

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra botaniky a fyziologie rostlin



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Otužování explantátů chmele vůči osmotickému stresu
a chladu pro zvýšení jejich kryotolerance**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Petra Šimůnková

Obor studia: Pěstování rostlin – Rostlinná produkce

Vedoucí práce: prof. Ing. Václav Hejnák, Ph.D.

Konzultant: Ing. Miloš Faltus, Ph.D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Otužování explantátů chmele vůči osmotickému stresu a chladu pro zvýšení jejich kryotolerance" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne datum odevzdání

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala prof. Ing. Václavu Hejníkovi, Ph.D. a panu Ing. Miloši Faltusovi, Ph.D. za odborné vedení během psaní diplomové práce, zavádění pokusů a za veškeré konzultace a čas, který mi věnovali, aby tato práce vznikla. Další poděkování patří Chmelařskému institutu s.r.o. v Žatci za poskytnutí materiálu na pokusy. Velké poděkování patří mé rodině, partnerovi a všem přátelům za trpělivost a psychickou podporu během celého mého studia.

Otužování explantátů chmele vůči osmotickému stresu a chladu pro zvýšení jejich kryotolerance

Souhrn

Kryoprezervace je v současné době jednou z nejnovativnějších technik, která umožňuje dlouhodobé uchování genetických zdrojů rostlin. Cílem této práce bylo zjistit vliv otužování osmotickým stresem, chladem a působení obou stresů zároveň na proces kryoprezervace a následnou životaschopnost vzrostných vrcholů chmele otáčivého (*Humulus lupulus* L.) odrůd 'Žatecký poloraný červeňák', Osvaldův klon 72 a 'Gaia'.

Chmelové rostliny byly pěstovány *in vitro* podmínkách na kultivačním médiu Murashige & Skoog (1962) se sníženým obsahem dusíku bez fytohormonů, v aseptických podmínkách kultivačních boxů. V práci se testoval vliv působení chladu při teplotě 5 °C a osmotického stresu, který byl navozen 0,7 M roztokem sacharózy před procesem kryoprezervace, nebo obou faktorů. Před samotnou kryoprezervací byly otužené a kontrolní rostliny vystaveny dehydrataci nad silikagelem. Dehydratované vzrostné vrcholy byly umístěny na hliníkové plíšky a zamrazeny přímým ponořením do kapalného dusíku, kde byly ponechány 60 minut a následně odtátny přímým ponořením do sterilní destilované vody ohřáté na teplotu 40 °C a pak vysazeny na regenerační medium s obsahem fytohormonů.

Životaschopnost vzrostných vrcholů byla hodnocena dva týdny po nasazení vrcholů na regenerační médium. Nejvyšší životaschopnost po kryokonzervaci vykazovala varianta otužená chladem u odrůdy 'Žateckého poloraného červeňáku', a to 83,3 % a následně varianta vystavená obou stresů zároveň, a to 73,3 %. Pomocí diferenční skenovací kalorimetrie byly sledovány charakteristiky vzrostných vrcholů chmele před dehydratací a po dehydrataci, dále byl sledován obsah vody vzorků a vypočítán podíl zmrzlé vody. Nejvyšší obsah zmrzlé vody byl zjištěn při ohřevu u kontrolních, neotužených rostlin odrůda 'Gaia' (52,7 %). Další variantou s vysokým obsahem zmrzlé vody byla varianta otužená společným působením nízké teploty a sacharózy před dehydratací nad silikagelem u odrůdy 'Žateckého poloraného červeňáku' ve výši 47,9 %. Z dehydratovaných variant byl zjištěn nejvyšší obsah zmrzlé vody u varianty kontrolních rostlin odrůdy 'Žateckého poloraného červeňáku' po dehydrataci nad silikagelem, a to 14,4 %. Dehydratované vzorky otužené varianty společným působením nízké teploty a sacharózy měly podíl krystalické vody 5,5 %, což představuje úbytek vody 42,4 % (přežití 73,3 %). Z výsledků vyplývá, že otužování stresem nízké teploty nebo osmotickým působením významně mění termické charakteristiky vzrostných vrcholů odrůd chmele a životaschopnost po kryoprezervaci.

Klíčová slova: Dehydratace; *Humulus lupulus* L., kryoprezervace; *in vitro*; mrazuvzdornost; odolnost vůči osmotickému stresu

Acclimatization of hop explants against osmotic stress and low temperature to increase their cryotolerance

Summary

Cryopreservation is currently one of the most innovative techniques for the long-term conservation of plant genetic resources. The aim of this study was to investigate the effect of hardening by osmotic stress, cold stress and the effect of their simultaneous use on the process of cryopreservation and subsequent viability of the growing shoot tips of hop (*Humulus lupulus* L.) cultivars 'Žatecký poloraný červeňák', Osvaldův klon 72 and 'Gaia'.

Hop plants were grown under *in vitro* conditions on Murashige & Skoog (1962) reduced nitrogen culture medium without phytohormones, in aseptic conditions of the culture boxes. The effect of cold treatment at 5 °C and osmotic stress induced by a 0.7 M sucrose solution prior to the cryopreservation process, or both factors, was tested. Prior to cryopreservation, hardy and control plants were subjected to dehydration over silica gel. The dehydrated shoot tips were placed on aluminum plates and were then directly immersed in liquid nitrogen, where they were left for 60 min. Thereafter, they were thawed by direct immersion in sterile distilled water at 40 °C and then placed on a regrowth medium containing phytohormones.

The viability of the growing shoot tips was assessed two weeks after being placed on the regrowth medium. The highest viability after cryopreservation was shown by the cold hardened variant of 'Žatecký poloraný červeňák', 83.3 %, followed by the variant exposed to both stresses simultaneously, 73.3 %. Using differential scanning calorimetry, the characteristics of the hop shoot tips before and after dehydration were monitored, the water content of the samples was also monitored and the proportion of frozen water was calculated. The highest frozen water content was found during heating in the control, nonhardened plants of the cultivar 'Gaia' (52.7 %). Another variant with a high frozen water content was the variant hardened by the combined action of low temperature and sucrose before dehydration over silica gel in the cultivar 'Žatecký poloraný červeňák' at 47.9 %. Of the dehydrated variants, the highest frozen water content of the control plants of the 'Žatecký poloraný červeňák' variant after dehydration over silica gel was found to be 14.4 %. The dehydrated samples of the hardened variant by the combined action of low temperature and sucrose had a crystal water content of 5.5 %, which represents a water loss of 42.4 % (survival 73.3 %). The results indicate that hardening by low temperature stress or the osmotic agent significantly alters the thermal characteristics of the hop varieties' peaks and viability after cryopreservation.

Keywords: Dehydration; *Humulus lupulus* L.; cryopreservation; *in vitro*; frost resistance; resistance to osmotic stress

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Vědecká hypotéza a cíle práce.....	2
3	Literární rešerše.....	3
3.1	Chmel otáčivý.....	3
3.2	Stres.....	4
3.2.1	Obecná charakteristika.....	4
3.2.2	Biotický stres.....	6
3.2.3	Abiotický stres.....	6
3.2.4	Sucho.....	6
3.3	<i>In vitro</i>.....	12
4	Metodika.....	15
4.1	Rostlinný materiál.....	15
4.2	Kultivace <i>in vitro</i>.....	15
4.3	Multiplikace.....	16
4.4	Otužování explantátů osmoticky a nízkou teplotou.....	17
4.5	Izolace vzrostných vrcholů.....	18
4.6	Sycení vzrostných vrcholů.....	19
4.7	Řízená dehydratace.....	20
4.8	Kryoprezervace.....	20
4.9	Životaschopnost.....	20
4.10	Stanovení obsahu vody.....	21
4.11	Stanovení termických charakteristik.....	22
4.12	Statistické vyhodnocení pokusů.....	23
5	Výsledky.....	24
5.1	Životaschopnost explantátů chmele po působení stresu dehydratace a kryoprezervaci.....	24
5.2	Termické vlastnosti vzrostných vrcholů chmele po působení osmotického stresu, nízké teploty a dehydratace.....	25
6	Diskuze.....	34
7	Závěr.....	39

8 Literatura.....	40
9 Seznam použitých zkratk a symbolů.....	51
10 Seznam obrázků.....	52
11 Seznam tabulek.....	53
12 Samostatné přílohy.....	I

1 Úvod

Česká republika patří mezi jedny z největších producentů chmele a jako první země na světě zavedla jeho mezinárodní označení. Systém značení spočívá v používání trojmístných kódů pro odrůdy chmele a trojmístného kódu pro označení země, oblasti pěstování (Altová 2022). Významnou roli při pěstování hrají klimatické a půdní podmínky České republiky, které ovlivňují kvalitu chmele. Mezi nejvýznamnější odrůdy patří 'Žatecký poloraný červeňák', který se podílí na šlechtění chmele.

Genetické zdroje se běžně uchovávají na chmelnicích, kde jsou vystaveny mnoha stresorům (biotické a abiotické stresy). Vlivem stresorů by mohlo dojít ke ztrátě rostlin, tedy i genetického materiálu. Aby se těmto ztrátám předešlo, jsou rostliny uchovávány v genových bankách v *in vitro* podmínkách, nebo kryokonzervovány pomocí tekutého dusíku (Svoboda et al. 2018).

Kryoprezervace je metoda využívaná k dlouhodobému uchování materiálu. Vlivem kapalného dusíku při teplotě $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ dochází k podchlazení vzorků a následně zastavení veškerých činností, jako je buněčné dělení a buněčný metabolismus (Salgotra & Chauhan 2023).

Metoda je v současné době jednou z nejnovějších technik, která umožňuje bezpečnou a dlouhodobou ochranu rostlin, bez rizika genetických modifikací. Princip Kryoprezervace je zajistit životaschopné rostliny po rozmrazení. Aby nedošlo k jejich poškození, musí se z materiálu odstranit veškerá zmrazitelná voda. K jejímu odstranění dochází pomocí fyzikální nebo osmotické dehydratace, po které následuje ultrarychlé zmrazení. Ultranízká teplota po dehydrataci zastavuje metabolické a biochemické reakce, aby se zamezilo vzniku intracelulárních ledových krystalů, které mohou zapříčinit buněčnou smrt nebo poškodit buněčné orgány během samotného procesu (Benelli 2021).

