

TECHNOLOGIE PŘÍPRAVY BEZVIROVÉ SADBY BRAMBORU S VYUŽITÍM KLASICKÝCH BIOTECHNOLOGICKÝCH POSTUPŮ A MOŽNOSTI AUTONOMNÍ TKÁŇOVÉ KULTURY

TECHNOLOGY OF VIRUS-FREE SEED POTATO PREPARATION USING CONVENTIONAL BIOTECHNOLOGICAL PROCEDURES AND AN AUTONOMOUS TISSUE CULTURE

Vendulka HORÁČKOVÁ¹, Friederike von RUNDSTEDT², Danijela RISTIC-DURRANT³,
Jaroslava DOMKÁŘOVÁ¹, Alena KRPÁLKOVÁ¹, Jaroslav ČEPL¹

¹Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s.r.o.,

²Bock Bio Science GmbH, Německo

³Univerzita Brémy – Ústav automatizace, Německo

HORÁČKOVÁ, V. – von RUNDSTEDT, F. – RISTIC-DURRANT, D. – DOMKÁŘOVÁ, J. –
KRPÁLKOVÁ, A. – ČEPL, J.

TECHNOLOGIE PŘÍPRAVY BEZVIROVÉ SADBY BRAMBORU S VYUŽITÍM KLASICKÝCH BIOTECHNOLOGICKÝCH POSTUPŮ A AUTONOMNÍ TKÁŇOVÉ KULTURY

Vědecké práce – Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, 2023, 29: 37–48

Popsána byla technologie a praktická aplikace biotechnologických a virologických metod a postupů mikropropagace bramboru, včetně aktivní eliminace virové infekce a metody pro dlouhodobé uchování výchozího bezvirového materiálu pro množení sadby. Byla porovnána klasická technika sériového sterilního množení v kultuře *in vitro*, prováděného manuálním pasážováním segmentů stonků pomocí skalpelu, s technikou bezdotykového autonomního množení *in vitro*, která využívá k pasážování laserového paprsku. Na základě srovnávacího „grow out“ testu s pěti odrůdami bramboru bylo konstatováno, že proces robotického pasážování rostlin pomocí laseru umožňuje připravit *in vitro* materiál srovnatelné kvality s klasickým pasážováním pomocí skalpelu.

tkáňové kultury; *Solanum tuberosum* L.; eliminace virové infekce; technologie množení *in vitro*; klasické pasážování; autonomní pasážování

ÚVOD

V klimatických podmínkách České republiky ovlivňuje dosažení nejvyšších stupňů množení sadby bramboru výskyt virových chorob a rychlé zamořování výsadeb. Předkládaná technologie je založena na praktické aplikaci biotechnologických a virologických metod a postupů při přípravě bezvirového výchozího rostlinného materiálu a jeho následného sériového množení v tkáňové kultuře. Využití tkáňové kultury bylo základem při přechodu od klasického polního klonového udržování odrůd k bezvirovému udržovacímu šlechtění a množení ve sterilních laboratorních podmínkách.

Mikropropagace je u bramboru vysoce efektivní postup, jak z pohledu zdravotního stavu, tak rychlosti namnožení značného množství materiálu v definovaném prostředí, při minimálních prostorových nárocích. Metoda snižuje náklady na udržení zdravotního stavu a stala se nedílnou součástí množitelského a šlechtitelského procesu. Spolu se systémem kontroly zdravotního stavu diagnostickou metodou ELISA umožňuje zkrácení cyklu udržovacího šlechtění a množení sadby bramboru minimálně o dva až tři roky. Výsledkem využívání tohoto postupu je produkce vysoce kvalitní, certifikované sadby bramboru (DĚDIČ *et al.*, 2004; HORÁČKOVÁ *et al.*, 2008).

Předložená práce je určena pro šlechtitele a množitele bramboru a využitelná je rovněž ve výzkumu. Zpracován je postup, při kterém je pro sériové množení bramboru *in vitro* využíváno klasické pasážování rostlin skalpelem (S) a uvedeny jsou poznatky a možnosti autonomního množení rostlin pomocí laserového paprsku (L).

MATERIÁL A METODY

1. Postupy předcházející množení bezvirového materiálu bramboru v kultuře *in vitro*

Před zahájením bezvirového množení je nezbytné provést soubor na sebe navazujícími laboratorními kroky a testování bramboru pomocí tkáňové kultury. Jejich výsledkem je vytvoření bezvirových kolekcí klonů v kultuře *in vitro* a následné uložení ve sterilních podmínkách dlouhodobé kultivace. Uchovávané klony jsou základním výchozím materiálem pro sériové množení v dalších letech. Na použité biotechnologické postupy navazují diagnostické laboratorní metody testování zdravotního stavu v kultuře *in vitro*. Je proto nutné, aby vedle biotechnologické laboratoře precizně fungovala virologická a bakteriologická diagnostika (HORÁČKOVÁ a DĚDIČ, 2009; HORÁČKOVÁ a DOMKÁŘOVÁ, 2012).

