalezení vhodného stanoviště pro další výsadby, skloubení stanovištních požadavků se záměry urbanismu.
2. Nedostačující počet vysazených jednotlivých kultivarů. Tento problém je možno řešit založením dislokovaného sadu s duplicitním sortimentem.
3. Další pomologická testace. Ne všechny sběry z terénu byly řádně určeny vlivem stáří stromů a degradace plodů odrůdy.
4. Pokračování polního pozorování vlastností odrůd s možným záměrem využití při šlechtění.
5. Další sběr v terénu pro obohacení stávajícího sortimentu.
6. Založení ovocné školky pro přípravu výsadbového materiálu.
7. Využití ovoce při tradičním zpracovávání v rámci programů valašského muzea.

Tab. 1

Sortiment starých krajových a lokálních odrůd ovocných dřevin pěstovaných ve Valašském muzeu v přírodě

Odrůda	Poznámka	Odrůda	Poznámka
Jabloně			
Brodský hranáč	••	Nachové sládě	•
Dubická reneta	•	Pádolnice	•
Dvorčinka	•	Panušky	••
Funtové	•	Pecůvky	•
Gdánský hranáč	•	Plesník	•
Grávštýnské	•	Podstráňky	••
Hrabové	•	Rožnovské citrónové	•
Hranůvky	•	Řehtáč soudkovitý	•
Jadernička – Rožnov	•	Sivula	•
Jadernička moravská	•	Skalická hrabůvka	••
Jadernička – Rožnov	•	Slezský špičák	•
Jadernička – Růžďka	•	Šmurůvka	•
Jadernička – Vigantice	•	Štěpůvky	•
Jadernička - Zašová	•	Tvarůžek	•
Jeptiška	••	Valdůvky	••
Kočičí hlavy	•	Valínek	••
Kožené	•	Vilémovo	••
Kropěnka	•	Vindlík	••
Libínské	••	Vínka	••
Lopské	•	Vlasatice	•
Medůvka	•	Zrostlíky	•
Míšenské	•	Žluté sládě	•
Muthauptovo	•	Žopské	••
Hrušně			
Dlouhačka	•	Pstružnice	•
Dule	•	Šídlenska	•
Jakubinky	•	Štigmárka	•
Krvavka	•	Tatarka	•
Ovesnice	•	Vodňáčky	•
Ovesničky	•	Žlutaňa	•
Slivoně			
Anička	•	Valašská trnečka	•
Bílá trnečka	•	Švestka domácí – typy	•

Poznámka: • dochována ve výsadbách Valašského muzea v přírodě

•• nedochována ve výsadbách Valašského muzea v přírodě

Tab. 2

Výběr sortimentu polních, technických a zahradních plodin pěstovaných v intravilánu objektů Valašského muzea v přírodě

Polní plodiny (výběr sortimentu)	Poznámka
<i>Setaria italica</i> ssp. <i>germanica</i> (Mill.) Kunth. – bér vlašský	•
<i>Setaria italica</i> ssp. <i>germanica</i> (Mill.) Kunth. – bér vlašský (červená forma)	••
<i>Secale cereale</i> L. spec. jařina, žito	•
<i>Avena</i> L. spec. – oves , směs ekotypů	••
<i>Fagopyrum tataricum</i> (L.) Gärtner. – tatarka	•
<i>Fagopyrum esculentum</i> Moench. – pohanka	•
<i>Secale cereale</i> f. <i>multicaule</i> Metzger. – křibice, žito	•
<i>Cicer arietinum</i> L. – cizrna beraní	•
<i>Agrostemma githago</i> L. - koukol polní	••
<i>Triticum dicoccum</i> . Schrank. – pšenice dvouzrnka	•
<i>Consolida regalis</i> Gray. – ostrožka stračka	••
<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>distichon</i> var. <i>nudum</i> . L. – gengel, ječmen	•
<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> var. <i>coeleste</i> . Wib. – špalda	••
<i>Panicum miliaceum</i> L. cv. Hanácká mana – proso	•
<i>Papaver rhoeas</i> L. – vlčí mák	••
<i>Secale cereale</i> L. sp. – žito	•
<i>Digitaria sanguinalis</i> (L.) – rosička	••
Brambory (výběr 6 odrůd)	••
Technické a botanické druhy rostlin (výběr sortimentu)	
<i>Malus sylvestris</i> Miller (S.)	••
<i>Mentha pulegium</i> L.	••
<i>Pyrus pyraeaster</i> Burgsd.	•
<i>Elsholtzia ciliata</i> (Thunb.) Hyl. – klasnatka brvitá	••
<i>Meum athamanticum</i> Jacq. – koprník štetinolistý	••
<i>Myrrhis odorata</i> (L.) Scop. – čechřice vonná	••
<i>Rubia tinctorum</i> L. - mořena barvířská	••
Aromatické a léčivé rostliny (výběr sortimentu)	
<i>Althaea officinalis</i> – proskurník lékařský	•
<i>Angelica archangelica</i> – andělka lékařská	•
<i>Artemisia absinthium</i> – pelyněk pravý	•
<i>Pulmonaria officinalis</i> – plicník lékařský	•
<i>Calendula officinalis</i> – měsíček lékařský	•
<i>Lavandula angustifolia</i> – levandule lékařská	•
<i>Mentha</i> sp. – máty	•
<i>Melissa officinalis</i> – meduňka lékařská	•
Hrnkové rostliny (výběr sortimentu)	
Pelargonie (<i>P. grandiflorum</i>) kolekce sortimentu	8 položek
Pelargonie (<i>P. zonale</i>) – kolekce sortimentu z let 1877 – 1930	12 položek
Fuchsie - kolekce sortimentu z let 1869 – 1972	30 položek

Poznámka: • pěstováno v intravilánu objektů Valašského muzea v přírodě

•• počítá se s pěstováním do budoucna

Závěrem mi dovoluji připomenout něco málo z úspěchů problematiky zachovávání kulturních rostlin ve Valašském muzeu v přírodě. Během jednotlivých Valašských roků (celoroční programová nabídka) jsou námi vypěstované plodiny přímo využívány při programech muzea a návštěvník má možnost se seznámit nejen s plodinou, ale s jejím dalším posklizňovým zpracováním (len – podzimní přástky; pohanka – špicování na mlýnci; křibice – výroba ošatek; boryt barvířský – barvení lněného plátna; léčivé a aromatické rostliny – demonstrační bylinné vonné a léčivé směsi; podzimní výstavy; obiloviny – melivo na mouku, tradiční způsoby výmlatu, příprava tradičních valašských pokrmů; ovoce – sušené křížaly, hrušková a švestková povidla; sláma – zimní zateplení chlévů, úlů; atd.).

Poděkování

Na závěr děkuji institucím, které nám v rámci spolupráce pomáhají obnovovat sortimenty tradičních zemědělských plodin.

- Výzkumný ústav bramborářský, Havlíčkův Brod
- Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Brno
- Výzkumný ústav rostlinné výroby – Národní genová banka, Praha – Ruzyně
- OSEVA PRO s.r.o., Výzkumná stanice travinářská, Zubří

Kontaktní adresa autora

Mgr. Radoslav Vlk, Ph.D., Valašské muzeum v přírodě, Palackého 147, 756 61 Rožnov pod Radhoštěm, E-mail: vlk@vmp.cz

Obnova biodiverzity lučních porostů v CHKO Bílé Karpaty

Ivana Jongepierová¹, Jonathan Mitchley², Pavel Šrámek³, Magdalena Ševčíková³

¹*Správa CHKO Bílé Karpaty, Luhačovice*

²*Wye College University of London, Wye, UK*

³*OSEVA PRO s. r. o., Výzkumná stanice travinářská, Zubří*

Souhrn

Přípravě regionálních travobylinných směsí je v Bílých Karpatech věnována pozornost již více než 10 let (JONGEPIEROVÁ et al. 2003, 2004) a doposud jimi bylo zatravněno kolem 200 ha orné půdy. Zpočátku nebyly žádné zkušenosti s pěstováním lučních druhů, ani přípravou směsí. Hledalo se řešení pro a) efektivní způsob množení planých komponent zajišťující dostatečné množství semen, b) stanovení optimálního poměru trav a bylin ve směsích odpovídajícího složení místních porostů a c) vhodný způsob výsevu porostů s vysokou druhovou diverzitou. V roce 1999 byl zahájen rozsáhlý pokus v Malé Vrbce, jehož cílem je najít optimální a ekonomickou metodu založení druhově bohatých luk na orné půdě.

Klíčová slova: *regionální směs, trávy a byliny, pěstování lučních druhů*

Summary

More than 10 years has been paid attention to the production of regional grass/herb seed mixtures in White Carpathian Mts. (JONGEPIEROVÁ et al. 2003, 2004). At about 200 ha of arable land was sown by this mixture up to now. There were no experiences with seed propagation of meadow herb species or preparation of local grass/herb seed mixtures at the beginning. The aim of efforts was to find suitable way of a) effective cultivation and harvest methods, to provide sufficient seed amount, b) optimal proportion between grasses and herbs in the seed mixture corresponding with local grasslands and c) establishment to increase sward biodiversity. The large project targeted to the optimal and economical method to establish species-rich meadows based on local plant species on arable land started at 1999 in Mala Vrbka.

Key words: *regional seed mixtures, grasses and herbs, meadow species propagation*

Úvod

Na projektu spolupracuje od začátku několik organizací: ZO ČSOP Bílé Karpaty, Botanická sekce při Správě CHKO Bílé Karpaty, Výzkumná stanice travinářská Zubří, Masarykova univerzita Brno, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita (MZLU) Brno. K pokusům nad Malou Vrbkou přibyl navíc Botanický ústav Akademie věd ČR Třeboň a především řada zoologů. Cílem pokusu je totiž nejen zjistit chování rostlin, ale i to, jak jsou zalučňené plochy osidlovány živočichy. Několik odborníků z Ústavu půdní biologie Akademie věd ČR České Budějovice sleduje edafon, další odborníci (Moravské zemské muzeum Brno, Karlova univerzita Praha, Masarykova univerzita Brno) se zabývají křísy, merami, plošticemi, mravenci, střevlíky a sekáči.

Metodika práce

Založení pokusu

Na východním svahu vrcholu Výzkum (439 m n.m.), v nadregionálním biocentru Čertoryje v k.ú. Malá Vrbka o celkové výměře cca 3 ha byly založeny pokusné plochy. V 70. letech byl tento pozemek rozorán a zbaven vzrostlé lemové vegetace a až do poloviny roku 1998 využíván jako orná půda.

Ve spolupráci ČSOP Bílé Karpaty a VST Zubří bylo dne 15. dubna 1999 na souvislém 3 ha honu orné půdy vytýčeno celkem 16 pokusných parcel, každá o rozměrech 20 x 55 m.

Před vlastním výsevem bylo pole 2x povláceno a tím zbaveno vyrůstajících plevelů. Pro pokus byly zvoleny 4 typy zalučnění, každá ve 4 opakováních:

1. regionální směs celoplošně
2. regionální směs v pásu 5 m, zbytek ponechán samovolné sukcesi
3. regionální směs v pásu 5 m, zbytek zalučněn jetelotravní komerční směsí
4. ponechán úhor

Základem regionální směsi jsou trávy (90 %), více než polovinu tvoří *Bromus erectus*, v menším množství je přidána *Festuca rubra*, *F. rupicola*, *Anthoxanthum odoratum*, *Poa angustifolia*, *Briza media*, *Koeleria pyramidata*. Byliny jsou zastoupeny 10 %, z toho jeteloviny 2,6 % - *Anthyllis vulneraria*, *Trifolium montanum*, *Trifolium rubens*, a ostatní byliny 7,4 % - *Betonica officinalis*, *Campanula glomerata*, *Centaurea jacea*, *C. scabiosa*, *Cirsium pannonicum*, *Galium album*, *Galium verum*, *Helianthemum grandiflorum*, *Hypericum perforatum*, *Inula salicina*, *Leontodon hispidus*, *Leucanthemum vulgare*, *Plantago lanceolata*, *Prunella laciniata*, *P. vulgaris*, *Salvia verticillata*, *Tanacetum corymbosum*, *Tragopogon orientalis*. Nedopatřením byl do směsi přidán i jednoroční ohrožený plevel *Ranunculus arvensis*, který byl však jen vzácně nalézán při monitoringu v roce 2000. Výsev byl 20 kg/ha.