Uchovávání rostlinného materiálu pomocí tekutého dusíku je velmi složitá metoda a každá rostlina na ní reaguje odlišně. Tato práce se zabývá kryokoprezervací vzrostných vrcholů chmele otáčivého (*Humulus lupulus* L.) a možnostmi zlepšení samotné metody. Na experimenty byly zvoleny odrůdy chmele 'Žatecký poloraný červeňák', Osvaldův klon 72 a odrůda 'Gaia'. V pokusech byl testován vliv stresorů, jako je chlad a osmotický stres, aby se prokázalo, do jaké míry otužení těmito stresory je ovlivněn proces samotné kryoprezervace. Experiment vznikl na základě problémů životaschopnosti vzrostných vrcholů po kryoprezervaci, proto bylo nezbytné projít každou fází postupu a na základě výsledků navrhnou možné změny zlepšení metody.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem této práce bylo zhodnotit dosavadní postup při kryoprezervaci, vyhodnotit jednotlivé kroky standardně používané metody a na základě výsledků navrhnout možná zlepšení. Výsledky by mohly pozitivně ovlivnit životaschopnost vzrostných vrcholů nebo naopak prokázat, že vlivem osmotického stresu nebo stresu z chladu dochází k poškození rostlin, tudíž stávající metoda nemusí být pro rostliny optimální.

Dílčí cíle této práce:

- Sledování vzrostných vrcholů, vysazených na regenerační médium, po kryoprezervaci a zhodnotit životaschopnost na základě chlorofylu.
- Pomocí přístroje DSC (diferenční skenovací kalorimetrie) stanovit obsah vody před a po dehydrataci, sledovat termodynamické vlastnosti vzorků.

Hypotézy:

- Explantáty chmele lze otužit pomocí osmotického stresu pro zvýšení jejich kryotolerance;
- Explantáty chmele lze otužit působením nízké teploty pro zvýšení jejich kryotolerance;
- Explantáty chmele lze kombinovaným působením osmotického stresu a nízké teploty otužit vůči působení kryogenních teplot.

3 Literární rešerše

3.1 Chmel otáčivý

Z taxonomického hlediska řadíme rod chmel (*Humulus*) do čeledi konopovité (*Cannabaceae*) (Alonso-Esteban et al. 2019) a od roku 2003 patří do řádu růžotvaré (*Rosales*) (Kobus-Cisowska 2019). Mezi další druhy rodu *Humulus* patří *H. yunnanensis* Hu a *H. japonicus* Siebold & Zucc. Všechny tři lze nalézt v Číně, která je považovaná za původní oblast (Alonso-Esteban et al. 2019). V současné době se chmel otáčivý vyskytuje v mírných oblastech po celém světě. V České republice se pěstuje ve třech lokalitách (Žatecká, Úštěcká a Tršická), o celkové rozloze 4 927 hektarů (Altová 2022). Pro komerční využití jsou pěstovány samičí rostliny (De Souza et al. 2021), samčí jsou z chmelnic fyzicky odstraňovány, aby nedocházelo k nežádoucímu opylení (Harrison 1971).

Chmel je dvoudomá vytrvalá rostlina, která dospívá po prvních třech letech a zůstává produktivní na jednom stanovišti po dobu 20–25 let (Amoriello 2019). Chmel otáčivý (*Humulus lupulus* L.) je z cytologického hlediska diploidní organismus ($2n = 20$) s heteromorfními pohlavními chromozomy, což představuje u samičích rostlin XX a u samčích XY (Danilova & Karlov 2006; Grabowska-Joachimciak et al. 2006). Dvoudomá povaha znamená oddělení samčích a samičích pohlavních orgánů na jednotlivých rostlinách (Haunold et al. 1993).

V nadzemní části rostlin chmele vznikají postupně dvě orgánové soustavy vegetativní a generativní. Tyto orgánové soustavy se liší od sebe funkcí a morfologickou stavbou orgánů (Rybáček et al. 2020). Hlavní funkcí vegetativních orgánů (stonky a listy) je vytvářet organické látky během fotosyntézy a následujících pochodů.

Generativní orgány jsou určeny k vytváření životaschopných semen v chmelových plodech. U kulturních rostlin pro šlechtitelské účely je tato funkce potlačena izolací samčích rostlin od samičích, díky tomu se zabrání nechtěnému oplodnění samičích porostů planými samčími rostlinami (Revilla & Martinez 2002).

Z uzlin révy (nodů) a pazochů vyrůstají listy (folia), které rostou po dvou vstřícně proti sobě. Místo, odkud vyrůstají, určuje jejich rozdělení. Pokud listy vyrůstají z pazochů, tak je nazýváme pazochové a pokud z révy, tak jsou to listy révové. Listy jsou řapíkaté a mladé mají, oproti starším, silně zřasené listové čepele. Plně vyvinuté listy mají čepele pouze mírně zprohýbané a horní strana listu bývá tmavší než spodní.

Podle bohatě rozvětvené laty se dá poznat samčí květenství. Květy mají v průměru 5 - 6 mm po rozkvětu a vyrůstají na krátkých stopkách. Tyto květy tvoří 5 korunních plátků, 5 tyčinek a prašníky, ve kterých se vytváří jemný žlutý pyl. Na korunních plátcích se tvoří také lupulinové žlázy (Kosař 2000; Šnobl 2004).

Samčí květenství je oproti tomu složeno z 20 - 60 kvítků, které jsou osázeny na mnohokrát zlomeném věténku. Toto věténko tvoří osu celého květenství a na každém zalomeném se obvykle vytváří čtyři kvítky.

Rovnou na semeník přisedají dvě nitkovité blizny, u kterých scházejí čnělky. Blizny jsou spojeny pouze u mikropyle, jinak jsou volné. Jejich povrch je pokryt dlouhými papilami, které slouží k zachycení pylu ze vzduchu. Blizny mají bělavé zbarvení. V době odumírání

rychle hnědnou a ztrácejí schopnost přijímat pyl. V této fázi končí proces květenství a nastává stav plodenství (Rybáček et al. 2020).

Plodenství u chmelových rostlin tvoří hlávky, které jsou jednou z nejdůležitějších surovin pro výrobu piva a dávají mu jeho typickou hořkou chuť (Rybáček et al. 2020). Chmelové hlávky obsahují pryskyřice, éterické oleje, bílkoviny, polyfenoly, lipidy, vosky a celulózu (Kobus-Cisowska 2019). Jejich nejcennější součástí je lupulin. Je to odborné označení pro mnohobuněčné lupulinové žlázy, které se tvoří z buněk pokožky (*epidermis*). Mají pohárovitý až kulovitý tvar. Uvnitř se nachází exkret, který obsahuje silice, pryskyřice a způsobuje žluté zbarvení lupulinu. Tento exkret se vytváří ve všech částech hlávky, nejvíce však na listenech (Hampton et al. 2001).

Pro zásobování živinami nadzemních orgánů je nepostradatelný silný kořenový systém, který je pro rostliny chmele typický. Dospělé rostliny mají kolem 8 - 12 mohutně rozvětvených hlavních kořenů, které se vyvíjejí na bázi zkráceného oddenku (babka). Životnost chmelové babky udává zároveň i životnost rostliny.

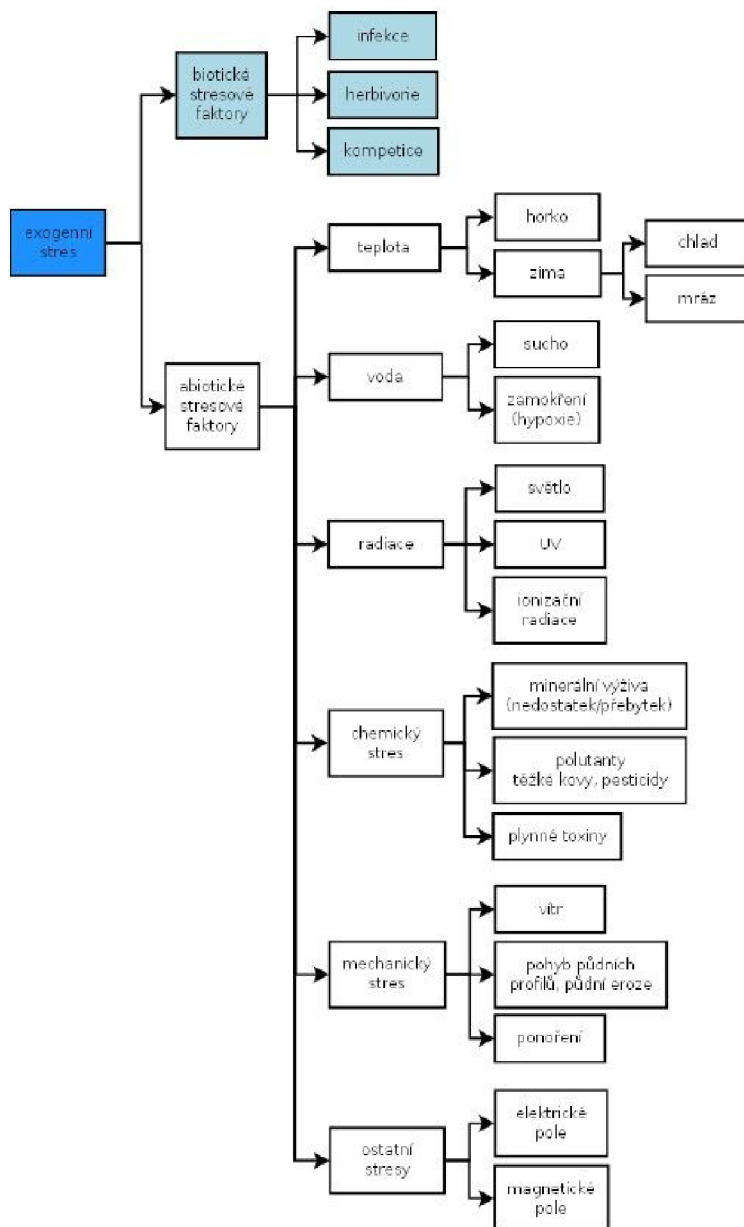
Vývoj kořenového systému značně ovlivňují půdní podmínky a charakteristika půdního profilu. Chmelové kořeny rostou do velké hloubky, ale značná část se rozrůstá v hloubce do hloubky 1,6 m (Rybáček et al. 2020).