Během celého procesu bezvirového množení je ke kultivaci rostlin používáno základní živné médium, označované MS 62, podle Murashige & Skoog (1962), komerčně připravené, s přísadkou 30 g sacharózy a 8 g agaru, pH upravené na 5,6–5,8. Vysterilizované médium se dává po 50 ml do jednorázových kultivačních plastových dóz.

1.1 Založení tkáňové kultury

Prvním krokem technologie je založení sterilní *in vitro* kultury. K tomu je potřebný kvalitní zdrojový materiál, který musí typově odpovídat převáděnému genotypu. Jako převodový materiál se nejčastěji využívají klíčky z rašících hlíz, nebo stonkové segmenty. Doporučuje se před převodem do *in vitro* otestování zdrojových materiálů na přítomnost karanténních bakterií bramboru *Cs* (*Clavibacter sepedonicus*) a *Rs* (*Ralstonia solanacearum*) (PÁNKOVÁ a KREJZAR, 2015).

Převodové segmenty se v prostředí laminárního boxu povrchově dezinfikují etanolem a chloraminem, skalpelem upraví a pinzetou vloží na živná média do zkumavek. K odstranění doprovodných kontaminací jsou při převodu každého vzorku využita minimálně tři základní živná média obohacená o antibakteriální přípravky, zejména ATB. Pro poslední dvě pasáže je médium doplněno vždy o antibiotikum Vankomycin, které eliminuje případný výskyt karanténních bakterií *Cs* a *Rs* (HORÁČKOVÁ *et al.*, 2018). Nekontaminovaná tkáňová kultura je obvykle získána po třech až čtyřech měsících. Rostliny jednotlivě napasážívané do zkumavek na množící médium se přesně označí a umístí do kultivační místnosti s fotoperiodou 16 hod. světlo, 8 hod. tma, s teplotou 20 °C a intenzitou osvětlení 60 μmol/m². s. Následuje vstupní otestování jednotlivých *in vitro* rostlin na přítomnost šesti hospodářsky významných virů, které se běžně vyskytují v porostech bramboru, a to viru svinutky bramboru (PLRV), viru Y (PVY), viru A (PVA), viru S (PVS), viru X (PVX) a viru M (PVM). V případě pozitivního nálezu je zahájeno aktivní ozdravování technikami *in vitro* (HORÁČKOVÁ *et al.*, 2007).

1.2 Ozdravování od virové infekce technikami *in vitro* a testování zdravotního stavu

Eliminovatelnost jednotlivých virů je závislá na tom, do jaké vzdálenosti od terminálních buněk v rostlině vystupují. Nejnižší hladinu má virus A bramboru (PVA), o něco vyšší je u viru Y (PVY) a svinutky (PLRV). Virus X (PVX) a virus M (PVM) vystupují ve vegetacím vrcholu vysoko a zóna bez virů je velmi malá. Nejvýše vystupuje virus S (PVS), který se často dostává přímo do buněk meristematického vrcholu.

S ohledem na konkrétní virus je při ozdravování v kultuře *in vitro* využíváno několika postupů. U viru A (PVA), viru Y (PVY) a svinutky (PLRV) se uplatňuje klasická metoda, spočívající v odběru vrcholových meristémů po termoterapii. Termoterapie ovlivňuje multiplikaci a translokaci virů a vede ke zvětšení viruprosté zóny ve vrcholových pletivech. Rostliny *in vitro* jsou ovlivňovány teplotou 37 °C po dobu 6 týdnů. Následně se provádí pod preparačním stereomikroskopem vyjmutí apikálních meristémů z vrcholu stonků, nebo z úžlabních pupenů listů. Obvykle se odebírají tři vrcholky z jedné rostlinky, o velikosti v rozmezí 0,5–1 mm, tvořené apikálním vrcholem se dvěma až třemi listovými základy a zbytky krycích šupin. Ke kultivaci izolovaných meristémů je požíváno médium MS 62 s vitamíny podle Gamborga B 5 a s biologicky aktivními látkami, které stimulují diferenciaci stonku a tvorbu kořenů (auxin, cytokinin, giberelin). Na dosažení jednoho zdravého

klonu je nutný odběr v průměru 40 vrcholků, s následnou 50% úspěšností růstu. Regenerace odebraných segmentů do rostlinek schopných dalšího pasážování (výška cca 4 cm) trvá, v závislosti na ozdravovaném genotypu, tři až čtyři měsíce.