Byliny - 17 druhů	%	Trávy – 7 druhů	%
<i>Betonica officinalis</i>	0,5	<i>Anthoxanthum odoratum</i>	2,5
<i>Campanula glomerata</i>	0,2	<i>Briza media</i>	3,1
<i>Centaurea scabiosa</i>	0,7	<i>Bromus erectus</i>	55,8
<i>Cirsium pannonicum</i>	0,5	<i>Festuca rubra + rupicola</i>	15,0
<i>Galium verum</i>	0,2	<i>Koeleria pyramidata</i>	3,8
<i>Helianthemum ovatum</i>	0,2	<i>Poa angustifolia</i>	9,8
<i>Hypericum perforatum</i>	0,4	Trávy celkem	90
<i>Inula salicina</i>	0,1		
<i>Jacea pratensis</i>	1,6		
<i>Leontodon hispidus</i>	0,3		
<i>Leucanthemum vulgare</i>	0,3		
<i>Plantago lanceolata</i>	0,3		
<i>Prunella laciniata</i>	0,3	Jeteloviny - 3 druhy	%
<i>Ranunculus arvensis</i>	0,3	<i>Anthyllis vulneraria</i>	0,3
<i>Salvia verticillata</i>	0,4	<i>Trifolium montanum</i>	0,7
<i>Tragopogon orientalis</i>	0,7	<i>Trifolium rubens</i>	1,6
Byliny celkem	7,4	Jeteloviny celkem	2,6

Monitoring

Podle schématu založení pokusných ploch bylo na každé ploše založeno 10 (plochy s regionální směsí nebo úhorem bez středového pásu - typ 1., 4.) nebo 15 (plochy se středovým pásem regionální směsí, po stranách kulturní trávy či úhor - typ 2., 3.) trvalých čtverců o velikosti 1,5 x 1,5 m, v každém odlišném pásu 5 (celkem 200 ploch). Kromě počtu druhů byla stanovována také pokryvnost na základě procentického zastoupení. Terénní vyhodnocení probíhalo v letech 2000 - 2005 vždy v první polovině června za pomoci řady spolupracovníků.

K vyhodnocení kolonizace ze středových pásů byly v letech 2001 - 2004 sledovány transekty. Sledování probíhalo na 8 pokusných plochách se středovým pásem. Transekt byl vytyčen uprostřed plochy, kolmo na středový pás, vždy do vzdálenosti 7,5 m od středového pásu, takže na každé straně bylo hodnoceno 5 čtverců velikosti 1,5 x 1,5 m, které byly rozděleny na čtvrtiny (podčtverce). V každém podčtverci byla zaznamenávána prezence regionálních druhů trav a bylin.

Management ploch

Vzhledem k tomu, že v roce 1998 byla na poli pšenice, která i v roce 1999 hojně vyrůstala na celé ploše, bylo nutné začátkem července pokosit horní část stébel, aby se zamezilo dalšímu vysemenění. Vzhledem k velkému suchu v průběhu letních měsíců a nízkému zaplevelení, byla v roce 1999 odplevelovací seč provedena až koncem září.

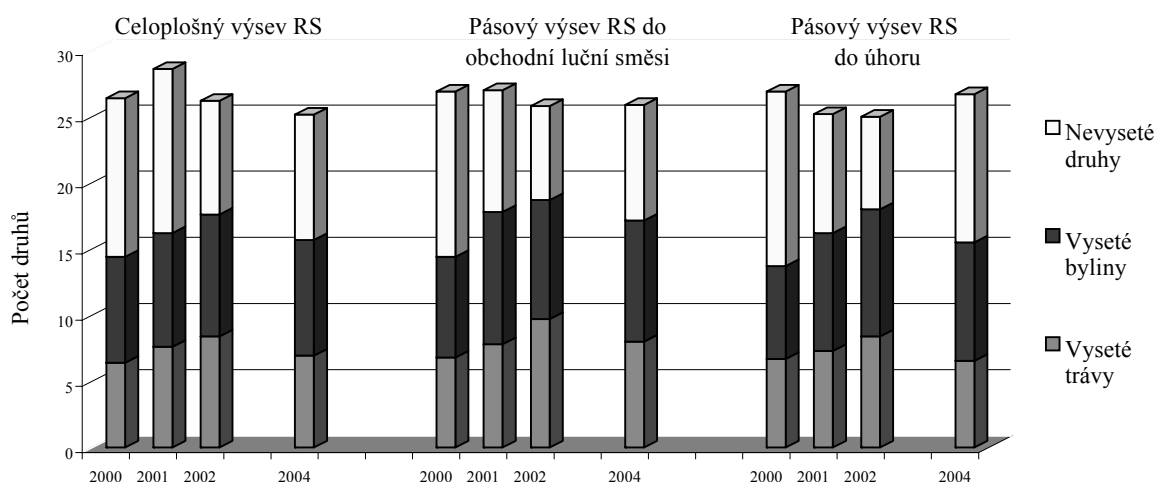
V dalších letech byly vždy po skončení botanického monitoringu pokoseny plochy s komerční směsí a úhory, regionální směs byla ponechána na vysemenění. Během srpna či září pak byla kosena buď celá plocha, nebo v sušších letech pouze plochy s regionální směsí.

Výsledky a diskuse

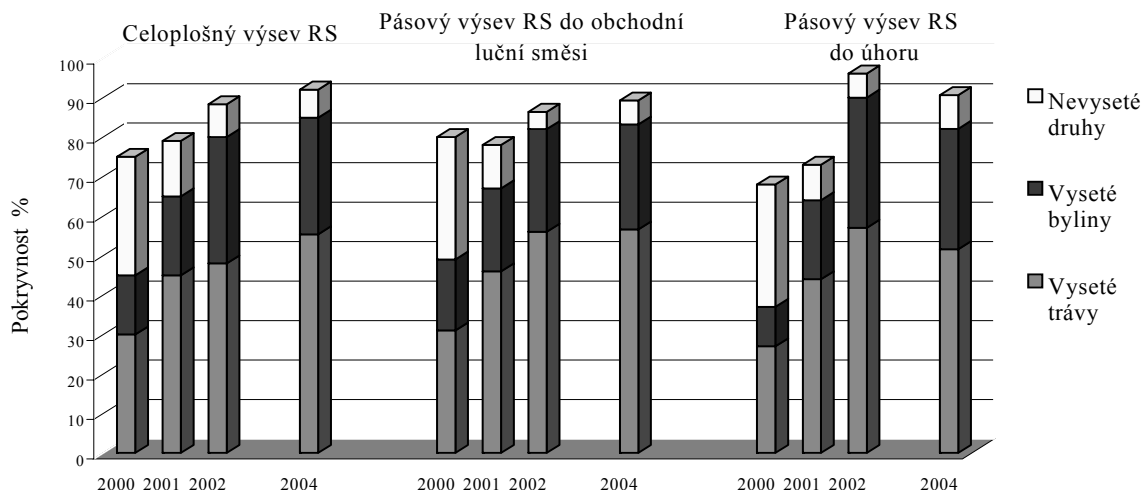
Botanický monitoring

Botanickým sledováním bylo zjištěno, že se všechny vyšetřené druhy trav a jetelovin na plochách a v pásích s regionální směsí v porostu uplatnily, z bylin nevzešly pouze *Inula salicina* a *Helianthemum grandiflorum*. Při pěstování v matečných porostech se ukázalo, že oman hůře klíčí, což mohlo být také důvodem jeho neúspěchu na pokusné ploše. Zvláštním případem je devaterník, který velice dobře rostl v matečných porostech, ale v žádné z vyšetřovaných směsí v oblasti Bílých Karpat kromě jednoho případu nevzešel. Nebyly zjištěny žádné významné rozdíly ve frekvenci nebo pokryvnosti regionální směsi vyšetřené na větší ploše či v pásích (graf 1, 2).

Jako nejúspěšnější trávy regionální směsi (na ploše i v pásích) se ukázaly *Bromus erectus*, *Festuca rupicola*, *Poa angustifolia* a *Briza media* které dosahovaly 100 % frekvence výskytu. Naopak travou s nízkou frekvencí se stala *Anthoxanthum odoratum*. Z bylin nejvyšších frekvenčních hodnot dosáhly *Centaurea jacea*, *Plantago lanceolata* a *Prunella vulgaris*. Naopak nejvzácněji se vyskytovaly *Anthyllis vulneraria*, *Leucanthemum vulgare* a *Salvia verticillata*.



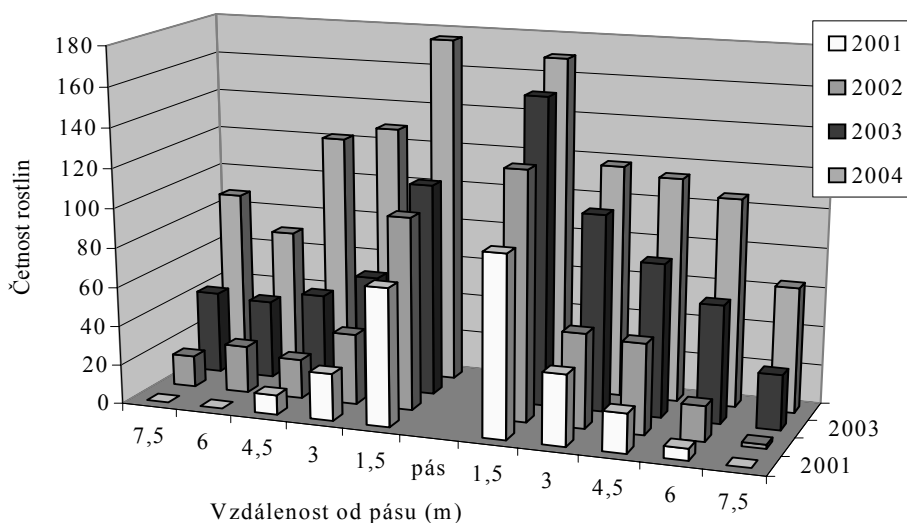
Graf 1 Počet druhů na vyšetřovaných plochách regionální směsi



Graf 2 Pokryvnost druhů na vysetých plochách regionální směsi

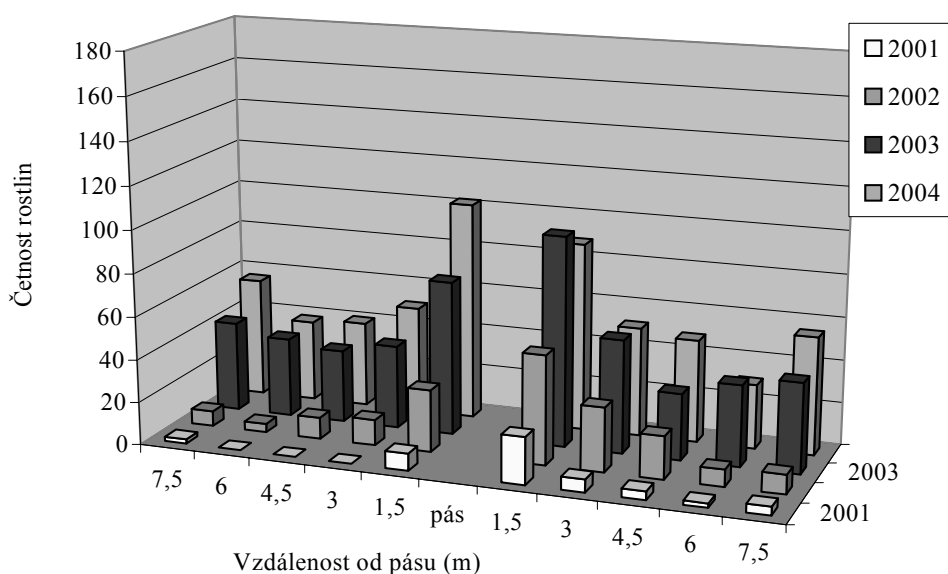
V 5. roce dosahovala pokryvnost regionální směsi 90 %, průměrný počet vysetých druhů trav a bylin na sledovaných plochách byl kolem 16 druhů, což je méně než v předcházejících letech. Snížení četnosti i pokryvnosti v roce 2004 bylo zřejmě způsobeno větrnou erozí na jaře 2004, kdy došlo k zasypání převážné části pokusné plochy 10 - 20 cm vrstvou naváté hlíny. Rozdíly v četnosti u jednotlivých druhů byly způsobeny rozdílným množstvím semen při výsevu, rozdílnou klíčivostí i schopností uplatnění v porostu.

Ve variantě s kulturními trávami hojně do prostředního pásu s regionální směsí invadoval *Trisetum flavescens*. Naopak z pásu s regionální směsí se do kulturních trav rozšířily některé regionální trávy (*Festuca rupicola*, *Anthoxanthum odoratum*, *Bromus erectus*) a byliny (*Centaurea jacea*, *Leontodon hispidus*, *Prunella vulgaris*, *Tragopogon orientalis*, *Prunella laciniata*, *Anthyllis vulneraria*, *Trifolium montanum* a *T. rubens*). Z regionálního pásu se sem nerozšířilo 9 druhů bylin a 2 trávy. Rychlost rozšiřování druhů z regionální směsi vyseté v prostředních pásích do okolní vegetace s kulturními trávami je znázorněna na grafu 3.



Graf 3. Šíření lučních druhů z pásů regionální směsi do úhorového okolí

Ve třetí variantě se v bočních pásích s úhorem objevily druhy kulturních i regionálních trav, nejhojněji *Arrhenatherum elatius*, *Bromus erectus*, *Trisetum flavescens*, *Festuca rubra*, *F. rupicola*. Z bylin nejvyšší frekvence výskytu dosáhly *Plantago lanceolata*, *Centaurea jacea*, *Leontodon hispidus*, *Prunella vulgaris*. Naopak jen několikrát byly zaznamenány *Prunella laciniata*, *Tanacetum corymbosum*, *Tragopogon orientalis*, *Galium verum* a *Centaurea scabiosa*. Jedna tráva a deset druhů bylin nebylo v úhoru vůbec zaznamenáno. Rychlost rozšiřování druhů z regionální směsi vyšetě v prostředních pásích do okolního úhoru je znázorněna na grafu 4.