Úspěšné pěstování chmele vyžaduje optimální růstové podmínky, zejména délku denního světla, letní teplotu, roční srážky a úrodnost půdy. V externích podmínkách jsou rostliny vystaveny mnoha stresorům, které mohou způsobit ztrátu genetického materiálu. Aby se předešlo ztrátám vzácných odrůd nebo genetického materiálu vlivem těchto stresorů, jsou rostliny uchovány v genových bankách v *in vitro* podmínkách, nebo kryoprezervovány pomocí tekutého dusíku (Svoboda et al. 2018).

3.2 Stres

3.2.1 Obecná charakteristika

Ke stresu rostlin dochází v případě, že podmínky prostředí nejsou vhodné k růstu a odhaduje se, že jejich vlivem může dojít k velké ztrátě výnosu (Zhang et al. 2020). Ve většině případů nepředstavuje stres stálý stav, jedná se spíše o dynamický komplex mnoha reakcí (Jones et al. 2008). Stresory se mění v důsledku ročního období, mohou se opakovat, násobit nebo působit dlouhodobě. Rostliny neustále ovlivňuje působení abiotických nebo biotických faktorů viz obrázek 1. Pokud působí stresových faktorů větší počet najednou, zvyšuje se i strádání rostliny (Schulze et al. 2005).



Obrázek 1 Biotické a abiotické faktory prostředí, které způsobují stres u rostlin (Schulze et al. 2005).

Obrázek 1 znázorňuje základní rozdělení biotických a abiotických faktorů, které mohou u rostlin vyvolat stres. Na základě obrázku lze tvrdit, že rostliny se téměř nikdy nenachází v optimálních podmínkách (Schulze et al. 2005). Působení těchto stresorů ovlivňuje rostliny a ty na to musí reagovat. Nejběžnější reakcí je zpomalení růstu a aktivace obranného mechanismu (Lamers et al. 2020).

Reakce rostlin na stres:

- Poplachová – detekce stresu
- Restituční – aktivace ochranných mechanismů
- Rezistenční – vlivem aktivace ochranných mechanismů rostlina přežívá
- Přežití nebo zahynutí.

3.2.2 Biotický stres

Rostliny jsou náchylné k řadě biotických stresových podmínek. Mezi nejběžnější biotické stesy patří viry, houby, bakterie. Pokud rostlina vycítí stres, spustí soubor molekulárních a buněčných procesů (Lamers et al. 2020; Iqbal et al. 2021), který následně aktivuje síť morfologických, fyziologických a biochemických mechanismů (Nejat & Mantri 2017; Saijo & Loo 2020). Aby rostliny zamezily svému úhynu, mají tendenci dosáhnout rovnováhy mezi obranou reakcí a biotickým stresem (Peck & Mittler 2020).

3.2.3 Abiotický stres

Abiotický stres vzniká, pokud na rostlinu působí nedostatek nebo nadbytek fyzikálních, chemických jevů. Povětrnostní jevy, extrémní výkyvy teplot, dostupnost vody pro rostlinu, salinita půdy, to vše může negativně ovlivnit její růst a vývoj (Lamers et al. 2020).

Působením mnoha abiotických stresových faktorů na rostlinu způsobuje její celkové oslabení a zvyšuje náchylnost k infekci patogenů (Amtmann et al. 2008; Goel et al. 2008; Mittler & Blumwald 2010; Atkinson & Urwin 2012).

Mezi nejvýznamnější stresory, které ovlivňují růst a výnos plodin patří sucho a teplota. Kombinace těchto dvou faktorů způsobuje mnoho fyziologických změn (Rizhsky et al. 2002; Prasad et al. 2011; Vile et al. 2012) jako je zpomalení nebo zastavení růstu, případně ztráty na výnosu (Ahmad et al. 2020). Během období sucha dochází k omezení fotosyntézy uzavřením průduchů a tím se snižuje dostupnost CO₂ (Chaves et al. 2003). Tepelný stres oproti tomu inhibuje fotosyntézu především prostřednictvím změn nestomatálních znaků, jako je kapacita přenosu elektronů a aktivita Rubisco (Salvucci & Crafts-Brandner 2004). Účinky sucha, tepelného stresu a jejich kombinace na fotosyntézu se však mohou lišit v závislosti na druhu rostliny (Way & Oren 2010; Suzuki et al. 2014).

Nadbytek solí v půdě snižuje příjem vody rostlinami v důsledku snížení rozdílu mezi vodním potenciálem v kořenech a v půdě. Dochází ke zvýšení osmotického tlaku a rostlina se s ním vyrovnává podobně, jako s dehydratací v důsledku sucha. Pro udržení osmotické rovnováhy a zmírnění působení abiotického stresu vylučují rostliny osmolyty a osmoprotektivní látky (sacharóza, hexóza, cukerné alkoholy a jiné). Osmoprotektiva hrají důležitou roli v udržování rovnováhy v buňce, v její fotosyntetické schopnosti a detoxikaci reaktivních forem kyslíku tím, že působí jako metabolické signály ve stresových podmínkách. Společně chrání rostliny tak, že aktivují mnoho fyziologických reakcí, jako je posílení integrity membrány, harmonizace enzymatické aktivity (Ahmad et al. 2020).

3.2.4 Sucho

Ve středomořském prostředí, charakterizovaném vysokými teplotami po celou dobu růstu chmele, byla prokázána inverzní korelace mezi růstem rostlin, produktivitou a akumulací tepla, zejména ve vegetativních vývojových fázích (Marceddu et al. 2020). Vysoké teploty a vodní stres během vegetačního období trvale snižují výnos chmelových hlávek a obsah

hořkých kyselin v hlávkách (Srečec et al. 2004; Mozny et al. 2009; Donner et al. 2020; přehledně Marceddu et al. 2022).

Obecně je dobře známo, že hlavní účinky stresu způsobeného suchem na růst a vývoj rostlin, jsou určovány poruchami vodního poměru a také modifikací účinnosti využívání vody, s velkým dopadem na relativní obsah vody v zelených pletivech, listech vodní potenciál, osmotický potenciál, tlakový potenciál a rychlost transpirace (Farooq et al. 2012). Změny pH, ABA a koncentrace síranů v xylémovém toku byly navrženy jako signály sucha na dlouhou vzdálenost také pro chmelové rostliny (Gloser et al. 2013; Korovetska et al. 2016), i když stále není jisté, jakou roli hrají tyto metabolity v reakci druhu na suchu. Ve studii provedené Kolencem et al. (2016), reakce na stres sucha u dvou slovinských kultivarů chmele pěstovaných v květináčích byla hodnocena kombinací fyziologických studií a proteomické analýzy. Podle těchto zjištění vykazovaly chmelové rostliny sníženou rychlost transpirace a vodního potenciálu při snížené dostupnosti vody, došlo k poklesu fotosyntézy v důsledku stomatálního a nestomatálního omezení a silnému poklesu fotosyntetických proteinů a proteinů energetického metabolismu, což ovlivnilo zdatnost rostlin obecně. Také velmi zajímavou studii provedl Eriksen et al. (2020), kteří se zabývali fyziologickými rysy a diferenciální genovou expresí v pletivech listů, stonků a kořenů u rostlin chmele otáčivého kultivaru „Cascade“ vystavených stresu vysoké teploty, vodnímu stresu a kombinaci obou. Ve výše uvedeném experimentu se kultivační pokus uskutečnil v růstových komorách, kde působení stresových podmínek bylo schopno zapůsobit podstatné změny transkriptomu. Bylo zjištěno významné snížení exprese řady genů, což vedlo ke snížení agronomicky důležité biosyntézy sekundárních metabolitů, např. hořkých kyselin. Jak však uvedli stejní autoři, jiné studie nezjistily žádné snížení obsahu α -kyselin pod vodním stresem (Nakawuka et al. 2017).

Byl proveden výzkum mechanismů a strukturálních znaků vyplývajících ze stresu sucha u chmele (Gloser et al. 2013; Korovetska et al. 2016). Četné molekulární a metabolické studie zjistily, že reakce rostlin na kombinaci stresu z horka a sucha jsou jedinečné a měly by být hodnoceny spíše společně než individuálně (Pnueli et al. 2002; Potopová et al. 2021).

3.2.4.1 Osmotický stres

Rostliny na stres reagují částečnou modulací genové exprese, což nakonec vede k obnovení buněčné homeostázy, detoxikaci toxinů a obnovení růstu. Turgorismus u rostlinných buněk je tvořen silou buněčné expanze a vody.

Vegetativní růst rostlin může probíhat pouze v určitém rozsahu stavu vody, který lze měřit pomocí volné energie molekul vody - vodního potenciálu (ψ_w). Výrazné změny vodního potenciálu v prostředí mohou pro rostliny znamenat osmotický stres, který narušuje normální buněčné činnosti, nebo dokonce způsobuje smrt rostlin. Rostliny během působení osmotického stresu vykazují rozsáhlou škálu reakcí například morfologické a vývojové změny (životní cyklus, inhibice růstu výhonů a posílení růstu kořenů), úpravy v transportu iontů (příjem, vytlačování a sekvestrace iontů) a metabolické změny (např. metabolismus uhlíku, syntéza kompatibilních roztoků), (Greenway & Munns 1980; Hasegawa et al. 2000).