Speciální přístup je třeba volit u viru S (PVS), kde je možnost jeho odstranění klasickým postupem minimální.

Virus S bramboru (PVS), na rozdíl od zahraničí, nepatřil v České republice mezi viry povinně kontrolované při certifikaci sadby. To bylo u nás zavedeno v posklizňových zkouškách zdravotního stavu základních rozmnožovacích stupňů sadby vyhláškou, s účinností od roku 2006. Dlouhodobá tolerance tohoto latentního, bezpříznakového viru vedla k jeho značnému a přetrvávajícímu rozšíření v porostech bramboru. Virus S (PVS) náleží k neobtěžněji odstranitelným virům, neboť v rostlině vystupuje až do buněk meristematického vrcholu a zóna bez virů je velmi malá. Ve VÚB by rozpracován postup eliminace viru S pomocí chemoterapie *in vitro*, který je založen na aplikaci preparátu s virostatickým účinkem. Po provedení řady experimentů se nejlépe osvědčil přípravek Ribavirin, syntetický ribosid, který inhibuje replikaci viru a výrazně zpomaluje jeho systémové šíření v rostlině. Postup je založen na opakovaném pasážování rostlin na agarové živné médium doplněné o chemoterapeutikum, a to třikrát v šestitýdenních intervalech, vždy naráz po deseti rostlinách v jedné kultivační dóze. Terapeutický účinek Ribavirinu je velmi vysoký, pohybuje se mezi 90 až 100 % (HORÁČKOVÁ, 2008).

V případě potřeby je možné k ozdravování využít i kryoterapii. Metodou působení ultrazvukové teploty lze s úspěchem eliminovat viry PVY a PLRV, virus PVS nelze kryoterapií odstranit (FALTUS *et al.*, 2012).

Jestliže je v ozdravovaném materiálu zjištěna smíšená infekce více viry, využije se kombinace dostupných postupů ozdravování. Po ukončení fáze aktivního ozdravování je vždy provedeno otestování zdravotního stavu sérologickou imunoenzymatickou metodou ELISA. Nejprve přímo z rostlin *in vitro* a u detekovaných zdravých klonů následuje otestování z rostlin *in vivo*, po výsadbě ve skleníku. Zhodnocena je přítomnost všech běžných virů bramboru (PVS, PVM, PVX, PVA, PVY a PLRV). Rostliny s potvrzeným bezvirovým zdravotním stavem se přesně klonově označí, rozmnoží a využijí k uložení do dlouhodobé kultivace. Časový interval od založení tkáňové kultury po dosažení ozdravených klonů se, v závislosti na eliminovaných virech, pohybuje obvykle mezi 10 až 14 měsíci, při souběžné infekci více viry je i delší (HORÁČKOVÁ a DĚDIČ, 2009; HORÁČKOVÁ a DOMKÁŘOVÁ, 2012).

Před uložením zdravých klonů do udržovací kolekce v *in vitro* kultuře je možné do systému vložit kontrolu přítomnosti karanténních patogenů Cs a Rs, aby bylo zabráněno vertikálnímu šíření patogenu při množení pasážováním *in vitro*. Klony jsou otestovány přímo z ukládané tkáňové kultury a diagnóza je prováděna imunofluorescenčním testem PP3. Pracovní postup vychází z aktuálního provozního řádu ÚKZÚZ. Testování zajišťuje Akreditovaná laboratoř LC ve VÚB Havlíčkův Brod.

1.3 Založení kultury pro dlouhodobou kultivaci a regenerační pasáže

Získaný sterilní bezvirový materiál je třeba uchovat, aby sloužil jako opakovaný zdroj pro sériové množení *in vitro* v dalších letech. Všechny požadavky na spolehlivé dlouhodobé uchovávání kultur splňuje systém, který spočívá ve vytvoření podmínek pro tuberizaci, tedy vyvolání tvorby mikrohlízek v prostředí *in vitro*. K indukci tuberizace dochází působením několika faktorů stresové povahy v průběhu kultivace. Jsou to především úprava živného média, kdy se jako stimulační impuls tuberizace používá především zvýšený obsah sacharózy, případně doplněný retardantem růstu. Na zpomalení růstu působí rovněž změny ve fyzikálních podmínkách během kultivace, a to nižší teplota, zkrácená fotoperioda a snížená intenzita osvětlení. K založení kultury pro dlouhodobou kultivaci se využijí vyvíjející se rostliny ve výšce cca 4 cm, které se přenesou do kultivačních prostor s teplotou sníženou na 10 °C, fotoperiodou 10 hod. světlo, 14 hod. tma, s intenzitou osvětlení 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Po 4–6 měsících kultivace začnou rostliny nasazovat mikrohlízky, následuje 4–5 měsíců trvající fáze, kdy pozvolna zasychá stonk a mikrohlízky jsou ve stavu dormance. Poté začnou mikrohlízky rašit, objeví se výhonky, obvykle zůstávají ve zkumavkách i vegetující zbytky stonků. Celková délka kultivačního cyklu je obvykle 14–18 měsíců. Poté je třeba provést regenerační pasáž. Je tvořena jednou až dvěma subkultivacemi na základním médiu, s následnou pasáží na média pro dlouhodobou kultivaci *in vitro*. Cyklus se pravidelně opakuje, tak aby se bezvirové klony zachovaly pro další použití.