Graf 4. Šíření lučních druhů z pásů regionální směsi do okolního lučního porostu

Na úhoru ve čtvrté variantě se téměř ve všech plochách objevil *Arrhenatherum elatius*, častějšími trávami byly také *Trisetum flavescens*, *Festuca rupicola* a *Bromus erectus*. Na třetině ploch byly zaznamenány byliny *Plantago lanceolata*, *Centaurea jacea*, *Leontodon hispidus* a *Prunella vulgaris*. Další 5 druhů (*Galium album*, *G. verum*, *Prunella laciniata*, *Tragopogon orientalis* a *Trifolium rubens*) se objevilo jen na několika plochách. Na žádné z ploch nebyla zaznamenána jedna regionální tráva (*Anthoxanthum odoratum*) a 10 bylin. Četnost a pokryvnost plevelů se během celé doby sledování snižovala a postupně se zvyšovala pokryvnost a četnost dalších nevysetých lučních druhů, které se sem samovolně dostávaly z okolí.

Závěr

Pětileté sledování ukázalo úspěšnost vzházení jednotlivých druhů a osidlování ploch rostlinami i živočichy. Luční druhy regionální směsi se dobře uchytily na plochách i v pásích, navíc některé luční druhy se rozšířily z pásů do okolních ploch (11 z 19 bylin). Více druhů a semenáčků se rozšířilo do úhorů než do ploch s komerčními trávami. Kolonizace se zvýšila postupem času. Z dosažených výsledků vyplývá, že nejen celoplošným výsevem, ale i výsevem v pásích je možné vytvořit louku, je k tomu však třeba delšího období.

Poděkování

Projekt byl podpořen Ministerstvem životního prostředí ČR a Grantem GAČR č. 26/02/003600.

Za pomoc s údržbou ploch děkujeme P. Říhovi. Náš velký dík patří níže uvedeným profesionálním i amatérským botanikům a studentům, bez kterých by sběr botanickým dat

nebyl možný: I. Adámková, M. Dančák, Z. Dočkalová, K. Fajmon, K. Fakambi, M. Filipová, E. Fraňková, B. Haberreiter, S. Hejduk, P. Hekele, K. Chludová, J. W. Jongepier, L. Klimeš, O. Korpás, K. Krátká, R. Krčmová, J. Kubásek, Z. Montágová, J. Němec, Z. Otýpková, M. Petruž, H. Poková, O. Popelová, J. Prokopová, H. Rötzer, R. Řepka, M. Seiberl, Š. Slovákova, L. Staňková, A. Šmídová, L. Šoltýsová, E. Uhlířová, M. Valášková, K. Vincenecová, A. Wernerová, R. Zárubová.

Literatura

- JONGEPIEROVÁ, I. & MITCHLEY, J. (in print): Recreation of species rich hay meadows in the White Carpathian mountains using regional seed mixtures. Restoration Ecology.
- JONGEPIEROVÁ, I., ŠEVČÍKOVÁ, M., ŠRÁMEK, P. (2003): Použití planých druhů bylin pro tvorbu regionální směsi v Bílých Karpatech. - In: HOLUBEC V. (ed.): Mapování, konzervace a monitorování genofundu mizejících krajových forem kulturních rostlin a jejich planých příbuzných druhů. Sborník referátů ze semináře, VÚRV Praha, 13. 12. 2001. Genetické zdroje č. 88: 86 - 91. ISBN 80-86555-23-2.
- JONGEPIEROVÁ, I. & POKOVÁ, H. (2004): Regionální směsi pro obnovu lučních porostů v CHKO Bílé Karpaty. Sborník přednášek ze semináře Management sídelní zeleně, Luhačovice, 79 - 81.

Kontaktní adresy autorů

RNDr. Ivana Jongepierová, CSc. Správa CHKO Bílé Karpaty, Nádražní 318, 763 26 Luhačovice
E-mail: jongepierova@bilekarpaty.cz
Ing. Magdalena Ševčíková, Ing. Pavel Šrámek OSEVA PRO s.r.o., Výzkumná stanice travinářská
Rožnov-Zubří, Hamerská 698, 756 54 Zubří
E-mail: sevc@iol.cz, sramek@iol.cz

Sběrové expedice – cílené sběry za účelem uchování biodiverzity krajových forem kulturních rostlin a příbuzných planých druhů

Tomáš Vymyslický, Jan Pelikán, Pavlína Gottwaldová, Jan Nedělník

Výzkumný ústav pícninářský, spol. s r. o. Troubsko

Souhrn

V roce 2004 se konaly dvě mezinárodní sběrové expedice: v Českém Středohoří a na Muráňské planině. Byly zaměřeny na průzkum a sběr genetických zdrojů rostlin, zejména z xerothermních trávníků, které jsou zajímavé jednak z pohledu šlechtění, tak i z pohledu ochrany přírody. Celkem bylo během obou expedic sebráno 261 vzorků rostlin. Semenné vzorky budou uloženy v genové bance v Praze a budou použity v navazujících projektech a popřípadě na posílení lokálních populací ohrožených druhů rostlin.

Klíčová slova: *sběry semen, konzervace biodiverzity, plané druhy, sběrové expedice, Chráněná krajinná oblast České Středohoří, Národní park Muráňská planina*

Summary

Two international collecting missions were realized in České Středohoří Mts. (Czech Republic) and Muráňská planina (Slovakia) during the year 2004. They were targeted to plant genetic resources collecting, mainly those growing in xerotherm grasslands and interesting for breeding and landscaping purposes. Altogether 261 plant samples were gathered during both collecting missions. Seed samples will be located in the gene bank storage RICP Prague and they will be used as material for future related projects or could be used as seed source for re-introduction of endangered species and local populations.

Key words: *seed collecting missions, biodiversity conservation, wild species, Protected Landscape Area České Středohoří, National Park Muráňská planina*

Sběrové expedice jsou společně organizované sběry generativních a vegetativních částí zájmových druhů rostlin. Jsou vždy soustředěny do určité oblasti (pohoří, chráněné území, floristická nebo fytogeografická oblast). Konají se buď domácí nebo i zahraniční expedice (podle časových a finančních možností zúčastněných organizací). Většinou se konají 2 expedice ročně, trvající cca 5 – 7 dní.

V předstihu před vlastním konáním expedice je třeba organizačně zajistit expedici (termín, ubytování, povolení ke sběrům, doprava). Následuje rešerše literárních a herbářových pramenů (případně konzultace s odborníky – nejčastěji botanici ze správy CHKO, NP aj.), výběr vhodných lokalit ke sběrům a naplánování podrobného programu celé expedice. V terénu se pak na každé lokalitě provede určení polohy podle turistické mapy, zaměření zeměpisných souřadnic a nadmořské výšky pomocí GPS. Následuje vyhledání zájmových druhů na lokalitě a sběr semen nebo vegetativních částí.

Neznámé rostliny jsou s pomocí určovacího klíče determinovány. Sběr se provádí pokud možno v dostatečném množství, ale tak, aby v případě ohroženého druhu nebyla poškozena jeho populace. Každý sebraný vzorek je zapsán do sběrové databáze a má své evidenční číslo. Semenné vzorky jsou vyčištěny a posléze jsou uloženy v Genové bance ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby, Praha-Ruzyně. Dále budou vzorky využity v navazujících projektech a také v ochraně přírody při reintrodukcích nebo posilování oslabených populací ohrožených druhů rostlin.

V letech 2004 a 2005 se Česko-Slovenské expedice konají v rámci projektu „Průzkum, využití a ochrana diverzity netradičních genetických zdrojů rostlin v České a Slovenské

republice“. Jedná se o projekt dvoustranné spolupráce, administrovaný pod číslem 156 u Asociace inovačního podnikání ČR a financovaný Ministerstvy školství, mládeže a tělovýchovy ČR a SR. Účastníci projektu jsou z české strany VÚP Troubsko, ze slovenské strany pak VÚRV Piešťany, VÚTPHP Banská Bystrica a SPU Nitra.

V roce 2004 se u rámci dvoustranné česko-slovenské spolupráce uskutečnily dvě sběrové expedice: České Středohoří a Muráňská planina. Expedice byly zaměřeny na průzkum a sběr genetických zdrojů rostlin, zajímavých jak z oblasti šlechtění a zemědělství obecně, tak i z hlediska zachování biodiverzity a ochrany přírody. Expedicí se zúčastnili odborníci z Výzkumného ústavu Pícninářského, spol. s r. o., Troubsko, OSEVY PRO, spol. s r. o. – Výzkumné stanice travinářské, Rožnov-Zubří, Vlastivědného muzea Olomouc – Banky semen ohrožených druhů, Výzkumného ústavu rostlinné výroby Praha-Ruzyně – pracoviště Olomouc, Výzkumného ústavu rostlinné výroby Piešťany, Slovenskej poľnohospodárskej univerzity Nitra a Výzkumného ústavu travných porastů a horského poľnohospodárstva Banská Bystrica.

1) České Středohoří

Chráněná krajinná oblast České Středohoří se rozprostírá na severozápadě Čech, na obou březích řeky Labe. Pro České Středohoří jsou typické kuželovité tvary kopců, které byly vytvořeny během třetihorní sopečné činnosti. Tato činnost vytlačila vyvěřeliny čedičového typu a znělce do tvaru kup a příkrovů, které tvoří v tomto území charakteristický reliéf. Díky velké rozmanitosti přírodních podmínek je České středohoří jedna z nejbohatších oblastí na množství druhů rostlin v České republice. Charakteristická jsou především teplomilná stepní společenstva a společenstva sutí. Na tyto společenstva je vázán výskyt několika desítek druhů, které jsou v České republice kriticky nebo silně ohrožené. Díky vhodným přírodním podmínkám bylo České středohoří velmi brzy osídleno a kultivováno člověkem. Vliv člověka je intenzivní i dnes, proto je ochrana ohrožených druhů rostlin a přírody v CHKO České středohoří velmi důležitá.

Sběrová expedice se konala od 18. 7. do 23. 7. 2004. Zúčastnilo se jí 16 účastníků (dvanáct z České republiky a čtyři ze Slovenské republiky). Expedice byla zaměřena na průzkum a sběr genetických zdrojů zdejší (zejména xerothermní) flóry jak na sopečných horninách (vlastní kopce sopečného původu), tak i na spraších a opukách (úpatí těchto kopců). Byly vybrány lokality jak v teplé a suché jihozápadní, tak i v chladnější a vlhčí severovýchodní části CHKO. Celkem bylo shromážděno 156 semenných a vegetativních vzorků rostlin.

Navštívené lokality v CHKO České Středohoří a v bezprostředním okolí (tabulka 1):

Ostrý (1), Oblík (2), Kamenná slunce (3), Milešovka (4), Boreč (5), Hradišťanská louka (6), Radobýl (7), Plešivec (8), Kalvárie (9), Bílé stráně (10), Lovoš (11), Raná (12), Hradiště pod Mentaurovem (13), Babinské louky (14).

Tab. 1

Seznam vzorků shromážděných pracovníky VÚP Troubsko při sběrové expedici České Středohoří 2004 (63 vzorků)

Lokalita 1 1 <i>Saxifraga rosacea</i>	Lokalita 7 49 <i>Trifolium campestre</i>	Lokalita 11 108 <i>Trifolium alpestre</i>
Lokalita 2 4 <i>Trifolium alpestre</i> 5 <i>Trifolium medium</i> 6 <i>Astragalus exscapus</i> 7 <i>Tetragonolobus maritimus</i> 8 <i>Vicia tetrasperma</i> 9 <i>Muscari tenuifolium</i> 10 <i>Pyrethrum corymbosum</i>	50 <i>Medicago falcata</i> 51 <i>Astragalus austriacus</i> 53 <i>Dianthus carthusianorum</i> agg. 60 <i>Vicia hirsuta</i> 61 <i>Medicago lupulina</i> 62 <i>Lotus corniculatus</i> 63 <i>Astragalus cicer</i> 64 <i>Vicia angustifolia</i> 65 <i>Trifolium medium</i> 66 <i>Vicia cracca</i> 67 <i>Lathyrus nissolia</i> 68 <i>Salvia nemorosa</i>	109 <i>Trifolium arvense</i> 110 <i>Trifolium campestre</i> 112 <i>Dianthus carthusianorum</i> agg.
Lokalita 3 20 <i>Astragalus austriacus</i> 21 <i>Astragalus exscapus</i> 22 <i>Oxytropis pilosa</i> 23 <i>Linum austriacum</i>	Lokalita 8 77 <i>Trifolium repens</i> 78 <i>Trifolium arvense</i> 79 <i>Trifolium campestre</i>	Lokalita 12 120 <i>Trifolium repens</i> 121 <i>Medicago lupulina</i> 122 <i>Astragalus austriacus</i> 123 <i>Tetragonolobus maritimus</i> 130 <i>Dianthus carthusianorum</i> agg. 138 <i>Medicago falcata</i> 139 <i>Verbascum phoeniceum</i>
Lokalita 4 Nebyly sebrány žádné vzorky	Lokalita 9 85 <i>Medicago falcata</i> 86 <i>Salvia nemorosa</i>	Lokalita 13 141 <i>Vicia hirsuta</i> 142 <i>Trifolium medium</i> 143 <i>Trifolium campestre</i> 144 <i>Vicia cracca</i> 145 <i>Vicia tetrasperma</i> 148 <i>Rhinanthus alectorolophus</i>
Lokalita 5 33 <i>Trifolium alpestre</i> 34 <i>Vicia hirsuta</i> 35 <i>Saxifraga rosacea</i>	Lokalita 10 90 <i>Lathyrus pratensis</i> 91 <i>Vicia cracca</i> 92 <i>Lotus corniculatus</i> 96 <i>Scorzonera hispanica</i> 97 <i>Pyrethrum corymbosum</i> 98 <i>Salvia pratensis</i> 99 <i>Dictamnus albus</i>	Lokalita 14 153 <i>Trollius altissimus</i> 154 <i>Colchicum autumnale</i>
Lokalita 6 40 <i>Trifolium alpestre</i> 41 <i>Trifolium medium</i> 42 <i>Rhinanthus minor</i> 43 <i>Trollius altissimus</i>		