Část reakcí je vyvolána primárními signály osmotického stresu, zatímco jiné mohou být důsledkem sekundárních stresů/signálů vyvolaných primárními. Sekundárními signály

mohou být fytohormony [např. kyselina abscisová (ABA), etylen], reaktivní formy kyslíku a intracelulární sekundární poslové (např. fosfolipidy).

Některé z těchto sekundárních signálů nemusí být omezeny na primární stresová místa, jako je kořen, a jejich schopnost přesouvat se do jiných částí rostliny přispívá ke koordinaci reakcí celé rostliny na stresové podmínky. Například při stresu suchem může ABA odvozená z kořenů stoupat s transpiračními toky a regulovat otevírání stomat v listech (Davies & Zhang 1991). Reaktivní formy kyslíku jsou v rostlinách také mobilní (Alvarez et al. 1998; Karpinski et al. 1999; Lopez-Huertas et al. 2000). Reakce rostlin jsou obecně trojího druhu, tj. udržení homeostázy, detoxikace škodlivých prvků a obnovení růstu (Xiong & Zhu 2002).

Osmotické přizpůsobení (OA – osmotic adjustment) je čisté zvýšení mezibuněčných rozpuštěných látek v reakci na vodní stres, které umožňuje zachovat turgor při nižším vodním potenciálu. OA byla považována za primární mechanismus adaptace rostliny na sucho, protože podporuje metabolickou aktivitu tkáně a umožňuje regeneraci, ale mezi genotypy se značně liší. Účinnost rostlin v suchých podmínkách byla spojena s OA u mnoha druhů, jako je čirok, pšenice a olejná brkev. Vysoké hladiny iontů mohou kriticky inhibovat cytosolové enzymy rostlinných buněk. Během osmotické úpravy se zdá, že akumulace iontů je omezena na vakuoly, kde jsou ionty drženy mimo kontakt s cytosolem nebo subcelulárními organelami. Vzhledem k této kompartmentaci iontů se musí v cytoplazmě sestavit další rozpuštěné látky, jako je cukerný alkohol, aminokyselina, prolin, aby se zachovala rovnováha vodního potenciálu buňky (Yadav 2020).

Protokoly kryoprezervace jsou založeny na postupech, které se obvykle vyvíjejí empiricky pomocí strategií specifických pro určité rostliny, s cílem zvýšit přežití a regeneraci rostlin po skladování v kapalném dusíku. Teorie kryoprezervace zahrnuje několik vzájemně propojených disciplín od fyziologických po kryofyzikální. Stav vody a kryoprotekce jsou nejdůležitějšími determinanty přežití v kombinaci s fyziologickým stavem rostlin. Teoretické porozumění kryobiologie pomůže optimalizovat způsoby skladování rostlin a zlepšit dlouhodobé uchování jejich sbírek rostlin ve stabilním kryogenním stavu. Voda, biologické rozpouštědlo přírody, má velký vliv na určování přežití po vystavení kapalnému dusíku (LN). Pro svou malou velikost je H₂O komplexní, anomální molekula se speciálními vlastnostmi, bez kterých by existence života nebyla možná

Kryogenní skladování zcela bez ledu je nejnovějším přístupem ke kryokonzervaci rostlin (Benson 2004; Fuller et al. 2004, Lin et al. 2023). Klíčem k vývoji strategií kryoprotektivní vitrifikace je zvýšení viskozity buněk do bodu, kdy je inhibována tvorba ledu a voda zesklotává při vystavení kryogenním teplotám.

Zvýšení viskozity buněk je dosaženo pomocí dvou hlavních přístupů:

- Přidání kryoprotektivních látek ve velmi vysokých koncentracích.
- Odstraňování vody odpařováním a osmotickou dehydratací.

V praxi mnoho protokolů vitrifikace rostlin integruje obojí. Vitrifikace dosažená použitím aditiv může mít za následek toxicitu kryoprotektiva, osmotické poškození (u látek, které nepronikají) a komplikace při odtávání.

V případě dehydratačních procesů, kde se voda odstraňuje osmotickou dehydratací a/nebo odpařovacími prostředky (sušení na vzduchu nebo sušící činidla, jako je silikagel), existuje další problém citlivosti na vysoušení. Výhodné je použití směsi různých přísad (Fahy 1986; Fahy et al. 2021). To snižuje toxicitu jakékoli jednotlivé přísady, omezuje dopady extrémního vysychání odpařováním a pomáhá stabilizovat vytvořená skla. Doporučuje se používat směsi penetrujících a nepenetrujících kryoprotektantů (Fahy et al. 1984). Většina vitrifikačních roztoků aplikovaných na rostliny obsahuje směs penetrujících a nepenetrujících kryoprotektantů.

Molekuly obalené vodou jsou hydrofilní; zatímco ty, které vodu odpuzují, jsou hydrofobní. Organizace hydrofobních lipidů v membránách určuje kompartmentalizovanou strukturu buněk. Vodní útvary jsou vysoce soudržné a mají robustní schopnost odolávat prasknutí díky H-vazbám. V rostlinách tyto kohezní síly podporují integritu a pohyb vody ve vaskulárních pletivech, jedná se o biologická vedení vody, která prostřednictvím transpirace a povrchového výparu dodávají živiny z půdy rostlině. Kvůli své elektrické povaze se voda shlukuje v „hydratačních obalech“ kolem jednotlivých iontů nebo molekul, to specifikuje stav hydratace, počet molekul H₂O spojených s rozpuštěnými látkami. Voda tak udržuje rozpuštěné látky v tekutém stavu. Vztah mezi vodou a rozpuštěnými látkami definuje koligativní vlastnosti systému a konkrétně koncentraci rozpuštěných látek v buňce.

Naproti tomu osmotické vlastnosti systému jsou definovány průtokem rozpouštědla přes semipermeabilní membránu, která umožňuje průchod rozpouštědla, ale ne rozpuštěných látek. Osmotický tlak je tlak, který musí být aplikován na roztok, aby se zabránilo toku rozpouštědla přes semipermeabilní membránu. Roztoky separované tímto způsobem musí být v rovnováze s ohledem na jejich molekulární koncentraci. Voda teče ze slabšího do silnějšího roztoku: když jsou ekvilibrovány, roztoky se nazývají izotonické. Tonicita měří, do jaké míry koncentrovaný roztok způsobuje pohyb vody dovnitř nebo ven z buněk. Roztoky, které způsobují bobtnání buněk, jsou hypotonické, protože roztok má nižší obsah rozpuštěných látek než buňka (Fuller et al. 2004).

Buněčné zvětšení objemu způsobené hypotonickými roztoky vytváří u rostlin turgorový tlak. To je pozorováno jako expanze cytoplazmy a tlačení plazmatické membrány proti tuhé buněčné stěně. Tento proces je ovlivněn zvětšením centrální vakuoly, která získává vodu. Na rozdíl od živočišných buněk hypotonické rostlinné buňky obvykle neprasknou, protože buněčná stěna tento tlak vydrží. Turgorový tlak je u rostlin strukturálně důležitý, protože je udržuje ve vzpřímeném stavu a jeho působení na stěnu buněčnou je základem dlouhivého růstu rostlin.

Roztoky, které způsobují smršťování buněk, jsou hypertonické; mají vyšší hladinu rozpuštěných látek než buňka. Když je rostlinná buňka umístěna v hypertonickém roztoku, plazmatická membrána odchlípí z buněčné stěny. Voda má jedinečné fyzikálně-chemické vlastnosti nezbytné pro buněčné životní funkce. Změny v objemu a vazbě vody jí staví do ústřední role v úspěšné kryokonzervaci a stabilitě skladování materiálu (Fuller et al. 2004).

Nukleace ledu

Osmotika také oddalují ledovou nukleaci vody. S vyšší koncentrací roztoku, nižším osmotickým potenciálem klesá teplota nukleace ledu. Pro počáteční nukleaci ledu mají ledové

krystaly schopnost růst do složitých shluků tvořících sítě, které mohou exponenciálně růst, jak se stále více molekul vody účastní komplexních vzájemných zarovnání. Důsledky jak extracelulární, tak intracelulární nukleace ledu byly diskutovány Muldrew et al. (2004) a Mazur (2010). Nukleace ledu ovlivňuje jeho strukturální, osmotická a koligativní integritu buněk způsobující fyzické a mechanické poškození. Koligativní poškození vyplývá z nadměrných koncentrací rozpuštěných látek, které ohrožují buněčnou funkci.

V kryokonzervovaných rostlinách je dynamika dvou faktorů zapojených do kryopoškození zmírňována rozdíly ve schopnosti intracelulárních a extracelulárních složek iniciovat ledové krystaly. K zamrznutí dochází většinou tehdy, když je to energeticky i fyzicky (z hlediska dostupnosti ledových nukleačních jader) příznivější. S výjimkou velmi rychlých mrazů se led tvoří přednostně extracelulárně. V tomto případě se vytvoří deficit mezi částečně zmrzlým vnějším buňky a nezmrzlým vnitřkem a molekuly vody migrují ven, aby se nastolila osmotická rovnováha.

Osmotický gradient a umožní iniciaci embryonálního ledového krystalu. Všeobecně se má za to, že voda zamrzá při 0 °C, což se stává jen zřídka. V nepřítomnosti nukleačních jader, které umožňují spojení molekul H- O, propustnost plazmatické membrány také ovlivňuje pohyb vody prostřednictvím difúze a průchodu molekul vody přes póry akvaporinu (Tyerman et al. 2002).

Po počáteční nukleaci ledu mají ledové krystaly schopnost růst do složitých shluků tvořících sítě, které se mohou exponenciálně zvětšovat, jak se stále více molekul vody účastní komplexních vzájemných vazeb. Důsledky jak extracelulární, tak intracelulární nukleace ledu byly diskutovány ve studiích Muldrew et al. (2004) & Mazur (2004). Nukleace ledu ovlivňuje strukturální, osmotická a koligativní integrita buněk způsobující fyzické a mechanické poškození. Koligativní poškození vyplývá z nadměrných koncentrací rozpuštěných látek, které ohrožují buněčnou funkci (Taylor et al. 2006).