2. Techniky množení bezvirového materiálu bramboru v kultuře *in vitro*

2.1 Sériové množení bramboru *in vitro* klasickým řezáním pomocí skalpelu (S)

Z kultur uložených v dlouhodobém udržování se odeberou zachovalé tkáně, a to zejména mikrohlízky, nebo jejich výhony, případně zelené zbytky původních rostlin. Jsou přeneseny na základní živné agarové médium a je zahájena příprava výchozích rostlin *in vitro* pro množení.

Sériové množení rostlin *in vitro* je dosud u nás rutinně prováděno manuálním pasážováním ve flowboxu, kdy segmenty jsou klasicky řezány pomocí skalpelu. Tento způsob množení využívají k produkci bezvirové sadby bramboru všechna pracoviště v České republice, která se zabývají šlechtitelskou a množitelkou činností.

Klasické manuální pasážování skalpelem je prováděno ve sterilním prostředí flowboxu, používané nářadí (pinzety, skalpely) jsou sterilizovány v horkovzdušném sterilizátoru při teplotě 180 °C po dobu 1,5 hod., nebo s využitím Glass Bead Sterilizeru. Z jedné rostliny jsou připraveny obvykle 3 až 4 stonkové segmenty o velikosti 15–20 mm s jedním nodem. Zasazeny jsou po 15 do plastových kultivačních nádob s agarovým médiem. Interval mezi

jednotlivými pasážemi je, v závislosti na genotypu, dva až čtyři týdny. K pěstování je využíván klimatizovaný kultivační prostor s fotoperiodou 16 hod. světlo, 8 hod. tma, s teplotou 20 °C a intenzitou osvětlení 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

2.2 Sériové množení bramboru *in vitro* autonomním systémem a řezáním rostlin pomocí laserového paprsku (L)

Problematikou sériového množení bramboru v tkáňové kultuře za využití robotizace se zabývalo výzkumné řešení, které probíhalo ve VÚB Havlíčkův Brod. Jednalo se o projekt mezinárodní spolupráce ve výzkumu a vývoji, vyhlášený MŠMT v rámci 11. výzvy Eurostars – 2, pod názvem „Autonomní rostlinné tkáňové kultury“ (Autonomous Plant Tissue Culture). Akronym projektu je AUTOPTC. Řešení probíhalo v období od 10/2019 do 10/2022. Hlavním řešitelem projektu byla firma Bock Bio Science GmbH (BBS), Německo, partnery byly Výzkumný ústav bramborařský Havlíčkův Brod, s.r.o. (VÚB) a Univerzita Brémy – Ústav automatizace (IAT), Německo (HORÁČKOVÁ *et al.*, 2021).

Jedním z cílů řešení tohoto mezinárodního výzkumného projektu bylo zkonstruování prototypu přístroje pro autonomní množení bramboru a drobného ovoce. Zařízení bylo vyrobeno v Německu, za vzájemné spolupráce spoluřešitelských pracovišť, a představuje kombinaci robotiky, podporované softwarem umělé inteligence, a laserového řezání rostlin *in vitro*. Robotizace je u těchto druhů plodin možná, neboť se množí vegetativním způsobem a lze u nich k rozmnožování využívat *in vitro* prostředí.

K vývoji přístroje byly využívány ve VÚB namnožené soubory *in vitro* rostlin, které byly postupně dopravovány do BBS. Na rozpracování nové technologie byly vybrány odrůdy vyšlechtěné ve VÚB a jejich zdrojem byla kolekce Genové banky bramboru *in vitro* udržovaná ve VÚB (DOMKÁŘOVÁ a HORÁČKOVÁ, 2013). Odrůdy reagovaly pozitivně na kultivaci v tkáňové kultuře. Na univerzitním pracovišti IAT bylo pořízeno více než 12 000 obrázků jednotlivých kroků množení a tyto kamerou nasnímané lidské zkušenosti byly použity k navržení prototypu robota. Prototyp sestává ze tří robotických paží, laserového kráječe a nového AI softwaru, pro vizuálně orientované autonomní řízkování rostlin a jejich sázení do dóz se sterilním živným médiem. Robotická paže autonomně vyjme rostlinky z kultivační dózy, deep-learningový systém prostuduje strukturu uchopené rostliny a autonomně určí optimální linii řezu. Uchopená rostlinka je dána do pozice pro laserové řízkování podél definované linie a nařízkované části jsou autonomně umístěny do nových kultivačních dóz. Systém zachovává kvalitu a správnou orientaci při ukládání explantátu na agar. Vše probíhá ve zcela sterilním prostředí výrobního boxu. Tři robotické paže v jednotce budou zvyšovat efektivitu systému tím, že dvě rostlinky budou zkoumány a řízkovány v jedné sekvenci, zatímco ve stejné době třetí paže bude vkládat nařízkované rostliny do nových dóz.