2) Muráňská planina

Národní park Muráňská planina se nachází na jihovýchodě Slovenska, jižně od řeky Hronu. Celá oblast je tvořena vápencovými horninami. Pro Muráňskou planinu jsou typické vápencové plošiny a hluboká kaňonovitá údolí potoků a řek se skalními výchozy. Flóra je velmi bohatá, s výskytem jak stepních druhů na skalních výchozech, tak i horských a podhorských druhů na loukách na plošinách. Muráňská planina je známá především díky výskytu endemického druhu lýkovce slovenského (*Daphne arbuscula*) na prudkých skalnatých svazích. Vliv člověka na přírodu je zde poměrně malý, dodnes je tato oblast osídlena jenom na okrajích planiny, jádro území tvoří mozaika lesních a lučních společenstev, na skalnatých svazích pak i skalních stepí.

Expedice se konala od 10. 8. do 14. 8. 2004. Expedice se zúčastnilo 8 účastníků (čtyři z České republiky a čtyři ze Slovenské republiky). Expedice byla zaměřena na průzkum a sběr genetických zdrojů zdejší teplomilnou stepní a luční flóru a na vegetaci podhorských luk na vápenci. Pro sběry byly vybrány jak xerothermní lokality v nižších polohách, tak i podhorské

a horské louky na plošinách v polohách nad 1000 m n. m. Celkem bylo shromážděno 105 semenných a vegetativních vzorků rostlin.

Navštívené lokality v CHKO Muráňská planina a v bezprostředním okolí (tabulka 2):

Podhrad (1), Čremošné (2), Biele vody (3), Zadný Voháň (4), Predný Voháň (5), Tesná skala (6), Za hutou (7), Studňa (8), Velká lúka (9), Pod skalou (10), Muráň (11), Randavica (12), Žabica (13), Paseky (14).

Tab. 2

Seznam vzorků shromážděných pracovníky VÚP Troubsko při sběrové expedici Muráň 2004 (61 vzorků)

Lokalita 1	Lokalita 5	Lokalita 12
1 <i>Trifolium campestre</i>	41 <i>Anthyllis vulneraria</i>	84 <i>Trifolium repens</i>
2 <i>Lotus corniculatus</i>	42 <i>Trifolium montanum</i>	87 <i>Carum carvi</i>
3 <i>Medicago falcata</i>	Lokalita 6	88 <i>Colchicum autumnale</i>
4 <i>Stachys germanica</i>	46 <i>Trifolium pratense</i>	Lokalita 13
Lokalita 2	47 <i>Plantago lanceolata</i>	89 <i>Securigera varia</i>
8 <i>Vicia cf. sepium</i>	49 <i>Colchicum autumnale</i>	90 <i>Medicago falcata</i>
12 <i>Salvia verticillata</i>	Lokalita 7	91 <i>Trifolium repens</i>
13 <i>Malva moschata</i>	50 <i>Trifolium repens</i>	92 <i>Leontodon hispidus</i>
Lokalita 3	Lokalita 8	93 <i>Plantago lanceolata</i>
16 <i>Astragalus cicer</i>	54 <i>Trifolium montanum</i>	94 <i>Plantago major</i>
17 <i>Trifolium medium</i>	55 <i>Anthyllis vulneraria</i>	95 <i>Tragopogon orientalis</i>
18 <i>Securigera varia</i>	56 <i>Trifolium repens</i>	Lokalita 14
19 <i>Lotus corniculatus</i>	Lokalita 9	99 <i>Lotus corniculatus</i>
20 <i>Astragalus glycyphyllos</i>	60 <i>Trifolium montanum</i>	100 <i>Trifolium medium</i>
21 <i>Medicago falcata</i>	65 <i>Rhinanthus minor</i>	101 <i>Trifolium montanum</i>
22 <i>Trifolium montanum</i>	Lokalita 10	102 <i>Vicia cracca</i>
24 <i>Plantago media</i>	67 <i>Trifolium medium</i>	103 <i>Dianthus carthusianorum</i>
26 <i>Salvia pratensis</i>	68 <i>Lotus corniculatus</i>	104 <i>Inula salicina</i>
27 <i>Salvia verticillata</i>	70 <i>Medicago lupulina</i>	105 <i>Salvia verticillata</i>
Lokalita 4	71 <i>Carum carvi</i>	
31 <i>Trifolium repens</i>	72 <i>Leontodon hispidus</i>	
32 <i>Trifolium montanum</i>	73 <i>Rhinanthus minor</i>	
33 <i>Trifolium pratense</i>	Lokalita 11	
35 <i>Leucanthemum vulgare</i>	75 <i>Trifolium repens</i>	
39 <i>Plantago media</i>	76 <i>Gentiana cruciata</i>	
40 <i>Colchicum autumnale</i>	77 <i>Bunias orientalis</i>	

Poděkování

Tyto výsledky jsou součástí projektu „Průzkum, využití a ochrana diverzity netradičních genetických zdrojů rostlin v České a Slovenské republice“, administrovaného pod číslem 156 u Asociace inovačního podnikání ČR a financovaného Ministerstvy školství, mládeže a tělovýchovy ČR a SR.

Kontaktní adresy autorů

Mgr. Tomáš Vymyslický, Ing. Jan Pelikán, CSc., Ing. Pavlína Gottwaldová, RNDr. Jan Nedělník, PhD, Výzkumný ústav pícninářský, spol. s r. o., 664 41 Troubsko
E-mail: vymyslicky@vupt.cz, pelikan@vupt.cz, gottwaldova@vupt.cz, nedelnik@vupt.cz

Konzervace a využívání genetických zdrojů v ČR - zlepšení jejich dostupnosti a sdílení prospěchu

Ladislav Dotlačil, Zdeněk Stehno, Iva Faberová

Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha

Souhrn

Projekt "Podpora biodiversity/Zhodnocení potřeby při budování kapacit: Přístup ke genetickým zdrojům, rozdělování prospěchu z jejich využití, konzervace a setrvalé využívání biodiversity významné pro zemědělství, lesnictví a výzkum", jeho struktura, cíle a očekávané výstupy jsou stručně popsány. Projekt zahrnuje genetickou diversitu v rámci různých oborů. Hlavním cílem projektu je odhadnout a analyzovat současný stav genofondů a zhodnotit přístup ke genetickým zdrojům kulturních rostlin, lesních dřevin a zemědělských zvířat, ale i genetických zdrojů v botanických a zoologických zahradách v ČR.. Na základě zjištěných potřeb budou navrženy efektivní metody vedoucí k lepšímu zpřístupnění genetických zdrojů a rovnoprávnému sdílení prospěchu z nich.

Klíčová slova: *genetické zdroje, přístup ke genetickým zdrojům, sdílení prospěchu*

Summary

Structure, objectives and expected outcomes of the project "Biodiversity Enabling Activities/ Assessment of Capacity-building Needs: Access to Genetic Resources and Benefit-sharing, Conservation and Sustainable Use of Biodiversity Important for Agriculture, Forestry and Research" are briefly described and genetic diversity within particular gene pools is discussed. Main goal is to estimate and analyze present status of gene pools and an access to genetic resources of cultivated crops, forest trees and farm animals as well as genetic resources in botanical and zoological gardens in the Czech Republic. Gaps will be identified and effective measures should be proposed to increase access to plant genetic resources and benefit sharing.

Key words: *genetic resources, access to genetic resources, benefit sharing*

Ministerstvo životního prostředí ČR bylo pověřeno řešením mezinárodního projektu UNEP/GEF 2328- 2716- 4786: "Biodiversity Enabling Activities/ Assessment of Capacity-building Needs: Access to Genetic Resources and Benefit-sharing, Conservation and Sustainable Use of Biodiversity Important for Agriculture, Forestry and Research" („Zhodnocení potřeby při budování kapacit: Přístup ke genetickým zdrojům a sdílení prospěchu z jejich využití, konzervace a setrvalé využívání biodiversity významné pro zemědělství, lesnictví a výzkum - Česká republika" - koordinátor Ing. Milena Roudná, MŽP). Doba řešení projektu je plánována na 15 měsíců (srpen 2004 – říjen 2005) a řešení je rozděleno do dvou tematických okruhů:

1. Dostupnost genetických zdrojů a sdílení prospěchu z jejich využívání
2. Současný stav genofondů v ČR, jejich evidence a konzervace

Projekt se zaměřuje na poměrně široké spektrum genetických zdrojů rostlin a zvířat shrnuté do následujících skupin:

- a) Genetické zdroje zemědělských plodin (polní a zahradní plodiny, průmyslové plodiny, léčivé a aromatické rostliny, vybrané okrasné rostliny)
- b) Genetické zdroje lesních dřevin (soubory reprodukčního materiálu všech druhů dřevin, regionálních, lokálních i vyšlechtěných populací pro obnovu lesa a zalesňování a pro potřeby lesnického výzkumu)
- c) Genetické zdroje rostlin v botanických zahradách (široký sortiment rostlinných taxonů, který zahrnuje jak plané druhy rostlin, tj. druhy vyskytující se ve volné přírodě, tak i pěstované druhy, tedy kulturní rostliny nejrozličnějších druhů, včetně jejich kultivarů)

- d) Genetické zdroje hospodářských zvířat (uznaná národní plemena dlouhodobě místně adaptovaných druhů a plemen hospodářských zvířat vyžadujících ochranu)
- e) Genetické zdroje zvířat chovaných v zoologických zahradách

Shromážděné počty druhů a vnitrodruhovou diversitu hodnocených skupin genofondů charakterizuje Tab. 1. Srovnávané skupiny genofondů se podstatně odlišují co do šíře uchovávané druhové diversity, která je nejrozsáhlejší u rostlinných druhů v botanických zahradách (cca 10 tisíc druhů), následují zoologické zahrady (v 15 ZOO v ČR je 2 345 druhů zvířat). U obou těchto skupin genofondů jde především o zachování druhů (při plnění další řady funkcí - především kulturní a rekreační, výchovné, naučné a vědecké), nicméně v botanických zahradách jsou uchovávány i různé variety, popř. kultivary, především okrasných rostlin (zahrnující i vnitrodruhovou genetickou diversitu). Druhově užší diversitu představuje genofond zemědělských plodin (v ČR je v kolekcích konzervováno celkem 1 280 druhů zemědělských a zahradních plodin, léčivých a kořeninových rostlin a vybrané druhy okrasných rostlin), v genofondech lesních dřevin je konzervováno ještě užší spektrum 147 druhů a u hospodářských zvířat jen 16 druhů. V rámci tohoto relativně úzkého druhového spektra však u lesních dřevin a zemědělských plodin existuje rozsáhlá vnitrodruhová diversita (klony, ekotypy, krajové a šlechtěné odrůdy, genetické linie), takže uchovávané počty genetických zdrojů se pohybují v desítkách tisíc (48,8 tis. položek u zemědělských plodin v „*ex situ*“ kolekcích, u lesních dřevin přes 11 tis. položek v „*ex situ*“ kolekcích a další materiály v „*in situ*“ podmínkách). U lesních dřevin tak připadá na jeden druh přes 75 genotypových položek, u zemědělských plodin je tento počet asi poloviční (v přepočtu 38 položek). V rámci genofondů hospodářských zvířat je uchováváno 35 plemen domácího původu (1 až 7 plemen od jednoho druhu); podstatné je zachování dostatečně široké genetické báze těchto plemen.