Obecně způsoby chlazení s řízenou rychlostí zahrnují sekvenci manipulací, kterými je vzorek předkultivován nebo aklimatizován a poté chráněn proti mrazu. Obvykle je DMSO hlavní penetrační koligativní kryoprotektant a může být kombinován s nepenetrujícími osmoticky aktivními přísadami, jako jsou cukry nebo polyethylenglykol. Vzorky jsou vystaveny specifické rychlosti ochlazování (rozsah $-0,1$ až 5 °C·min⁻¹), které se obvykle nazývá náběžná rampa, během níž může být naprogramován náhlý pokles teploty, aby byl vyvolán proces extracelulární mrznutí vody a byly tak zahájeny exotermická reakce.

Penetrující / nepenetrující kryoprotektanty

Éra kryobankovnictví začala s náhodným a milníkovým objevem Polgeho et al. (1949), že glycerol chrání ptačí spermie před zmrazením. Po tomto průlomu zkoumal kryobiologický výzkum savců a zdravotníků, způsob působení kryoprotektantů z hlediska koligativní teorie (Meryman & Williams 1985). V Lovelockově klíčové studii došlo k poškození červených krvinek, když byla překročena kritická koncentrace aplikované extracelulární soli, nezávisle na aplikovaném glycerolu nebo teplotě mrazu potřebné k dosažení kritické koncentrace soli. To bylo interpretováno tak, že glycerol proniká do buňky a na koligativním základě snižuje množství ledu vytvořeného při jakékoli teplotě. To znamená, že působí jako nemrznoucí směs snížením koncentrace extracelulární soli a vody ztracené v důsledku osmózy. Buňka je chráněna proti dosažení minimálního letálního objemu

buněk s další výhodou snížení teploty, při které skutečně nastává zmrazení. Koligativní vlastnost roztoku závisí pouze na poměru počtu částic rozpuštěné látky a rozpouštědla v roztoku, nikoli na identitě rozpuštěné látky.

Hladina vody, kterou je třeba zmrazit, aby se dosáhlo osmotické rovnováhy, je tedy mnohem nižší a rozsah dehydratace, ke které v buňce dochází, je lépe tolerován (Meryman & Williams 1985). Existuje další ochranná výhoda v tom, že k tomu dochází při nižší teplotě, protože aditivum snižuje bod tuhnutí. Nejběžnějšími koligativními (penetrujícími) kryoprotektivy používanými při kryokonzervaci rostlin jsou glycerol, dimethylsulfoxid (DMSO), methanol (někdy ethanol) a glykoly s menší molekulovou hmotností.

Teorie koligativní kryoprotekce má dva základní atributy:

1. Kryoprotektiva musí být schopna proniknout do buňky, jinak způsobí osmotickou dehydrataci a způsobí právě to zranění, proti kterému se používají.

2. Kryoprotektiva musí být netoxická pro buňku v koncentracích požadovaných pro jejich účinnost. Penetrační kryoprotektiva přispívají k celkové osmolalitě buňky. Koligativní přísada, jako je glycerol, zvyšuje počáteční osmolalitu buňky před zahájením procesu zmrazování.

3.2.4.2 Chlad

Extrémní teploty jako je nízká teplota nebo chlad, jsou považovány za jeden z nejvýznamnějších abiotických stresorů, které mohou omezovat růst a vývoj rostlin. Tento stres ovlivňuje výnos a fyziologii rostlin, zvláště u citlivých na chlad nebo vymrzání (Banerjee & Roychoudhury 2019). V posledních letech bylo dosaženo významného pokroku v chápání, jak rostliny vnímají stres a přenášejí studené signály (Guo et al. 2018; Ding et al. 2020). Pomocí studeného signálu rostliny začnou vnímat teplotní výkyvy změnou tekutosti membrány a přeskupením cytoskeletu, následně přílivem vápníku, který spustí další reakce (Guo et al. 2018; Ding et al. 2019).

Rostliny si vyvinuly mechanismus pro zvýšení tolerance vůči mrazu během vystavení období nízkým, ale nemrzoucím teplotám (chladová aklimatizace). Během aklimatizace si rostliny vyvinou mechanismy, aby minimalizovali škody působením nízkých teplot.

Chladový stres lze klasifikovat jako vystavení rostlin chladem (0 – 15 °C) a mrazem (<0 °C). Rostliny pocházející z mírných oblastí, jako špenát vykazují různé stupně tolerance vůči chladu. Na druhou stranu rostliny tropického a subtropického původu jsou citlivé na chlad a postrádají mechanismus chladové aklimatizace (Mirua & Furumoto 2013).

Schopnost mrazuvzdorných rostlin spočívá v aklimatizaci na chladné teploty a deaklimatizaci během teplého období. Tyto vlastnosti jsou pro rostliny nezbytné na přežití během zimního období. V mírných oblastech může vyvolat stres mrazem aklimatizaci na chlad a tím i zvýšení mrazuvzdornosti rostliny. Tolerance rostlin k zamrznutí závisí přímo na schopnosti potlačit tvorbu ledových krystalů v buňkách (Kalberer et al. 2006).

Chladový stres způsobuje poškození rostlin změnami ve struktuře membrány a snížením protoplazmatického proudění, únikem elektrolytů a plazmolýzou, což vede

k poškození buněk. Metabolismus buněk je poškozen zvýšením nebo snížením rychlosti dýchání a v závislosti na intenzitě stresu dochází k syntéze abnormálních metabolitů v důsledku abnormálního anaerobního dýchání. V důsledku poškození buněk a změněného metabolismu dochází ke snížení růstu rostlin, vnitřní změně barvy (zhnědnutí cév), zvýšené náchylnosti k rozkladu a také ke smrti rostliny (Yadav 2020).

Rostliny používají různé strategie, aby se vyrovnali se stresovými podmínkami, integrují různé fyziologické, metabolické a molekulární adaptace. Tyto metody nejprve vytvářejí modifikace, které rostlinu chrání, a poté následuje aklimatizace na chlad, která zvyšuje přežití rostlin při chladovém stresu. Chladový stres snižuje růst a vývoj rostlin, které ovlivňují fyzikální a chemickou strukturu buněčné membrány, způsobují únik elektrolytů a omezují protoplazmatické proudění a změny v metabolismu buňky. Další reakce chladu zahrnují změny syntézy nukleových kyselin a proteinů, rovnováhy vody a živin, afinity a konformace enzymů a nedostatky ve fotosyntéze, konkrétně snížení regulace a poškození fotosystému II.

V posledních letech se čeští pěstitelé chmele potýkali s mnoha problémy jako nadvýrobou, výrazným suchem nebo extrémními mrazy v roce 2012 a také povodněmi v roce 2013. Z klimatických činitelů ovlivňují růst a vývoj chmele především teplo, světlo, vláha a proudění vzduchu. Chmel začíná růst při 4 °C a normálně roste při teplotě 9 – 11 °C. Za vegetace nemá být velký rozdíl mezi denními a nočními teplotami. Pozdní mrazy brzdí vývoj chmele, při poklesu teploty pod – 5 °C dochází k poškození mladých listů.

Optimalizace systému tkáňových kultur pro *in vitro* skladování genetických zdrojů chmele pocházející z meristémové kultury. Z testovaných teplotních variant 25/20 °C, 15/10 °C a 5±2 °C byla vybrána varianta kultivace při 5±2°C jako optimální pro zpomalení růstu *in vitro* kultur rostlin chmele pro střednědobé uchování rostlin (Faragó et al. 2009). Jako optimální teplota pro střednědobé skladování chmele v *in vitro* v jiném experimentu (Reed et al. 2003) byla označena teplota 4 °C s 12hodinovou fotoperiodou a velmi nízkým zářením (3 μmol m⁻² s⁻¹). Tyto experimentálně zjištěné teploty jsou velmi blízké teplotě 4 °C, při které se zastavuje růst rostlin.

3.3 *In vitro*

Počátky studia rostlinných buněk a tkáňových kultur *in vitro* sahají do roku 1902, kdy Gottlieb Haberlandt představil hypotézu "totipotence", podle níž má každá buňka veškerou genetickou informaci potřebnou k vytvoření dokonalé rostliny (Haberlandt 2003; Fehér 2019). Diferencované buňky rostlin jsou podle této hypotézy schopny znovu vstoupit do buněčného cyklu, množit se, regenerovat tkáň, orgány, a dokonce se stát kompletní rostlinou (Fehér 2019).

Systém tkáňových kultur umožňuje pěstování celých rostlin, orgánů, tkání nebo buněk za kontrolovaných aseptických podmínek v laboratoři. Principem tkáňových kultur je dodat rostlinám všechny živiny, energii a vodu nezbytnou pro růst. Řízené podmínky laboratoře poskytují nastavení optimální teploty a světla pro pěstování rostlin. Růst rostlin může být ovlivněn řadou věcí, jako jsou například regulátory růstu (přírodní nebo syntetické fytohormony). Pro úspěšné uchování v *in vitro* je nezbytné množení geneticky stabilních

roślin. V současné době se kultivační techniky *in vitro* staly nepostradatelné pro produkci rostlin prostých chorob, rychlé množení vzácných rostlinných genotypů a přenos genomu rostlin (Debnath et al. 2006; Altpeter et al. 2016).

Metoda *in vitro* má dva možné způsoby regenerace a to organogenezi nebo somatickou embryogenezi. Oba způsoby se týkají morfogenetických procesů, které mohou být iniciovány přímo nemeristemickými explantáty orgánů a tkání nebo nepřímo tvorbou nediferencované tkáně. Organogeneze se týká tvorby unipolárních struktur (výhonky, kořeny), které mohou vzniknout přímo z diferencovaných náhodných meristémů nebo přímo z kalusu. Somatická embryogeneze je tvorba bipolárních struktur (somatických embryí), podobných organogenezi, iniciovaná přímo z explantátů nebo nepřímo založením kalusu (George 1996; Oseni et al. 2018). Metoda *in vitro* se využívá z hlediska množení materiálu, nebo na dlouhodobé uchování genetických zdrojů (kryoprezervace).