2.3 Průběh kultivace *in vitro* a převod do *in vivo*

Obě uvedené metody sériového množení pokračují dále shodným postupem. Vyvinuté, zakořeněné rostlinky finální pasáže jsou převáděny do *in vivo* prostředí přesazením do plastových nebo rašelinových sadbovačů se zahradní zeminou. Uchopí se pinzetou na bázi stonku a vyjmou opatrně z agaru, aby nedošlo k narušení kořínků. Umístí se do uzavřeného skleníku a v prvním týdnu po přesadbě se rostlinky zastíňují a zalévají jemným mlžením. Po zakořenění, ve výšce 10 až 15 cm proběhne přesadba do venkovních, izolovaných prostor, aby se zabránilo přístupu přenašečů virových chorob a nedošlo k reinfekci viry. Nejlépe do nevytápěných polykarbonátových hangárů, případně studených skleníků. Za vegetace je nutné výsadbu M1 generace ošetřovat insekticidy a fungicidy a po sklizni provést hodnocení přítomnosti virové infekce pomocí ELISA testu.

2.4. Ověření technologie s využitím pasážování *in vitro* (S) a (L)

V součinnosti zainteresovaných řešitelských pracovišť bylo provedeno ověření a porovnání obou technologií množení ve srovnávacím grow out testu vysazeném ve VÚB. Růstový test byl založen s pěti odrůdami, které pocházejí ze šlechtění VÚB. Pokus byl vysazen podle připraveného schématu, v devíti navazujících krocích a vycházel z dlouhodobě ověřeného postupu, který je v České republice využíván k produkci bezvirové sadby bramboru. Materiál *in vitro* pro experiment byl klasicky namnožen ve VÚB a převezen do laboratoře v Německu, kde byla provedena robotická pasáž laserovým paprskem. Kultury byly po zakořenění převezeny zpět do VÚB. Vysazena byla od každé odrůdy a způsobu pasáže tři opakování po 120 rostlinách. Další kroky, počínaje výsadbou pokusných rostlin, se uskutečnily ve VÚB využitím skleníku a nevytápěného polykarbonátového izolátoru. Výsadba byla záhonová, v oddělených blocích podle způsobu pasáže a odrůdy.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Na spoluřešitelském pracovišti v Německu bylo provedeno vyhodnocení rozdílu v růstu rostlin *in vitro* mezi materiálem řízkovaným roboticky laserem a skalpelem. Po třech týdnech kultivace bylo provedeno u použitých odrůd kvalitativní hodnocení náhodně odebraných rostlin a nebyly zaznamenány významné rozdíly mezi oběma variantami řízkování. Prýty a kořeny po řízkování skalpelem a laserem měly srovnatelnou velikost a vzhled. Rostliny rostly velmi rychle a všechny vytvořily kořeny. Koeficient množení je mírně lepší u řízkování skalpelem než u řízkování laserem, a to v poměru 3,0 až 3,6 ku 2,7 až 3,3. Statistické hodnocení provedené pomocí bilaterálního testu na hladině významnosti 0,05 neukázalo významný rozdíl mezi počtem nových nodů při řízkování skalpelem a laserem u použitých odrůd bramboru.

Před výsadbou grow out testu proběhlo vizuální hodnocení *in vitro* rostlin u obou variant řízkování a nebyly zjištěny žádné rozdíly ve vzhledu a dynamice růstu rostlin. Po výsadbě do izolátu se během vegetace vzhled a vývoj porostu v grow out testu neprojevil žádnými výraznějšími rozdíly, růst v rámci odrůd byl vyrovnaný a odpovídal typu příslušné odrůdy. Po ukončení vegetace byla pokusná výsadba na začátku října ručně sklizena. Nebyly zaznamenány v hlízovém materiálu žádné odchylky ve tvaru, ani deformity hlíz. Hlízy byly roztříděny do velikostních frakcí (frakce > 5,5 cm, 3,0–5,5 cm, < 3,0 cm) tak, jak je prováděno běžně u sadbových materiálů vypěstovaných v technických izolátorech. Podstatným ukazatelem úspěšnosti a využitelnosti sledovaných postupů pasážování ke komerčnímu množení bezvirové sadby byl počet hlíz sklizených ve frakcích > 55 mm a ve velikostním rozmezí 30–55 mm. Porovnání tohoto parametru u použitých metod množení v modelovém souboru odrůd je uvedeno v Tab. 1 a na Obr. 1 a 2. Při statistickém zhodnocení počtu sklizených hlíz, stejně jako dosažené hmotnosti, nebyl nalezen průkazný rozdíl mezi použitím skalpelu nebo laseru při hladině významnosti 0,05.