Tab. 1 Stav genofondů zemědělských plodin, lesních dřevin, sbírek botanických zahrad, genetických zdrojů hospodářských zvířat a zvířat chovaných v zoologických zahradách v ČR k 30.6. 2005

Diversita genetických zdrojů u různých skupin genofondů	Skupina genofondů				
	Zeměděl. plodiny	Lesní dřeviny	Rostliny v botan. zahradách	Hospodářská zvířata	Zvířata v zoologických zahradách
Mezidruhová diversita (počet druhů)	1280	147	cca 10 tis. ?	16	2345
Vnitrodruhová diversita (průměrný počet odrůd, genotypů, plemen / druh)	38	75	cca 4 ?	1-7 (průměr =2)	? (různý počet chov. zvířat)
Celkem evidováno položek (počet genetických zdrojů)	48835	„ <i>ex situ</i> “ (11 tis.položek) „ <i>in situ</i> “ ?	cca 40 tisíc?	35 plemen (pouze plemena domácího původu)	2345

Jak ukazuje tento stručný přehled, zoologické a botanické zahrady se v souladu se svým posláním orientují především na uchování druhů, v případě hospodářských zvířat jde o domácí

plemena omezeného počtu druhů. U botanických zahrad se nicméně vyskytují sbírky reprezentující vnitrodruhovou diversitu (variety, kultivary) vybraných druhů, zejména okrasných rostlin. Rozhodujícím posláním je zachování těchto druhů (plemen) pro budoucnost, se zřetelem na jejich kulturní a vědeckou hodnotu; komerční využití např. v zemědělské praxi nebo ve šlechtění druhů je omezené (plemena zvířat, kultivary okrasných rostlin). U zemědělských plodin a lesních dřevin je vedle konzervace druhové diversity základním posláním zejména zachování diversity vnitrodruhové (shromážděné ekotypy, klony, kultivary, linie, populace) a její využití v pěstitelské praxi, šlechtění a semenářství hospodářsky využívaných druhů rostlin. Využívání této diversity je spojeno s významnými ekonomickými přínosy, které se realizují zejména prostřednictvím nových kultivarů, kvalitních osiv a sadby, klonů, semenáčů apod. Možnosti efektivního přímého i nepřímého využití (šlechtění) akcentují ekonomickou hodnotu a význam dostupnosti genetických zdrojů a sdílení prospěchu z jejich využívání, zejména u genofondů zemědělských plodin a lesních dřevin. To však nesnižuje význam dostupnosti a využívání genofondů pro nekomerční účely.

Obecné cíle projektu

a) Identifikovat a přizvat ke spolupráci všechny subjekty v ČR, u nichž lze předpokládat zájem na uchování a využívání genetických zdrojů a potenciál přispět nějakým způsobem ke sdílení prospěchu z využívání genetických zdrojů. Sdílení tohoto prospěchu by mělo být vyjádřeno zejména pomocí a podporou institucím uchovávajícím genofondy a farmářům v zemích původu genetických zdrojů, zvláště v zemích rozvojových. Na základě diskuse účastníků projektu budou navrženy způsoby a formy pomoci k dosažení vyčtených cílů.

b) Poznat a monitorovat současný stav genofondů v ČR a analyzovat potřeby, problémy a rizika pro genetické zdroje uchovávané na území České republiky v „*ex situ*“ a „*in situ*“ podmínkách.

c) Identifikovat nejdůležitější úkoly, „prázdná místa“, nedostatek kapacit a rizika, která ohrožují či omezují uchování genetických zdrojů, jejich dostupnost a popřípadě omezují možnosti sdílení prospěchu z využití genetických zdrojů.

d) Formulovat a přijmout opatření na podporu dostupnosti genetických zdrojů, podpořit mechanismy sdílení prospěchu z využívání genetických zdrojů a usilovat o jejich uplatnění, ve smyslu zásad CBD a Bonnských směrnic (budování potřebných kapacit, rozvoj a přenos technologií a nových metod, budování vhodného legislativního a institucionálního rámce, propagace a vytváření obecného povědomí o významu a hodnotě genofondů, rozvoj spolupráce s nevládními organizacemi).

e) Přispět těmito opatřeními k bezpečnému a efektivnímu transferu genetických zdrojů uživatelům, při respektování požadavků a práv garantovaných mezinárodními dohodami.

Společné aktivity, které jsou v rámci projektu zajišťovány u všech skupin genofondů a očekávané výstupy

a) Popis a charakterizace aktuálního stavu a evidence shromážděných genofondových sbírek (kolekcí) výše uvedených skupin genofondů uchovávaných v České republice; shromáždění informací o stavu genofondů, potřebách regenerace, dostupnosti genetických zdrojů, nedostatcích a nutných inovacích.

b) Identifikace a charakteristika reálných a potenciálních rizik, která ohrožují shromážděné genofondy, s cílem popsat a analyzovat existující problémy a navrhnout způsoby jejich řešení, s cílem zlepšit bezpečnost konzervace a dostupnost genetických zdrojů.

c) Pracovní diskuse účastníků projektu (dva semináře, průběžná výměna informací) orientovaná na analýzu a věcná řešení existujících problémů a formulace doporučení pro zlepšení dostupnosti genetických zdrojů a účinnější sdílení prospěchu z jejich využívání.

d) Příprava vhodné a prakticky využitelné strategie a komplexních opatření (konzervace, podmínky a problémy dostupnosti genetických zdrojů, postavení uživatelů, využitelné mechanismy a nástroje) na podporu dostupnosti genetických zdrojů a sdílení prospěchu z jejich využívání.

e) Legislativa a právní problémy v České republice, spojené s dostupností genetických zdrojů a sdílením prospěchu z jejich využívání. Analýza současného stavu s ohledem na národní i mezinárodní závazky a stav, identifikace nedostatků a potřeb a případná doporučení.

f) Shromáždění informací o probíhající mezinárodní spolupráci u všech skupin genofondů, zejména s ohledem na možnosti podpořit mechanismy a nástroje pro sdílení prospěchu z využívání genetických zdrojů. Formulace návrhů na zvýšení efektivnosti existující spolupráce a její rozšíření o nové možné aktivity, s ohledem na uvedené cíle.

g) Formulace priorit a potřeb nových kapacit a technologií na podporu dostupnosti genetických zdrojů a sdílení prospěchu z jejich využívání.

h) Zpráva o současném stavu genetických zdrojů rostlin a zvířat v ČR, jejich dostupnosti pro uživatele a sdílení prospěchu z jejich využívání; návrh opatření pro řešení problémů a na podporu dosažení uvedených cílů projektu.

Literatura

- Ad hoc Open-Ended WG on Access and Benefit Sharing (2001): Development of Draft International Guidelines on Access and Benefit Sharing, Bonn, 22-26 October 2001, 18 pp
- CBD secretariat (1998): Convention on Biological Diversity – Text and Annexes. Montreal, Secretariat of the Convention on Biological Diversity, 34 pp.
- CBD secretariat (2001): Global Biodiversity Outlook. CBD, UNEP, Montreal, 282 pp.
- CBD secretariat (2005): Convention on Biological Diversity Handbook. Including its Cartagena Protocol on Biosafety (the 3rd Edition). CBD, UNEP, Montreal, 1493 pp.
- EU submission to CBD secretariat (2004): Decision VII/19 on Access and Benefit-sharing as related to genetic resources – Request by the CBD Secretariat for submission of views and information (notification 29/04/04), 11 pp.
- FAO (1996): Global Plan of Action for the Conservation and Sustainable Utilization of Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. FAO, Rome, 63 pp.

Kontaktní adresy autorů

Ing. Ladislav Dotlačil, CSc., Ing. Zdeněk Stehno, CSc., Mgr. Iva Faberová, Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně
E-mail: dotlacil@vurv.cz, stehno@vurv.cz, faberova@vurv.cz

Pilotní projekt FAO “Národní mechanismus pro sdílení informací o implementaci Globálního plánu akcí pro konzervaci a setrvalé využívání genetických zdrojů rostlin pro výživu a zemědělství”

Iva Faberová, Ladislav Dotlačil, Zdeněk Stehno

Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha 6 – Ruzyně

Souhrn

Česká republika spolu s několika dalšími státy světa zúčastnila pilotního projektu FAO, který vyústil do ustavení Národního mechanismu sdílení informací o implementaci GPA. Mechanismus je založen na účasti zainteresovaných subjektů na národní úrovni s cílem podporovat výměnu informací a posilovat spolupráci zainteresovaných subjektů a tím přispět mimo jiné i k rozšíření kapacit Národního programu pro konzervaci a využití genetických zdrojů rostlin a agrobiodiversity. Mechanismus zahrnuje webovskou aplikaci, která usnadňuje shromažďování a vedení informace pomocí indikátorů a příslušného formuláře pro záznam dat. Zpracováním těchto údajů je monitorován stav implementace GPA v zemi. Shromážděná data jsou dostupná v mnohojazyčné verzi na URL <http://www.pgrfa.org/>.

Klíčová slova: Globální plán akcí, konzervace a využití genetických zdrojů rostlin, dokumentační systém, PGRFA, FAO

Summary

Czech Republic participated together with other few countries in the pilot project FAO „National information sharing mechanism on the implementation of the Global Plan of Action on plant genetic resources for food and agriculture“. Mechanism is based on participation of stakeholders at the national level with the aim of strengthening cooperation of stakeholders and improve quality of information on PGRFA. Information on country level is processed by the national focal points and forwarded to FAO. Mechanism includes web application enabling data gathering and processing using the set of indicators and relevant forms for data input and search. Compiled data are available in multilingual version on the URL <http://www.pgrfa.org/>.

Key words: Global Plan of Action, PGRFA conservation and utilization, documentation system, FAO

Úvod

Pilotní projekt „Národní mechanismus pro sdílení informací o implementaci Globálního plánu akcí pro konzervaci a setrvalé využívání genetických zdrojů rostlin pro výživu a zemědělství“ (“National information sharing mechanism on the implementation of the Global Plan of Action on plant genetic resources for food and agriculture“, dále NISM) vznikl spoluprací FAO a IPGRI v souvislosti s nutností zaznamenávat a sledovat stav genetických zdrojů rostlin významných pro výživu a zemědělství (PGRFA) v celosvětovém měřítku.

Shromažďování informací o PGRFA je zakotveno v mezinárodním dokumentu Úmluva o biologické rozmanitosti (*Convention on Biodiversity*, dále CBD), která byla přijata na konferenci v Rio de Janeiro roku 1992 a do dnešního dne k ní přistoupilo celkem 168 zemí.

Česká republika ji přijala roku 1999 Sdělením MZV o přistoupení ČR k CBD č. 134/1999 Sb. CBD určuje zásady pro uchování genofondu a týká se konzervace, setrvalého využívání a spravedlivého rozdělení prospěchu z PGRFA. Dalším významným dokumentem, který vychází z CBD, je Globální plán akcí pro konzervaci a setrvalé využívání genetických zdrojů rostlin významných pro výživu a zemědělství (*Global Plan of Action for the Conservation and Sustainable Utilization of Plant Genetic Resources for Food and Agriculture*, dále GPA). Dokument byl přijat na Mezinárodní technické konferenci v Lipsku v roce 1996 více než 150 účastnickými zeměmi.

Hlavním posláním Globálního plánu akcí je zajistit konzervaci genetických zdrojů pro výživu a zemědělství jako základu pro potravinovou bezpečnost, podpořit setrvalé využívání

PGRFA s cílem posílit rozvoj a potlačit hlad a chudobu, propagovat spravedlivé sdílení prospěchu, který vzniká na základě využití PGRFA, pomáhat státům a institucím zodpovědným za konzervaci a využití PGRFA identifikovat priority pro další činnost a posilovat národní, regionální a mezinárodní programy pro konzervaci a využívání PGRFA, včetně vzdělání a výcviku. Ke splnění těchto cílů bylo v rámci GPA definováno 20 priorit, které spadají do čtyř oblastí činnosti: konzervace a rozvoj *in situ*, konzervace *ex situ*, využívání genetických zdrojů a budování institucí a kapacit.

GPA doprovázela tzv. Lipská deklarace, která upozorňuje na význam rostlinných genetických zdrojů pro světovou potravinovou bezpečnost a pověřuje signatářské státy uvedením GPA v život.

Od roku 1996 se informace o PGRFA ve FAO shromažďují v pětiletých intervalech. Zpočátku to byly pouze textové dokumenty, jejichž použití bylo omezené a nebylo možné sledovat postupy a změny v jednotlivých státech a regionech.

Poslání pilotního projektu

Pilotní projekt měl za cíl vytvořit webovskou aplikaci pro sběr a analýzu dat o PGRFA ve světě, která bude součástí informačního systému včasného varování FAO WIEWS (*World Information and Early Warning System*). Mnohojazyčná aplikace využívající jednoho z oficiálních jazyků FAO (angličtina, španělština, francouzština) v kombinaci s příslušným národním jazykem bude použitelná na úrovni jednotlivých států, ale i v celosvětovém měřítku. Struktura dat odpovídá čtyřem oblastem aktivit a 20 prioritám, které jsou shodné s GPA.

Základní shromažďování dat je prováděno na úrovni státu: národní koordinační pracoviště (National focal point, NFP) provádí sběr dat od jednotlivých zainteresovaných subjektů (stakeholders, SH) a zpracovaná data za stát jsou národním koordinačním pracovištěm odesílána do FAO. Aplikace uchovává jednotlivé verze dat, takže srovnání datových verzí umožní sledovat i postup a pokrok v jednotlivých směrech.

Pilotní projekt začal v průběhu roku 2002 a byl ukončen v listopadu 2004. V této době probíhalo ladění programové části a vkládání testovacích datových sad. Koncem roku 2004 byla v provozu verze programu pod pořadovým číslem 3.5. Rámec aplikace je v současné době dostupný ve 12 jazykových variantách a data jsou dostupná pro 9 zemí. Aplikace umožňuje s využitím textového vyhledávače hledat údaje v celém systému nebo v jeho částech podle zadaného kritéria.