Obrázek 2 Rostliny chmele uchovávané v *in vitro* podmínkách (autor práce)

Na obrázku 2 jsou znázorněny rostliny chmele otáčivého (*Humulus lupulus* L.) odrůda 'Žatecký poloraný červeňák', uchovávané v aseptických podmínkách *in vitro*. Rostliny jsou pěstovány v krátkých skleněných zkumavkách (12 cm) s 5 ml média. Staří chmelových rostlin je šest ždů.

Kryoprezervace genetických zdrojů rostlin

Kryoprezervace je metoda založená na ochlazování rostlinného materiálu (buňky, tkáň, orgány) v kapalném dusíku při teplotě $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Metoda je využívána z hlediska dlouhodobého uchování, protože dochází k zastavení veškerých činností jako je buněčné dělení a buněčný metabolismus (Salgotra & Chauhan 2023). Nevhodné postupy kryoprezervace mohou vést k tomu, že životaschopné vrcholy vyvinou kalusy a tím vést ke genetickým změnám (Harding & Staines 2001). Charoensub et al. (2004) tvrdí, že tvorba kalusů může zvýšit frekvenci genetických změn. Optimalizované podmínky pro kryokonzervaci mohou zajistit lepší možnosti opětovného růstu po rozmrazení vrcholů, u kterých nedochází ke genetickým změnám nebo jen malým (Sakai & Engelmann 2007). Tyto genetické změny vyvolávají velké obavy, proto se mnoho vědců zaměřilo na prevenci kryokonzervovaných metod, aby se předešlo těmto změnám (Fukai & Oe 1990; Skyba et al. 2010; Matsumoto 2017). Nicméně výše uvedené studie neprokázaly významné rozdíly mezi kryoprezervovaným a nekryoprezervovanými rostlinami v optimálních podmínkách (Hirai & Sakai 2001).

Metoda je v současné době jednou z nejnovativnějších technik a nejdostupnějším biotechnologickým přístupem, který umožňuje bezpečnou a dlouhodobou ochranu biodiverzity rostlin bez rizika genetických modifikací. Princip metody je zajistit životaschopné rostliny po rozmrazení. Metoda kryoprezervace je založena na odstranění veškeré zmrazitelné vody, která by mohla materiál poškodit, k tomu se využívá fyzikální nebo osmotická dehydratace následovaná ultrarychlým zmrazením. Ultranižká teplota zastavuje metabolické a biochemické reakce v buňce po dehydrataci, aby se zamezilo vzniku intracelulárních ledových krystalů, které mohou zapříčinit buněčnou smrt nebo poškodit buněčné orgány během samotného procesu (Benelli 2021).

Jednu z nejvýznamnějších sbírek chmele na světě má Česká republika spolu s Německem a USA (Faltus et al. 2009). V případě technik pomalého chlazení jsou extrémně důležité typ a délka chladového otužování a použité kryoprotektivní činidlo, stejně jako rychlost chlazení. Hlubší mrazuvzdornost a zvýšený opětovný růst hrušek po kryokonzervaci jsou způsobeny chladovým otužováním se střídavými teplotami, které vystavuje rostlinky mrazu ($-1\text{ }^{\circ}\text{C}$) a kratším teplým obdobím ($22\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Finkle & Ulrich 1979; Chang & Reed 2000; Chang & Reed 2001; Reed et al. 2003). Pro dosažení optimální mrazuvzdornosti u některých druhů *Humulus* mohou být také zapotřebí prodloužené chladové otužování se střídavými teplotami v délce dvou nebo více týdnů. Účinnost PGD jako kryoprotektiva pro použití v protokolech pomalého chlazení byla prokázána pro buňky a vzrostné vrcholy mnoha rodů (Chang & Reed 2000). Skladování velkých sbírek genetických zdrojů rostlin vyžaduje protokoly, které dobře fungují pro konkrétní laboratoř a které jsou úspěšné pro mnoho typů rostlin. Vzhledem k tomu, že kurátoři genetických zdrojů upřednostňují typ a množství genetických zdrojů rostlin ke skladování, musí také zvolit techniku, která vyhovuje jejich zařízení. Personál, vybavení, odbornost, typ zařízení a dostupná zařízení ovlivňují kterou techniku je pro konkrétní zařízení nejvhodnější (Reed 2001). Když je personál omezujícím faktorem, pomalé chlazení je časově, pracně a finančně efektivní metodou pro kryokonzervované skladování velkého množství vzorků rostlin. Výběr osvědčené techniky a její aplikace pro nový rostlinný druh může ušetřit čas na vývoj a urychlit skladování důležitých sbírek rostlin.

4 Metodika

4.1 Rostlinný materiál

Pro experimenty v této práci byl použit rostlinný materiál chmele (*Humulus lupulus* L.) poskytnutý z *in vitro* banky Chmelařského institutu, s.r.o. v Žatci. Jednalo se explantáty dvou genotypů, typické a tradiční odrůdy 'Žateckého poloraného červeňáku', Oswaldův klon 72, linie s označením 8765 a odrůdy 'Gaia', linie s označením 14635. Pokusy byly provedeny v prostorách Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v. v. i. v Praze.

4.2 Kultivace *in vitro*

Explantáty chmele vybraných odrůd byly pěstovány na pevném médiu se složením solí odvozené od standardního média podle Murashige & Skoog (1962) se sníženým obsahem dusíku bez fytohormonů s 20 g.l⁻¹ glukózy a 6 g.l⁻¹ agaru. Kultivace probíhala ve skleněných kultivačních zkumavkách (o velikosti 12 cm) obrázek 3, s hliníkovým uzávěrem opatřených otvorem vyplněným malým hranolem z molitanu pro zabezpečení výměny plynů mezi zkumavkou a okolním prostředím při zachování sterility obsahu zkumavky s 5 ml multiplikačního média v kultivačním boxu viz obrázek 3 při teplotě 25, fotoperiodou 16/8, intenzitou FAR a subkultivačním intervalu 8 týdnů.



Obrázek 3 Kultivační médium (autor práce)

Na obrázku 3 jsou znázorněny kultivační skleněné zkumavky (velikost 12 cm) s hliníkovým uzávěrem opatřených otvorem vyplněným malým hranolem z molitanu. Do každé zkumavky bylo aplikováno 5 ml standardního média podle Murashige a Skoog (1962) se sníženým obsahem dusíku bez fytohormonů s 20 g.l⁻¹ glukózy a 6 g.l⁻¹ agaru.

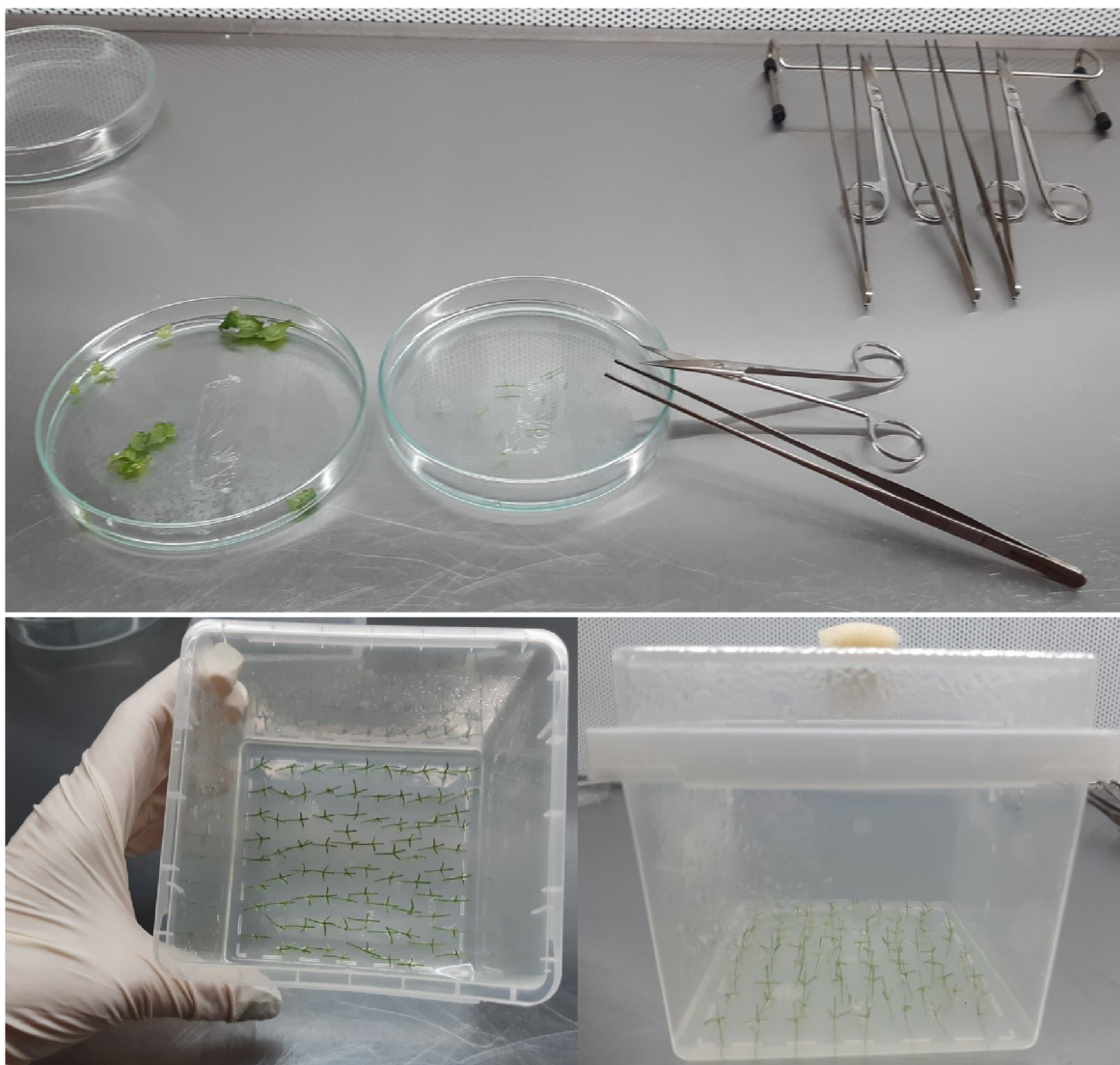


Obrázek 4 Kultivační box Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v. v. i. (autor práce)

Na obrázku 4 je znázorněn kultivační box, ve kterém byly rostliny předpěstovány. Kultivační box se nachází v prostorách Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v. v. i.. Boxy jsou řízeny automaticky. Délka fotoperiody je 16/8 a teploty kolem 25 °C.