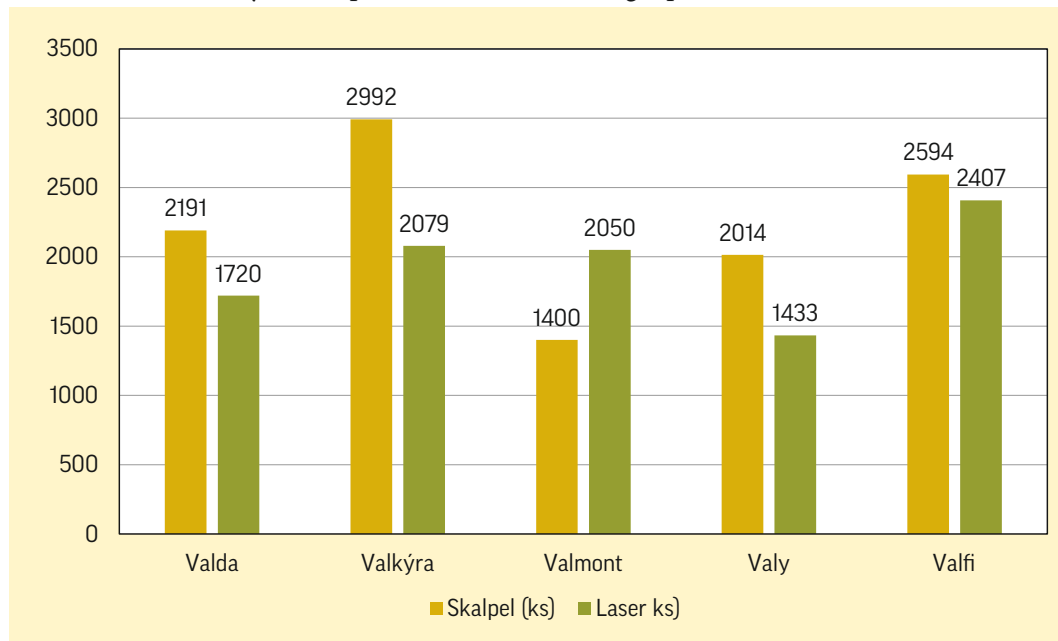
Sklizeň z jednoho trsu se pohybuje v závislosti na pěstovaném genotypu mezi 10 až 15 hlízami, přičemž hlízy sadbové velikosti (frakce 3,0–5,5 cm a frakce nad 5,5 cm) z toho představují obvykle 30 %. Drobnější podsadbové hlízy a minihlízy (frakce pod 3,0 cm) lze použít v následném roce k opětovné výsadbě v izolovaných venkovních prostorách.

První polní výsadbu (generace M2) je třeba prostorově umístit v lokalitě, kde je důsledně dodržována komplexní semenářská agrotechnika a respektovány zásady množitelské praxe. Výsadbou hlíz z této generace se zahajuje proces udržovacího šlechtění, s využitím meristémové tkáňové kultury. Rychlé množení v tkáňové kultuře snižuje náklady na udržení zdravotního stavu a zkracuje cyklus množení nejvyšších stupňů sadby v udržovacím šlechtění minimálně o dva roky.