Technické zázemí aplikace

Aplikace byla programově vyvinuta ve FAO a jejím základem jsou volné software (open source, použitelné bez licence) Java Servlet, JavaServer Pages v kombinaci s webovým serverem Tomcat 4.1.24 a databázovým serverem McKoi v. 94. XSL (Extensible Stylesheet Language) je použit pro interpretaci XML (Extensible Markup Language).

Základem dat je soubor devíti všeobecných tabulek, které obsahují údaje o institucích, kontaktních osobách, taxonech, kultivarech, geografických oblastech, projektech, smlouvách, informačních systémech a publikacích, které souvisejí s genetickými zdroji rostlin. Základem adresáře institucí a kontaktních osob jsou údaje již dříve zahrnuté do systému FAO WIEWS. Tabulka přehledu taxonů využívá datový soubor amerického taxonomického systému GRIN. Ostatní tabulky jsou vyplňovány nejprve na národním koordinačním pracovišti a posléze aktualizovány a doplňovány i dalšími účastníky. Každý účastník má možnost upravovat kterýkoliv ze záznamů zařazený do všeobecných tabulek. Aktuálnost těchto dat je velkou předností systému.

Další informace jsou získávány od jednotlivých účastníků pomocí elektronického dotazníku, který pokrývá velmi podrobně všech 20 prioritních oblastí GPA. Formulář

dotazníku sestává z 83 stěžejních a 68 doplňkových indikátorů a s nimi spojených otázek, kterých je celkem 141 (118 základních a 23 doplňkových). Sada indikátorů a otázek je v aplikaci propojena navzájem a vztahuje se rovněž ke všeobecným tabulkám. Část otázek je vyčleněna pro zodpovězení koordinátorem a jinou část vyplňují účastníci. Koordinační pracoviště je většinou angažováno v obou účastnických kategoriích. Účastníkem může být organizace nebo jednotlivec, jehož činnost se týká přímo nebo i nepřímo uvádění Globálního plánu akcí v život.

Model výměny dat

Výměna dat mezi FAO a jednotlivými zainteresovanými subjekty probíhá prostřednictvím národního koordinátora, který nejprve koordinátorskou versi programu od FAO. Národní koordinátor nejprve vyplňuje všeobecné tabulky a jemu vyčleněnou část formuláře. Dále vytváří a distribuuje instalační CD s aplikací určenou pro sběr dat jednotlivým partnerům. Každý zúčastněný partner dostává svůj identifikační klíč a bezpečnost vstupu je ještě zajištěna přihlašovacím heslem. Identifikační klíč pro národní koordinátory je určen ve FAO a identifikační klíče v rámci státu pak jsou generovány pomocí aplikace koordinačního pracoviště a připraveny k distribuci partnerům. V rámci celého systému je tak každý záznam pořízený kterýmkoliv účastníkem jednoznačně identifikován.

Každý z partnerů dostává od koordinátora programový balík na CD spolu s identifikačním klíčem, který celou aplikaci nainstaluje a připraví pro provoz na lokálním počítači účastníka. Uživatelský manuál pro instalaci a práci s elektronickým dotazníkem je k dispozici v angličtině a podrobný popis formuláře s vysvětlivkami i v národním jazyce. Po krátké instruktáži a seznámením se způsobem záznamu dat jsou však účastníci schopni s aplikací běžně pracovat. Data vyplněná účastníky v národním jazyce jsou potom shromážděna na koordinačním pracovišti, kde jsou slučována a případně i překládána do jednoho ze tří oficiálních jazyků FAO. Země, jejichž oficiálním jazykem je angličtina, španělština nebo francouzština jsou ve výhodě. V procesu slučování dat musí koordinační pracoviště nejprve zhodnotit platnost každého záznamu, aby nedošlo k duplikacím, případně upravit i formální nedostatky. Po sloučení všech dostupných záznamů do jednoho zdroje je stávající verze uzavřena k příslušnému datu a sada údajů je předána do FAO. Data jsou pak dostupná v rámci celosvětového systému on-line na serveru FAO na adrese <http://www.pgrfa.org/selectcountry.jsp> nebo pro úroveň jednotlivých států na koordinačním pracovišti. FAO počítá do budoucnosti s volným šířením hotového programového balíku případným zájemcům. Současná verze aplikace je stále označena jako pracovní.

Účast ČR v pilotním projektu

Česká republika byla přizvána k účasti koncem roku 2002 a její účast byla podpořena několika přednostmi, především tradicí činnosti s kolekcemi PGRFA a spolupracující sítě zkušených odborníků. Dlouholeté zkušenosti se týkají systému práce s kolekcemi genetických zdrojů užitkových rostlin, především v oboru *ex situ* konzervace a dokumentace. Od počátku 20. století na našem území probíhalo intenzivní šlechtění, od 50. let se tradují systematické práce s kolekcemi genetických zdrojů zemědělsky využívaných plodin a od roku 1993 se sjednocuje metodika a koordinace všech činností týkajících se PGRFA v rámci Národního programu konzervace a využívání genofondu rostlin (dále NP). Všechny tyto činnosti jsou centralizovány a jednotlivé účastnické instituce pracují v rámci členské sítě Národního programu podle společné metodiky. Činnost je řízena poradním tělesem sestaveným z odborníků - Radou pro genetické zdroje rostlin v ČR. Setrvalost těchto činností je zakotvena v zákonu o konzervaci a využívání genetických zdrojů rostlin a mikroorganismů významných pro výživu a zemědělství č. 148/2003 Sb. a jeho prováděcí vyhlášce č. 458/2003 Sb.

Síť účastníků NP se stala základem pro skupinu partnerů (zainteresovaných subjektů) pilotního projektu. Očekávaným přínosem projektu bylo zkvalitnění informace o PGRFA v zemi pomocí rozšíření stávající sítě partnerů NP o další subjekty (nevládní organizace, šlechtitelé, atd.), doplnění a rozšíření informací o projektech a publikacích a analýza současného stavu PGRFA shromážděním dat v co nejširším záběru.

Česká republika se účastnila pilotního projektu téměř od samého počátku. Prvním krokem byly překlady textů obecného rámce aplikace a formulářů koncem roku 2002. Začátkem roku 2003 již probíhalo testování první zkušební verze aplikace 1.1. V březnu 2003 proběhla první informativní schůzka s potencionálními partnery projektu. Základem skupiny účastníků se stalo 11 institucí zapojených do spolupracující sítě NP, přizváni byli zástupci Ministerstva zemědělství a Ministerstva životního prostředí. Limitujícím faktorem pro zapojení účastníků bylo dostatečné vybavení hardware a nutné zkušenosti s prací na počítači. Účastníci byli na schůzce seznámeni s účelem projektu a jednou z prvních verzí aplikace. Během letních měsíců 2003 byla doplněna data do všeobecných tabulek, především registrované kultivary, projekty a publikace, vygenerovány byly aktivační klíče a připraveny CDs verzí programu k distribuci partnerům. V říjnu 2003 se uskutečnilo druhé setkání účastníků. Celkem 16 partnerů obdrželo instalační CD s verzí aplikace 1.8, která obsahovala již anglický manuál k obsluze aplikace. Účastníkům byla poskytnuta instruktáž k vyplňování údajů a přislíbena byla i technická asistence v případě potíží s instalací nebo záznamem dat.

Konec roku 2003 byl stanoven jako termín pro odevzdání dat. V prosinci byly shromážděny sady dat od 13 ze 16 partnerů, ale v této době ještě nebyla k dispozici verze programu umožňující prohlížení a slučování dat. Bylo třeba počkat do ledna 2004, kdy verze 2.1 obsahovala již programový modul ke slučování dat s rozšířeným manuálem. Významným přínosem této verze byla možnost exportu a importu dat jednotlivých tabulek i odpovědí z databázového prostředí MacKoi do formátu xls (Excel), která umožnila snadnější manipulaci s daty. V průběhu února a března 2004 probíhalo slučování dat a současně s tím i doladování drobných chyb v programu ve výsledné verzi 2.3. V dubnu 2004 byla připravena závěrečná zpráva za projekt a začátkem května se všichni účastníci pilotního projektu sešli ve FAO Řím na hodnotící schůzce projektu. Výsledkem hodnocení však byly dosti zásadní zásahy do struktury dat a nová verze aplikace 3.1 tyto změny již zahrnovala. Znamenalo to původní data konvertovat do nové struktury. Zároveň byly texty překládány do angličtiny, a to v části formuláře i vlastních dat. V září 2004 byla konvertovaná data první české verze uzavřena a předána do FAO. Vypracována byla úvodní webová stránka s informacemi o ČR a pilotním projektu v české a anglické jazykové variantě, která je dostupná v rámci aplikace NISM na URL <http://www.pgrfa.org/gpa/cze/czewelcomeil.html>.

Výsledky pilotního projektu

Činnosti v rámci projektu přispěly k testování a doladování programu webové aplikace pro sběr a prohlížení dat vyvinuté ve FAO Řím.

Hlavním výstupem projektu z pohledu uživatele je zkvalitnění informace o stavu PGRFA a ustanovení Národního mechanismu pro sdílení informací o monitoringu implementace GPA v ČR. Informace o genetických zdrojích rostlin významných pro výživu a zemědělství jsou nyní soustředěny do jednoho zdroje a kategorizovány z pohledu dvaceti priorit GPA. Fulltextový vyhledávač dává možnost orientace v textech a vícejazyčný rámec aplikace slouží k získávání srozumitelných údajů z ostatních zemí, protože národní jazykové verze jsou vždy doplněny jedním ze tří oficiálních jazyků FAO.

Účast v pilotním projektu přispěla k prohloubení spolupráce stávajících partnerů a zařazení dalších účastníků do spolupráce v rámci ČR. Projektu se účastnilo se celkem 15 institucí, od nichž byla získána data. Údaje byly centrálně zpracovány na pracovišti VÚRV Praha, které plní funkci kontaktního bodu za ČR. Takto shromážděné informace byly

zařazeny do mnohojazyčné webovské aplikace dostupné na <http://www.pgrfa.org/>. Výhodou systému je práce s časově ukončenými datovými versemi, které se archivují. Nové verze se budou doplňovat podle potřeby a porovnáním verzí bude možné sledovat proces rozvoje. K tomuto účelu bude do systému zařazen programový modul pro analýzu dat .

Literatura

- FAO (1996): Global Plan of Action for the Conservation and Sustainable Utilization of Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. FAO, Rome, 63 pp.
- Gass T., Frese L., Begemann F. and Lipman E. (1999): Implementation of the Global Plan of Action in Europe – Conservation and Sustainable utilization of Plant genetic Resources for food and Agriculture. (Proceedings of the European Symposium, Braunschweig, Germany, (1998), 396 pp.
- Secretariat of the Convention on Biological Diversity (2000): From Policy to Implementation – Decisions from the Fifth Meeting of the Conference of the Parties to the Convention on Biological Diversity, Nairobi, Kenya, 15-26 May 2000. Montreal, Secretariat of the Convention on Biological Diversity, 138 pp.

Kontaktní adresy autorů

Mgr. Iva Faberová, Ing. Ladislav Dotlačil, CSc., Ing. Zdeněk Stehno, CSc., Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně
E-mail: faberova@vurv.cz, dotlacil@vurv.cz, stehno@vurv.cz

Právní a věcný rámec pro poskytování vzorků genetických zdrojů rostlin uživatelům - modelová dohoda pro Českou republiku

Ladislav Dotlačil, Zdeněk Stehno, Iva Faberová

Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha 6 - Ruzyně

Souhrn

Od roku 1983 byl přístup ke genetickým zdrojům regulován na mezinárodní úrovni resolucí FAO 8/83, která deklarovala volné využití pro šlechtění a výzkum na principu zdůrazňujícím, že „genetické zdroje jsou dědictvím lidstva“. Tato koncepce byla změněna přijetím dokumentu „Konvence o biologické rozmanitosti“ (CBD), který deklaruje „suverenitu států nad genetickými zdroji vyskytujícími se na jejich území“. FAO bylo pověřeno přípravou mnohostranné dohody, která bude tuto novou skutečnost odrážet. Přijetím nové Mezinárodní smlouvy o genetických zdrojích rostlin významných pro zemědělství a výživu (IT PGRFA) v roce 2002 je uveden do souladu mezinárodní právní status rostlinných genetických zdrojů s principy CBD. Mezinárodní smlouva se týká jen vybraných druhů využívaných pro výživu a zemědělství, zohledňuje práva farmářů a s nimi spojené sdílení prospěchu a respektuje právní ochranu kultivarů. Pro praktické využití je připravován ve FAO text standardního dokumentu Dohoda o výměně vzorků (MTA). Mnohé země a genové banky vyvinuly a používají své vlastní Dohody o výměně vzorků. Takový modelový dokument doporučený pro využití v českých institucích – účastnících Národního programu genetických zdrojů je uveden v příloze (v české a anglické verzi) .