4.3 Multiplikace

Multiplikace probíhala ve sterilních podmínkách laminárního boxu prostřednictvím jednonodálních stonkových segmentů, které se stříhaly pomocí sterilních nůžek a pinzety do sterilní destilované vody, aby se předešlo k jejich zaschnutí působením proudu vzduchu. Z jednoho stonkového výhonu lze nastříhat obvykle 4 jednonodální segmenty, z jednoho segmentu vyrůstají obvykle dva stonkové výhony z paždí listů vzhledem ke vstřícnému postavení listů na segmentu. Pro každou použitou variantu a jedno opakování bylo namnoženo 100 jednonodálních segmentů viz obrázek 5, které byly umístěny v plastových kultivačních boxech (11x10 x10 cm) s 50 ml multiplikačního media.



Obrázek 5 Multiplikace rostlinného materiálu (autor práce)

Na obrázku 5 je znázorněn proces multiplikace chmele v laminárním boxu. Propagace probíhala v Petriho miskách (15 cm), kde explantáty chmele byly ponořeny ve sterilní vodě a následně nastříhány. Na rostlinný materiál byly použity sterilní nůžky a pinzety na nastříhání jednonodálních segmentů a manipulaci s nimi. Segmenty chmele byly vysazeny do plastových kultivačních krabiček s 50 ml média. V jedné krabičce bylo pěstováno 100 kusů jednonodálních segmentů o velikosti do 2 cm.

4.4 Otuzování explantátů osmoticky a nízkou teplotou

Pro ověření stanovených vědeckých hypotéz byly otestovány čtyři varianty předkultivace rostlin. První varianta (kontrolní), zahrnovala rostliny, které nebyly ošetřeny ani osmoticky ani nízkou teplotou. Druhá varianta byla ošetřena osmoticky prostřednictvím roztoku 0,7 M sacharózy, který byl aplikován do plastových kultivačních boxů obsahujících nodální segmenty chmele. Třetí varianta byla ošetřena nízkou teplotou, a to přenesením plastových kultivačních boxů s nodálními segmenty do kultivační komory se sníženou

teplotou (5 °C). Čtvrtá varianta zahrnovala působení obou faktorů, nízké teploty a osmotického působení.

Samotná aplikace výše zmíněných faktorů probíhala následovně. Po přípravě potřebného množství nodálních segmentů (100 ks na variantu a opakování) byly rostliny umístěny do kultivačního boxu za standardních podmínek, ve kterých probíhala multiplikace explantátů. Kultivace probíhala po dobu 11 dní, dokud z postranních pupenů nevyrostly axilární výhony o velikosti přibližně 1 cm a dvěma plně vyvinutými listy. V této růstové fázi byly pro další zásahy připraveny kontrolní rostliny nebo probíhalo otužování segmentů. Ve druhé variantě byl aplikován roztok 0,7 M sacharózy a pokračovala kultivace za nezměněných podmínek po dobu dalších 7 dní. Třetí a čtvrtá varianta byly přeneseny do kultivačního boxu se sníženou teplotou (5 °C). Po 7 dnech otužování byla použita třetí varianta pro další zásahy a ke čtvrté byl aplikován roztok 0,7 M sacharózy, viz obrázek 6 na dalších 7 dní.

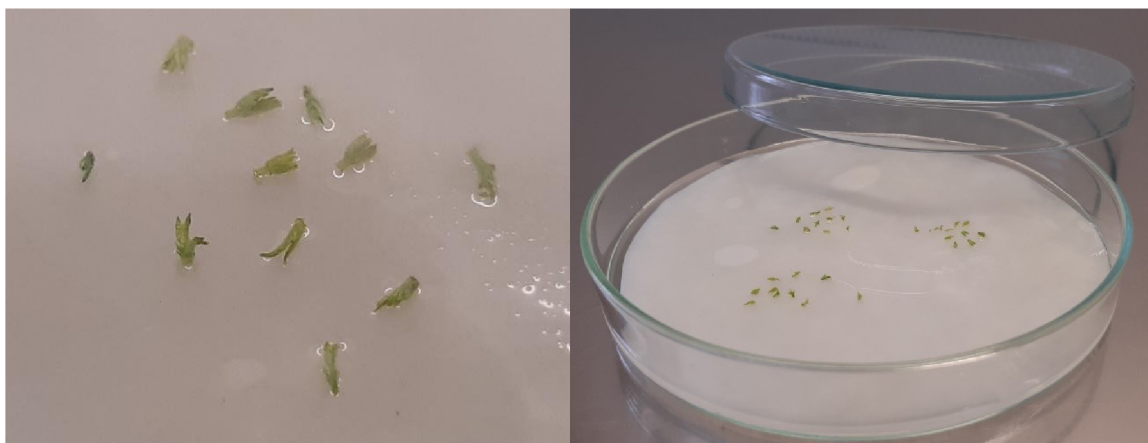


Obrázek 6 Sycení explantátů chmele 0,7 M sacharózou (autor práce)

Obrázek 6 znázorňuje zalévání explantátu chmele otáčivého roztokem 0,7 M sacharózy bez přidání fytohormonů po nárůstu axilárních výhonů (velikost 1 cm). Aplikace sacharózy byla provedena v laminárním boxu.

4.5 Izolace vzrostných vrcholů

Nodální segmenty kontrolní varianty a variant otužovaných osmoticky, nízkou teplotou a oběma těmito faktory byly použity pro další ošetření. Nodální segmenty byly vyjmuty z kultivačních plastových boxů ve sterilních podmínkách laminárního boxu a byly pomocí sterilní injekční jehly (20 x 0,8 mm) nasazené na sterilní stříkačce (10 ml) izolovány vzrostné vrcholy o velikosti přibližně 2 mm s využitím speciálně připravené podložky s milimetrovým měřítkem umístěné pod skleněnou sterilní Petriho miskou obrázek 7, na které probíhala izolace vzrostných vrcholů.

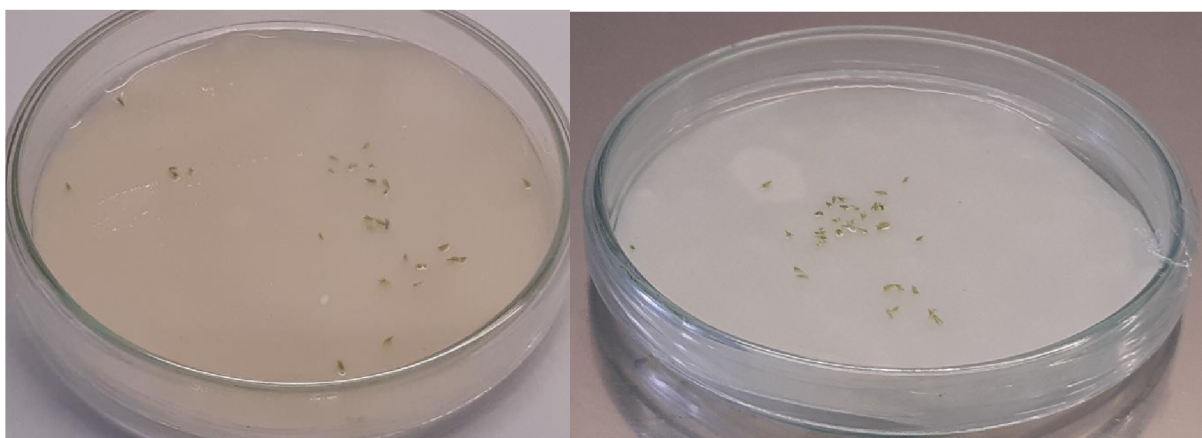


Obrázek 7 Izolace vzrostných vrcholů (autor práce)

Na obrázku 7 jsou znázorněny vzrostné vrcholy chmelové rostliny po izolaci na Petriho miskách v roztoku sacharózy s fytohormonami (14 ml). Velikost vrcholů se pohybuje mezi 1 – 2 mm. Vzrostné vrcholy byly izolovány pomocí jednorázové jehly, v Petriho miskách v laminárním boxu. Velikost vrcholů byla měřena pomocí podložky s milimetrovým měřítkem.

4.6 Sycení vzrostných vrcholů

Izolované vzrostné vrcholy byly umístěny do sterilní Petriho misky (d 10 cm) s 2 ks sterilních filtračních papírů (KA 1-M, velmi savý, velikost 110 mm) nasycených roztokem 0,7 M sacharózy (14 ml) viz obrázek 8, s přidavkem fytohormonů (BAP, IBA, GA₃). Petriho misky byly umístěny do kultivačního boxu na 20 hodin za stejných kultivačních podmínek jako pro multiplikaci rostlin a zakryty dvěma listy papíru pro vyhnutí se světelnému stresu.



Obrázek 8 Sycení vzrostných vrcholů (autor práce)

Na obrázku 8 jsou znázorněny vyizolované vzrostné vrcholy, které jsou položeny do sacharózy s fytohormonami. Vrcholy zde byly ponechány 20 hodin v kultivačním boxu při teplotě 22 °C. Po uplynutí uvedené doby byly vrcholy dále zpracovány (dehydratace, kryoprezervace atd.).