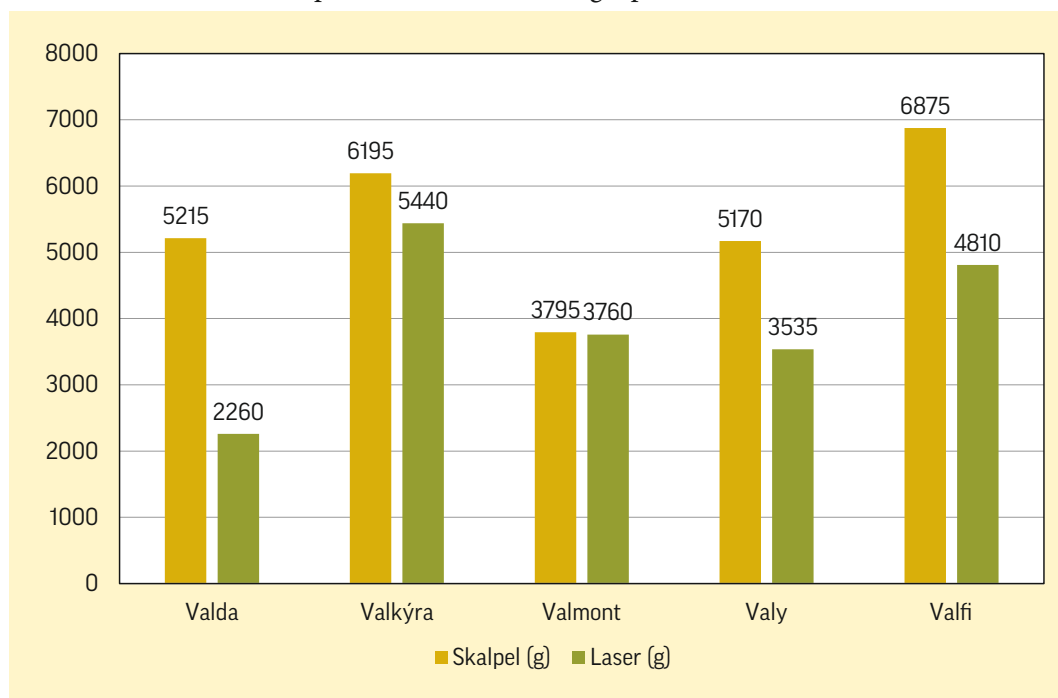
Tab. 1: Porovnání sklizně hlíz u metod množení *in vitro* Skalpel (S) a Laser (L) podle počtu hlíz ve frakcích > 5,5 cm a 5,5–3,0 cm

(S)	Součet frakce > 5,5cm a 5,5–3,0 cm Počet hlíz / Počet v %	Pořadí		(L)	Součet frakce > 5,5cm a 5,5–3,0 cm Počet hlíz / Počet v %	Pořadí	
		Podle počtu hlíz	Podle %			Podle počtu hlíz	Podle %
Valda	1146 / 55,3	4	3	Valda	250/14,5	5	5
Valkýra	1417 / 47,4	2	4	Valkýra	1137 / 54,7	2	1
Valmont	615 / 43,9	5	5	Valmont	730 / 35,6	3	4
Valy	1149 / 57,0	3	2	Valy	713 / 49,8	4	3
Valfi	1585 / 61,1	1	1	Valfi	1251 / 52,0	1	2

Obr. 1: Počet sklizených hlíz podle odrůd a technologie pasážování



Obr. 2: Hmotnost sklizně podle odrůd a technologie pasážování



ZÁVĚR

V publikaci byla popsána komplexní technologie přípravy bezvirové sadby bramboru, využívaná v České republice v novošlechtění a udržovacím šlechtění. Uvedena byla praktická aplikace biotechnologických a virologických metod a postupů v procesu mikropropagace, včetně aktivní eliminace virové infekce a metody pro dlouhodobé uchovávání výchozího bezvirového materiálu pro množení. Byla porovnána klasická technika sériového sterilního množení v kultuře *in vitro*, prováděného manuálním pasážováním segmentů stonků pomocí skalpelu, s technikou bezdotykového autonomního množení *in vitro*, která využívá k pasážování laserového paprsku. Na základě srovnávacího „grow out“ testu s pěti odrůdami lze konstatovat, že proces robotického pasážování rostlin pomocí laseru umožňuje připravit *in vitro* materiál srovnatelné kvality s klasickým pasážováním pomocí skalpelu. Robotické množení zdravé sadby bramboru by bylo ekonomicky efektivní až při velkých objemech pasážovaného materiálu *in vitro*. Před zahájením množení autonomním systémem je třeba mít k dispozici kvalitní výchozí materiál *in vitro*, bez výskytu kontaminací, připravený z dlouhodobě uchovávaných položek klasickým postupem. Toto je významný předpoklad pro to, aby robotické množení bramboru *in vitro* mohlo úspěšně probíhat.

PODĚKOVÁNÍ

Práce vznikla za finanční podpory projektu mezinárodní spolupráce ve výzkumu a vývoji, vyhlášeném MŠMT v rámci 11. výzvy Eurostars – 2, pod názvem „Autonomní rostlinné tkáňové kultury“ (Autonomous Plant Tissue Culture), řešeném v období od 10/2019 do 10/2022. Výsledky byly získány rovněž díky Institucionální podpoře na dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace (DKRV), reg. č. MZE-RO1623 a Národnímu programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agrobiodiverzity č. MZE-62216/2022-13113/6.2.3.