Klíčová slova: genetické zdroje rostlin, FAO, Mezinárodní smlouva o genetických zdrojích rostlin pro výživu a zemědělství (IT PGRFA), Dohoda o výměně vzorků (MTA)

Summary

Since 1983, access to plant genetic resources has been internationally regulated by FAO resolution 8/83, which guaranteed free utilization for breeding and research, on the principle that “genetic resources are heritage of all mankind“. This conception has been changed when “Convention on Biological Diversity”(CBD) came in action and declared “sovereignty of states over genetic resources on their territories“. Therefore, FAO has been entrusted to prepare new multilateral agreement which will reflect these changes. Adoption of new International Treaty on PGRFA (IT PGRFA) in 2002 harmonized the international legal status of plant genetic resources with CBD principles. The Treaty covers only selected species used for food and agriculture, abides farmers rights and related benefit sharing mechanisms, as well as legal protection of cultivars. For practical implementation, standard Material transfer agreement is being developed by FAO. Due to urgent needs, many countries and gene banks have developed own Model Transfer Agreements; such Czech document (Czech and English versions) is an attachment to this paper. This model agreement is recommended for utilization to the Czech institutions holding collections within the National Programme on Plant Genetic Resources.

Key words: plant genetic resources, FAO, International Treaty on PGRFA (IT PGRFA), Material Transfer Agreement (MTA)

Genetické zdroje rostlin (dále GZR) mají pro lidstvo nevyčíslitelnou hodnotu, ať již jsou využívány v tradičním zemědělství, konvenčním či moderním šlechtění, nebo v genovém inženýrství a biotechnologiích obecně. Jsou unikátním a nenahraditelným zdrojem genů a genových komplexů pro další genetické zlepšování biologického a hospodářského potenciálu produkčních organismů v zemědělství a v biotechnologiích. S rozvojem biotechnologií (v posledních letech zejména molekulární genetiky a genového inženýrství) se významně zvyšuje i reálná hodnota genetických zdrojů a právní rámec pro jejich poskytování uživatelům.

V roce 1983 byla na konferenci Organizace spojených národů pro zemědělství a výživu (FAO) ustavena Komise pro genetické zdroje rostlin - CPGR (po přijetí Úmluvy o biologické

rozmanitosti přejmenované na „Komisi pro genetické zdroje rostlin pro výživu a zemědělství - CPGRFA). FAO připravila rezoluci č. 8/83 „International Undertaking on Plant Genetic Resources“, kterou ratifikovala většina států světa a která se stala platformou pro mezinárodní spolupráci na poli konzervace, dokumentace, studia a využívání genetických zdrojů rostlin až do roku 2002, kdy ji nahradil dokument revidovaný dle zásad Úmluvy o biologické rozmanitosti. „International Undertaking“ vycházel z teze, že „genetické zdroje rostlin jsou dědictvím všeho lidstva...“ a státy mají povinnost zajistit jejich konzervaci a využívání ku prospěchu současných a budoucích generací“. Dohoda garantovala volný a bezplatný přístup uživatelům GZR ke genofondům ve všech signatářských státech, využití GZR vymezovala pouze pro potřeby výzkumu, šlechtění a vzdělávání (tedy nikoliv pro přímé komerční využití).

Postoj k poskytování genetických zdrojů uživatelům v globálním měřítku změnily závěry Konference spojených národů pro rozvoj a životní prostředí, která se konala v Rio de Janerio v roce 1992. Základním dokumentem vzniklým z této konference byla Úmluva o biologické rozmanitosti (CBD), jejíž součástí je i „Agenda 21“, která se týká genetických zdrojů rostlin a zvířat pro potřeby zemědělství a výživy, jejich konzervace a setrvalého využívání. Nová úmluva deklarovala „národní suverenitu nad genetickými zdroji na území jednotlivých států, což bylo v rozporu s rezolucí FAO 8/83. FAO bylo pověřeno připravit revizi této rezoluce a uvést nový dokument do souladu s principy deklarovanými v Úmluvě o biologické rozmanitosti, zejména garancí plné národní suverenity nad genetickými zdroji každé země a vytvořením mechanismů a principů pro spravedlivé sdílení prospěchu z jejich využívání. Nová dohoda přitom měla zachovat co nejširší přístup ke GZR a podpořit jejich setrvalé využívání. Obtížný proces přípravy dohody trval téměř devět let a vyvrcholil přijetím „International Treaty on Plant Genetic Resources for Food and Agriculture“ (IT/PGRFA) na zasedání komise FAO pro GZR v Římě v listopadu 2001.

V preambuli nové dohody je uveden společný zájem všech zemí na GZR a na jejich využívání pro další genetické zlepšování zemědělských plodin. Je deklarováno suverénní právo států nad GZR na jejich území, ale i odpovědnost za tyto zdroje vůči světovému společenství. Uznává se přínos farmářů pro zachování a využívání GZR a z něj vyplývající práva na podíl z prospěchu plynoucího z využívání GZR (Farmers' Rights). Uchování a využívání GZR je společným předmětem zájmu ochrany životního prostředí, zemědělství a podnikatelské sféry a státy by se měly zasadit o spravedlivé sdílení přínosů z využívání GZR.

Na rozdíl od dokumentu z roku 1983 se nová dohoda vztahuje pouze na „genetické zdroje pro výživu a zemědělství“ a nejsou do ní zahrnuty druhy využívané např. v průmyslu a farmacii. Seznam druhů je taxativně uveden v její příloze (35 druhů a rodů polních a zahradních plodin pro lidskou výživu a vybrané krmné plodiny -15 rodů leguminóz, 12 rodů trav a další dva rody). Dohoda se tedy netýká řady velmi významných plodin a zcela opomíjí tak významné skupiny plodin jako jsou např. technické plodiny nebo léčivé rostliny.

Cílem dohody je zejména zajistit setrvalé využívání GZR a dohoda zavazuje státy k přijetí potřebných politických a legislativních opatření a agrární politiky, která podpoří setrvalé využívání agro-biodiversity a ostatních přírodních zdrojů. Vyzývá též k podpoře výzkumu a šlechtění, pěstování místních odrůd a opomíjených plodin a k rozšíření odrůdové i plodinové diversity. Těmto cílům by se měla přizpůsobit i strategie šlechtění a normy registrace odrůd a distribuce osiv.

Základním posláním dohody je ovšem vytvoření podmínek a předpokladů pro mezinárodní výměnu vzorků GZR a informací o nich a pro spolupráci na úseku GZR obecně. Dohoda je zaměřena především na pomoc rozvojovým zemím a zemím, v nichž probíhají hospodářské reformy na posílení mezinárodních aktivit při práci s GZR, ale i ve šlechtění a semenářství.

Velmi důležitou částí dohody je stanovení podmínek, za kterých signatářské státy v rámci multilaterální dohody poskytují vzorky GZR vyjmenovaných druhů a informace o

těchto GZR. Dohoda zavazuje státy zajistit maximální dostupnost národních kolekcí GZR pro všechny signatáře, pro využití ve výzkumu, šlechtění a vzdělávání. Vzorky GZR by měly být poskytovány bezplatně nebo za mírný poplatek odpovídající nákladům; spolu se vzorky by měla být poskytována pasportní data, resp. i další informace. Uživatelé GZR by si tyto GZR neměli právně присvojovat a měli by zachovat jejich dostupnost pro jiné uživatele v rámci Dohody. Dohoda plně respektuje právní ochranu odrůd a dostupnost je zde možná pouze v rámci rozsahu této ochrany (např. „výjimky pro šlechtitele“ v systému UPOV).

Podíl na prospěchu z využívání GZR by se měl realizovat prostřednictvím poskytování informací, technologií, budováním kapacit a přímým (finančním) podílem na zisku z případné (zprostředkované) komercializace GZR. Strany se zavazují, že poskytnou potřebné informace a zpřístupní technologie pro konzervaci, charakterizaci a hodnocení GZR smluvním partnerům.

Standardní Dohoda o poskytování genetických zdrojů rostlin pro zemědělství a výživu (MTA – Material Transfer Agreement)

Text mezinárodní smlouvy již předpokládá, že poskytování genetických zdrojů uživatelům bude mezi smluvními stranami probíhat na základě uzavřených dohod (MTA). FAO je pověřeno přípravou standardní (modelové) MTA. Teze takové standardní dohody připravila expertní skupina koncem roku 2004 a materiál byl předložen k široké diskusi a připomínkám. Návrh vychází z výše uvedených zásad Mezinárodní smlouvy a má následující strukturu:

- Subjekty dohody (jména, adresy)
- Definice užívaných pojmů
- Vymezení předmětu dohody
- Obecná opatření a ustanovení
- Práva a povinnosti poskytovatele genetických zdrojů
- Práva a povinnosti příjemce genetických zdrojů
- Ostatní náležitosti (související normy, spory, záruky, trvání smlouvy)

Praktická potřeba vedla řadu genových bank k přípravě vlastních MTA, které vycházejí z národních norem a v různé míře reflektují Mezinárodní smlouvu. Zpravidla se předpokládá, že po přijetí standardní Dohody FAO budou dohody národních genových bank patřičným způsobem upraveny. Na stejném principu byla připravena i česká verze modelové Dohody.

Česká verze MTA (*Příloha 1*, její anglický překlad je uveden v *Příloze 2*) vychází ze zákona 148/2003 Sb., § 19, kde se uvádí, že „účastníci Národního programu poskytují vzorky genetických zdrojů, jestliže mají dostatečnou zásobu vzorků... a poskytnutím vzorků neohrozí ani nepoškodí genetický zdroj“. Pro účely šlechtění, výzkumu a vzdělávání je deklarováno bezplatné poskytování vzorků GZR domácím uživatelům, zahraničním uživatelům potom na základě Mezinárodní smlouvy a MTA. Předpokládá se rovněž reciprocita takových služeb. Podrobnosti o velikosti a vlastnostech poskytovaných vzorků genetických zdrojů uvádí vyhláška č. 458/2003 Sb. Dále se vychází ze skutečnosti, že poskytovatel vzorků je majitelem GZR (ten zůstává dále v jeho vlastnictví). U genetických zdrojů, jichž se netýká mezinárodní smlouva ani MTA, je přitom zcela na poskytovateli, zda a za jakých podmínek vzorky poskytne. Dále jsou stanoveny povinnosti příjemce GZR (pouze nekomerční využití, další způsob nakládání, poskytnutí informací dárci atd.). Předpokládá se, že tato verze MTA bude aktualizována po přijetí modelového dokumentu FAO.

Literatura

- FAO (1996): Global Plan of Action for the Conservation and Sustainable Utilization of Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. FAO, Rome, 63 pp.
- FAO (1996): The state of the world's plant genetic resources for food and agriculture. FAO, Rome, 336 p
- FAO (1998): The state of the world's plant genetic resources for food and agriculture. FAO, Rome, 510 p
- FAO, Commission on PGRFA (2001): Financing Treaty Operations and Implementation: A survey of Mechanisms: Background Study Paper No. 13., 14 pp.
- FAO (2002): International Treaty on Plant Genetic resources, 25 pp.
- Gass T., Frese L., Begemann F. and Lipman E. (1999): Implementation of the Global Plan of Action in Europe – Conservation and Sustainable utilization of Plant genetic Resources for food and Agriculture. (Proceedings of the European Symposium, Braunschweig, Germany, (1998), 396 pp.
- Report of the Fifth Meeting of the Conference of the Parties to the Convention on Biological Diversity (2000). UNEP/CBD, 205 pp.
- Secretariat of the Convention on Biological Diversity (1998): Convention on Biological Diversity – Text and Annexes. Montreal, Secretariat of the Convention on Biological Diversity, 34 pp.
- Secretariat of the Convention on Biological Diversity (2000): From Policy to Implementation – Decisions from the Fifth Meeting of the Conference of the Parties to the Convention on Biological Diversity, Nairobi, Kenya, 15-26 May 2000. Montreal, Secretariat of the Convention on Biological Diversity, 138 pp.
- Wood D., Lenné J.M.(1999): Agrobiodiversity – Characterization, Utilization and Management. CABI Publishing: 358-360.
- World Resources 2000 (2001). UNDP, UNEP, World Bank, World Resources Institute. Published by WRI in Canada, 389 pp.

Kontaktní adresy autorů

Ing. Ladislav Dotlačil, CSc., Ing. Zdeněk Stehno, CSc., Mgr. Iva Faberová, Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně
E-mail: dotlacil@vurv.cz, stehno@vurv.cz, faberova@vurv.cz

Příloha 1.

Dohoda o poskytování vzorků genetických zdrojů rostlin pro výživu a zemědělství

(Doporučený model Dohody pro pracoviště Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agrobiodiversity, která poskytují vzorky genetických zdrojů uživatelům)

Název právního subjektu, který poskytuje genetické zdroje, adresa, kontakt, dále jen poskytovatel

uchovává genetické zdroje rostlin v souladu se zákonem č. 148/2003 Sb. a z pověření Ministerstva zemědělství České republiky. Povinností účastníka českého Národního programu konzervace a využití genetických zdrojů rostlin a agrobiodiversity je poskytovat vzorky genetických zdrojů rostlin pro účely šlechtění, výzkumu a vzdělávání, a to domácím i zahraničním uživatelům, za podmínek této dohody a pokud existuje dostatečná zásoba genetického zdroje a jeho poskytnutím nedojde k ohrožení či poškození genetického zdroje. Parametry poskytovaných vzorků genetických zdrojů rostlin a rozsah těchto služeb upravuje vyhláška č. 458/2003 Sb. U zahraničních uživatelů - právnických nebo fyzických osob - platí tato povinnost pouze u těch subjektů a jejich požadavků na poskytnutí vzorků genetických zdrojů rostlin, na které se vztahuje Mezinárodní dohoda o genetických zdrojích rostlin pro zemědělství a výživu.

Posláním této dohody je přispět k uchování genetických zdrojů rostlin, zajistit přístup k těmto zdrojům a jejich setrvalé využívání, při spravedlivém sdílení prospěchu z jejich využívání.

Dostupnost vzorků genetických zdrojů rostlin pro zemědělství a výživu, které jsou v držení poskytovatele, je garantována u následujících kategorií materiálů:

Kategorie 1)

Vzorky genetických zdrojů rostlinných druhů využívaných pro výživu a zemědělství, které jsou uvedeny v Příloze I. Mezinárodní dohody o rostlinných genetických zdrojích pro výživu a zemědělství.

Kategorie 2)

Vzorky genetických zdrojů rostlin, které nejsou uvedeny v Příloze I. Mezinárodní dohody o genetických zdrojích rostlin pro výživu a zemědělství a které:

- Byly buď vyvinuty (vytvořeny, získány jako majetek) v instituci, která nyní tyto genetické zdroje udržuje a nebo byly získány touto institucí dříve, než vstoupila v platnost Úmluva o biologické rozmanitosti a vůči nimž není uplatněna právní ochrana a/nebo není jejich dostupnost jinak omezena (autorem či majitelem takového genetického zdroje- např. požadavkem reciprocit a pod.)
- Byly získány po vstupu Úmluvy o biologické rozmanitosti v platnost, avšak na základě dohody, která umožňuje poskytovat tyto zdroje bez omezení pro potřeby zemědělského (biologického) výzkumu, šlechtění a vzdělávání.

Dostupnost vzorků genetických zdrojů uvedených v kategoriích 1) a 2) je zabezpečována v souladu s ustanoveními uvedené Mezinárodní dohody, jmenovitě článků 12.3 a 13.2d .

Genetické zdroje rostlin, které nepatří do kategorie 1) nebo 2), nebo vůči kterým je uplatněna právní ochrana a/nebo jejichž dostupnost je jinak omezena autorem, poskytovatelem či majitelem takového genetického zdroje, nejsou předmětem této dohody; mohou však být dostupné na základě principu vzájemného poskytování stejných nebo obdobných výhod a/nebo na základě zvláštní dohody.

Při uznání a respektování uvedených povinností, odpovědností a práv poskytovatele umožňuje poskytovatel přístup ke genetickým zdrojům rostlin v jeho kolekcích a v genové bance za dále specifikovaných podmínek:

Příjemce vzorku (ů) genetických zdrojů rostlin tímto souhlasí, že:

- Umožní přístup k poskytovaným vzorkům genetických zdrojů pouze a výhradně pro účely konzervace a využití ve výzkumu, šlechtění a ve vzdělávání, pro potřeby zajištění potravin a pro zemědělství.
- Neuplatní na poskytnuté genetické zdroje rostlin žádnou formu ochrany intelektuálního vlastnictví či jiná práva, která by mohla omezovat snadnou dostupnost genetických zdrojů rostlin pro výživu a zemědělství, nebo jejich genetických částí nebo složek, které obdržel na základě této smlouvy.
- Zajistí, aby všechny další (třetí) osoby a/nebo instituce, kterým příjemce vzorku genetických zdrojů tyto zdroje dále zpřístupní, garantovali u předaných genetických zdrojů a/nebo materiálů, které z nich byly přímo a podstatnou měrou odvozeny, že tato další (třetí) osoba bude vázána stejnými ustanoveními jako v této dohodě a zaručí se přenést stejnou povinnost na případné následné příjemce.
- Pokud budou získané vzorky genetických zdrojů nebo jejich částí či komponent příjemcem dále hodnoceny a charakterizovány a budou získány údaje o jejich vlastnostech, zavazuje se příjemce tyto údaje předat poskytovateli. Pokud o to příjemce požádá, jím poskytnuté údaje mohou být k dispozici veřejnosti až po ochranné lhůtě tří let od jejich předání.
- Budou-li výsledky z využití poskytnutých vzorků genetických zdrojů nebo jejich částí či komponent publikovány, příjemce (uživatel) vzorků genetických zdrojů se zavazuje uznat a uvést poskytovatele využitých genetických zdrojů a zaslat kopii takové publikace poskytovateli.
- V případě, že výsledkem výzkumného či šlechtitelského využití poskytnutých vzorků genetických zdrojů bude materiál (např. odrůda), na který bude uplatněna právní ochrana, příjemce vzorků genetických zdrojů se zavazuje uvědomit o tom poskytovatele a předat mu kopie dokumentů zakládajících tuto právní ochranu.
- Příjemce vzorků genetických zdrojů rostlin bere na sebe plnou odpovědnost, že přenos vzorků vyhoví všem národním předpisům v oblasti karantény a biologické bezpečnosti a pravidlům uplatňovaným v zemi příjemce pro import a/nebo uvolnění genetických materiálů rostlin pro pěstování.

Zdravotní stav vzorku genetického zdroje je zaručen pouze tehdy a v takovém rozsahu, jak je uvedeno ve fyto-sanitárním osvědčení, pokud je k poskytovaným vzorkům genetických zdrojů přiloženo. Poskytovatel nedává záruky za přesnost a správnost pasportních či jiných údajů poskytovaných spolu se vzorkem genetického zdroje. Nedává rovněž záruky za bezpečnost, kvalitu, životnost nebo čistotu (genetickou a/nebo mechanickou) poskytnutých vzorků genetických zdrojů.

V případě smluvních sporů vzniklých v rámci této dohody může být kteroukoliv smluvní stranou dohody vyžádáno rozhodčí řízení.

Vzorky dále uvedených genetických zdrojů rostlin jsou poskytovány podmíněně, za předpokladu, že příjemce souhlasí s podmínkami této smlouvy. Převzetím dále uvedených vzorků genetických zdrojů rostlin příjemcem vstupuje tato dohoda v platnost za výše uvedených podmínek. Pokud příjemce nesplní výše uvedené podmínky, může poskytovatel odepřít takovému příjemci poskytování dalších vzorků genetických zdrojů.

Seznam poskytovaných vzorků genetických zdrojů rostlin (v případě nedostatku místa použijte přílohu):

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Poskytovatel žádá zájemce o vzorky genetických zdrojů o vyplnění a podpis této dohody statutárním zástupcem příjemce (ústav, společnost nebo fyzická osoba) a její navrácení poskytovateli.

Název (jméno) příjemce vzorku (ů) genetických zdrojů:

.....

Úplná adresa (místo, ulice, číslo, PSČ, popř. telefon, fax , e-mail)

.....

.....

Zmocněná osoba příjemce:

.....

Jméno, příjmení a titul

.....

Postavení (funkce)

V dne

Zmocněná osoba poskytovatele:

.....

Jméno, příjmení a titul

.....

Postavení (funkce)

V dne

Příloha 2.

Material Transfer Agreement for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture

(Recommended MTA model for institutions involved in the “National Programme on Plant Genetic Resources and Agro-biodiversity Conservation and Utilization” in the Czech Republic – providers of plant genetic resources)

Name of the legal subject providing the genetic resources, its address, contact, hereinafter “the provider”

keeps plant genetic resources (PGR) in accordance with the Law No. 148/2003 and under mandate of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic. Participant of the National Programme on Plant Genetic Resources and Agro-biodiversity Conservation and Utilisation is obliged to provide samples of PGR for purposes of breeding, research and education to domestic and foreign users. Samples of PGR are provided under conditions of this agreement, if there is a sufficient stock and if sampling will not endanger or damage the genetic resource. Parameters of the provided samples of PGR and extent of services are regulated by the Decree No. 458/2003. In case of foreign users (legal or natural persons) the obligation mentioned above is applied only to subjects and their requirements for providing the samples covered by the International Treaty on Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. Mission of this agreement is to contribute to conservation of plant genetic resources, to ensure access to these resources and their sustainable utilisation under fair benefit sharing coming from their utilisation.

Availability of samples of plant genetic resources for food and agriculture kept by the provider is guaranteed for the following categories of material:

Category 1)

Samples of plant genetic resources utilised for food and agriculture listed in Annex 1 of the International Treaty on Plant Genetic Resources for Food and Agriculture.

Category 2)

Samples of plant genetic resources utilised for food and agriculture not listed in Annex 1 of the International Treaty on Plant Genetic Resources for Food and Agriculture and that were:

- either developed (produced, obtained as a property) in the institution that presently maintains these genetic resources or which were obtained by this institution before the Convention on Biodiversity had entered into force and to which no legal protection is applied and/or their availability is not limited in other way (by an author or owner of the genetic resource – e.g. requirement of reciprocity etc.)
- or obtained after the Convention on Biodiversity entered into force, however on the base of agreement that enables to provide such genetic resources for agricultural (biological) research, breeding and education without any restrictions.

Availability of PGR samples mentioned in the categories 1) and 2) is guaranteed in accordance with provisions of the International Treaty, namely articles 12.3 and 13.2d.

Plant genetic resources not included in the categories 1) or 2) or to which legal protection is applied and/or their availability is limited by an author, provider or owner of such genetic resource, are not subject of this agreement. Nevertheless, they can be made available on basis of mutual providing of the same or similar advantages and/or on basis of a special agreement.

At recognition and respect for the given liabilities, responsibilities and his rights, the provider enables access to plant genetic resources in his collections and in a gene bank under the following conditions:

Recipient of plant genetic resources sample(s) agrees herewith that:

- He will enable access to samples of genetic resources exclusively for their conservation and utilisation in research, breeding and education with the aim to ensure food production and agriculture.
- He will not apply on provided plant genetic resources any form of intellectual property rights or other rights that could restrict an easy availability of plant genetic resources for food and agriculture or their genetic segments or components that he obtained on basis of this agreement.
- He will ensure that all further (third) persons and/or institutions to that the recipient of PGR makes them available will guarantee for provided genetic resources and/or materials that were directly and essentially derived from them, that this further (third) person will be bound by the same provisions as in this agreement and guarantee to transfer the same obligation to possible subsequent recipients.
- If the obtained samples of genetic resources or their segments or components will be evaluated and characterised by the recipient and any data on their properties will be obtained, the recipient undertakes to provide the data to the sample provider. Upon request of the recipient the data arising from the evaluation of PGR can be made publicly available only after a three year's period from delivery.
- If the results of the exploitation of provided samples of PGR or their segments or components are published, the recipient (user) undertakes to recognise and quote provider of used genetic resources in the publication and send a copy of it to the provider.
- In case, that result of utilisation of provided PGR samples in research or breeding is material (e.g. cultivar) on which legal protection is applied, the recipient of PGR samples undertakes to inform the provider and send him copies of documents constituting such legal protection.
- The recipient of PGR samples is fully responsible, that transfer of samples will comply with national rules concerning quarantine and biosafety and import regulations in recipient's country and/or for releasing plant genetic resources for cultivation.

Phytosanitary state of provided PGR sample(s) is guaranteed only in such extent as specified in Phytosanitary Certificate and only when its copy is enclosed. Provider accepts no liability for accuracy and correctness of any passport or other data provided along with a PGR sample(s). He also does not guarantee safety, quality, viability and purity (genetic and/or mechanical) of provided PGR samples.

In case of disputes occurred within the frame of the agreement, a party of the agreement can require arbitration.

The samples of plant genetic resources listed bellow are provided conditionally, upon recipients' acceptance of the agreement. This agreement enters into force under conditions mentioned above after the PGR samples have been taken over by the recipient.

If the conditions mentioned above are not met by the recipient, provider may refuse future services to this recipient.

List of provided samples of genetic resources (in case lack of space, please use an enclosure)

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

The provider asks the requesting party to fill in and sign this agreement by a statutory representative and return it to provider.

Name of the recipient of the sample(s) of plant genetic resources:

.....

Full address (place, street, number, postal code, phone, e-mail)

.....
.....

Representative of the recipient:

.....
First name, surname, title

.....
Position

In

Date.....

Representative of the provider:

.....
First name, surname, title

.....
Position

In

Date.....

Společnost Lineq se specializuje na prodej a servis v oblasti kryogenních aplikací.



Lineq nabízí:

- Dewarovy nádoby Taylor-Wharton HARSCO
- různé vestavby a příslušenství k dewarovým nádobám
- programovatelné zamrazovače Sy-Lab
- projekci, realizaci a údržbu kryobank
- transport vzorků v tekutém dusíku (LIN) nebo jeho parách
- zapůjčení Dewarových nádob
- skladování vzorků v LIN nebo jeho parách
- zálohování vzorků při poruchách
- monitorování Dewarových nádob a prostoru kryoskladu

Lineq, s.r.o.
V Horce 178
252 28 Černošice

tel./fax: +420 2 5164 2390
mobil +420 602 311 893
e-mail: lineq@lineq.cz