LITERATURA

- DĚDIČ, P. – PTÁČEK, J. – HORÁČKOVÁ, V. (2004): Bezvirové šlechtění bramboru v České republice. *Bramborářství*, 11: 9–13.
- DOMKÁŘOVÁ, J. – HORÁČKOVÁ, V. (2013): Česká banka genetických zdrojů bramboru a její využití ve výzkumu a šlechtění. *Vědecké práce – Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod*, 21: 47–58.
- FALTUS, M. – DĚDIČ, P. – HORÁČKOVÁ, V. (2012): Účinnost metody kryoterapie na eliminaci vybraných virů bramboru. *Vědecké práce – Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod*, 20: 49–60.
- HORÁČKOVÁ, V. (1998): Eliminace viru S bramboru chemoterapií *in vitro* za použití ribavirinu. *Rostlinná výroba*, 44: 539–544.
- HORÁČKOVÁ, V. – DOMKÁŘOVÁ, J. (2007): Ozdravování bramboru od virové infekce technikami *in vitro*. *Úroda*, 55: 54–57.
- HORÁČKOVÁ, V. – DĚDIČ, P. – PTÁČEK, J. (2008): Biotechnologické postupy při produkci bezvirových materiálů v procesu novošlechtění a udržovacího šlechtění bramboru. *Vědecké práce – Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod*, 16: 149–155.
- HORÁČKOVÁ, V. – DĚDIČ, P. (2009): Metodika přípravy bezvirových materiálů bramboru v novošlechtění a udržovacím šlechtění s využitím biotechnologických a virologických postupů. *Certifikovaná metodika. Praktické informace č. 27. Havlíčkův Brod: Výzkumný ústav bramborářský*: 28 s.
- HORÁČKOVÁ, V. – DĚDIČ, P. – FALTUS, M. (2010): Využití tkáňových kultur pro eliminaci virové infekce bramboru. *Vědecké práce – Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod*, 18: 85–96.
- HORÁČKOVÁ, V. – DOMKÁŘOVÁ, J. (2012): Metodika produkce bramboru s barevnou dužninou s využitím biotechnologických a virologických postupů. *Certifikovaná metodika. Praktické informace č. 39. Havlíčkův Brod: Výzkumný ústav bramborářský*: 28 s.
- HORÁČKOVÁ, V. – PÁNKOVÁ, I. – KOPAČKA, V. – KREJZAR, V. – DOMKÁŘOVÁ, J. (2018): Biotechnologické postupy při produkci zdravé sadby bramboru a vícestupňová kontrola bakteriální kroužkovitosti. *Vědecké práce – Výzkumný ústav bramborářský, Havlíčkův Brod*, 24: 37–44.
- HORÁČKOVÁ, V. – von RUNDSTEDT, F. – RISTIC-DURRANT, D. – DOMKÁŘOVÁ, J. – KRPÁLKOVÁ, A. – ČEPL, J. (2021): Využití robotizace při množení brambor v tkáňové kultuře. *Bramborářství*, 29: 1–2.
- MURASHIGE, T. – SKOOG, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473–497.
- PÁNKOVÁ, I. – KREJZAR, V. (2015): Detekce původce kroužkovitosti bramboru, bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, v šlechtitelském a množitelském materiálu. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby. ISBN 978-80-7427-182-3.

HORÁČKOVÁ, V. – von RUNDSTEDT, F. – RISTIC-DURRANT, D. – DOMKÁŘOVÁ, J. – KRPÁLKOVÁ, A. – ČEPI, J.

TECHNOLOGY OF VIRUS-FREE SEED POTATO PREPARATION USING CONVENTIONAL BIOTECHNOLOGICAL PROCEDURES AND AN AUTONOMOUS TISSUE CULTURE

Vědecké práce – Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, 2023, 29: 37–48

The paper describes the technology and practical application of biotechnological and virological methods and procedures for potato micropropagation, incl. active elimination of a viral infection and an approach for long-term storage of initial virus-free material for seed propagation. The conventional technology of mass sterile propagation in the *in vitro* culture, done as manual cutting of stem segments using scalpel, was compared to the contactless autonomous *in vitro* propagation using laser beam for cutting. Based on the comparative “grow out” test with five potato varieties we can conclude that the process of robotic plant cutting using laser enables preparation of *in vitro* material of comparable quality to conventional cutting using scalpel.

tissue cultures; *Solanum tuberosum* L.; viral infection elimination; *in vitro* propagation technology; conventional cutting; autonomous cutting

Kontaktní adresa:

Ing. Vendulka HORÁČKOVÁ, CSc.

Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s.r.o.

Dobrovského 2366

580 01 Havlíčkův Brod

Česká republika

tel.: +420 569 466 220

e-mail: horackova@vubhb.cz