4.7 Řízená dehydratace

Sacharózou nasycené vzrostné vrcholy byly pomocí injekční jehly přesunuty na hliníkové plíšky (4x10 mm) v počtu 10 ks. Hliníkový plíšek se vzrostnými vrcholy obrázků byly pro další manipulaci umístěny do malých sterilních Petriho misek (d 4 cm). Petriho misky s hliníkovými plíšky byly zváženy prázdné, po umístění vzrostných vrcholů a po jejich dehydrataci nad silikagelem. Dehydratace vzrostných vrcholů nad silikagelem (50 g) probíhala v otevřených malých Petriho miskách s hliníkovými plíšky umístěných ve sterilních skleničkách (200 ml) s kovovým víčkem po dobu 100 minut (viz obrázek 9).



Obrázek 9 Stav vzrostných vrcholů před a po dehydrataci (autor práce)

Na obrázku 9 jsou znázorněny vzrostné vrcholy odrůdy 'Gaia' kontrolní varianty při procesu kryoprezervace. Obrázky znázorňují rozdíly velikosti vzrostných vrcholů před a po dehydrataci. Rostliny byly vysušovány 100 minut v uzavřených skleněných nádobách nad silikagelem v laminárním boxu.

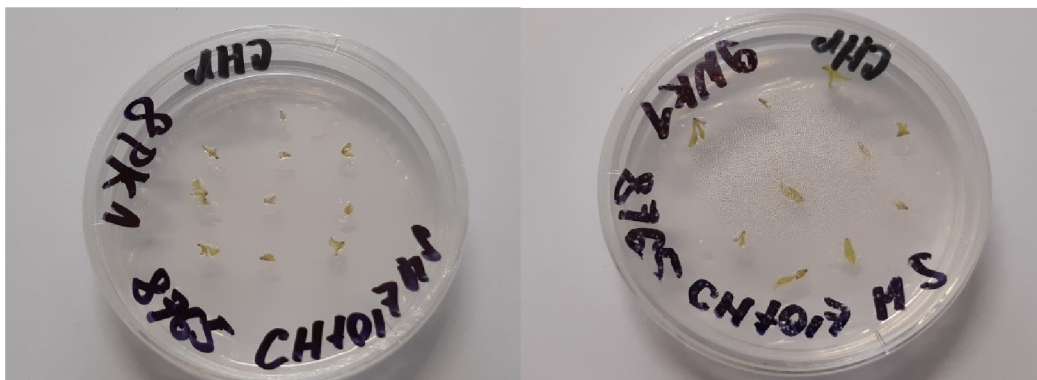
4.8 Kryoprezervace

Dehydratované vzrostné vrcholy na hliníkových plíškách byly rychle vloženy do kapalného dusíku (-196 °C), kde byly ponechány 60 minut v kryozkumavkách. Před samotným procesem mražení byla do laminárního boxu umístěna polystyrénová krabice, do které byl nalit kapalný dusík a vloženy kryozkumavky, které byly také naplněny tekutým dusíkem. Po dehydrataci byly plíšky s rostlinným materiálem pomocí sterilní pinzety vloženy do polystyrénové krabice s tekutým dusíkem. Po vychlazení vzrostných vrcholů byly plíšky umístěny do kryozkumavky a uzavřené víčkem.

4.9 Životoschopnost

Vzrostné vrcholy chmele po jejich dehydrataci nad silikagelem a po jejich kryoprezervaci v kapalném dusíku byly vysazeny na regenerační médium, které mělo shodné složení jako médium multiplikační, ale s přísadkou fytohormonů (BAP, IBA, GA₃) a vyšším obsahem glukózy 40 g.l⁻¹. Plíšky se vzrostnými vrcholy byly vyjmuty z kapalného dusíku u kryoprezervované varianty nebo z Petriho misky u varianty dehydratované, a ponořeny do sterilní destilované vody ohřáté na 40 °C. Vzrostné vrcholy uvolněné ve vodní lázni

z plíšků byly okamžitě vyjmuty a přeneseny v kapce vody na regenerační medium. Životnost byla stanovena po dvou týdnech kultivace, obrázek 10.

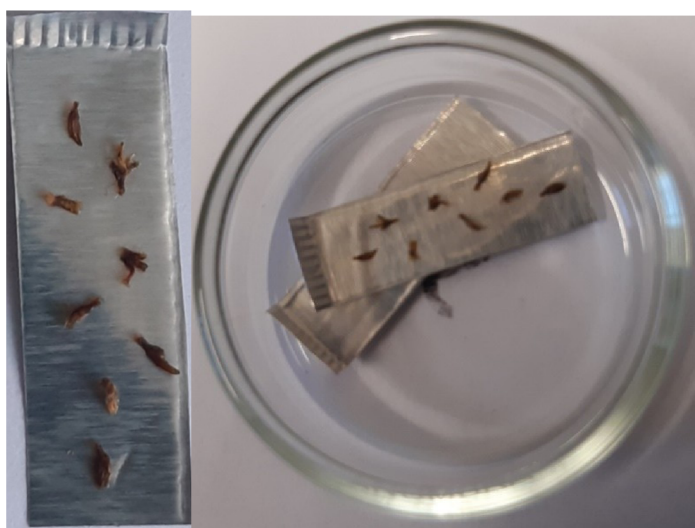


Obrázek 10 Porovnání nezamražené kontroly a zamražené varianty (autor práce)

Na obrázku 10 jsou znázorněny varianty zamražené a nezamražené kontroly. Jedná se o variantu, která představuje působení osmotického stresu a chladu, u odrůdy 'Žateckého poloraného červeňáku'. Fotografie byly pořízeny dva týdny po vysazení vzrostných vrcholů na regenerační médium. V této době se vyhodnocuje životaschopnost vrcholů na základě růstu a zbarvení chlorofylu.

4.10 Stanovení obsahu vody

Obsah vody byl stanoven gravimetricky, na základě rozdílu hmotností čerstvých vzorků nebo dehydratovaných nad silikagelem a vzrostných vrcholů vysušených v sušárně při 105 °C, a vyjádřen jako hmotnost vody (g) na jednotku hmotnosti sušiny (g).



Obrázek 11 vysušené vzrostné vrcholy (autor práce)

Na obrázku 11 jsou zobrazeny vzrostné vrcholy po vysušení v sušárně při 105 °C. Vrcholy byly v první fázi dehydratovány nad silikagelem a následně umístěny do sušárny,

kde byly ponechány tři dny a následně zváženy. Podle hmotnosti vzrostných vrcholů v čerstvém stavu a po dehydrataci a následného vysušení lze vyjádřit hmotnost vody.

4.11 Stanovení termických charakteristik

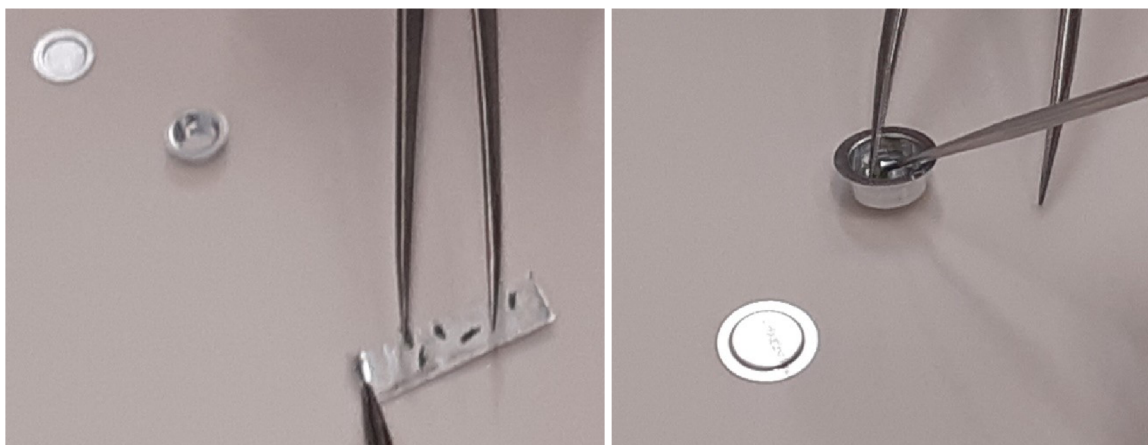
Termické charakteristiky vzrostných vrcholů chmele (teplota mrznutí, teplota tání, teplota skelného přechodu, entalpie tání) byly stanoveny pomocí diferenčního skenovacího kalorimetru s využitím přístroje Discovery X3 DSC a řídicího a vyhodnocovacího softwaru Trios od firmy Waters, obrázek 12. Měření probíhalo v teplotním rozsahu -90 až $+25$ °C, při rychlosti chlazení i ohřevu 10 °C / min. v hliníkových, hermeticky uzavřených pánvičkách dusíkové atmosféře (N 5.0). Na základě velikosti entalpie tání byl vypočítán obsah zmrzlé vody.



Obrázek 12 Diferenční skenovací kalorimetrie Discovery X3 DSC (autor práce)

Na obrázku 12 je znázorněn přístroj diferenční skenovací kalorimetrie, který funguje na principu termické analýzy (teplota mrznutí, teplota tání, teplota skelného přechodu, entalpie tání). Běžný teplotní rozsah přístrojů je -100 až 600 °C.

Vzorky se do přístroje vkládají v zalisovaných hliníkových pánvičkách, které se skládají ze dvou částí. První část je spodní kalíšek, do kterého se vkládá vzorek a druhá část je víčko, které se opatrně přiloží na naplněný kelímek vzorkem a zalisuje se. Během vkládání vzorků do pánvičky se využívají speciální nástroje, na nic se nesahá rukou. Vzorky se opatrně pomocí nástrojů přenesou na filtrační papír, očistí se a následně se vloží do pánvičky obrázek 13, na kterou se dále vloží víčko a zalisuje se.



Obrázek 13 Příprava vzorků do přístroje DSC (autor práce)

Obrázek 13 zobrazuje přenos vzrostných vrcholů chmele po dehydrataci, které byly vloženy do pánvičky, která po uzavření a zalisování byla vložena do přístroje DSC.

4.12 Statistické vyhodnocení pokusů

Všechny realizované experimenty proběhly ve třech nezávislých opakováních. Pro každou variantu a v každém opakování bylo použito 10 rostlin, tj. celkem 30 rostlin. Statistické hodnocení bylo provedeno s využitím programu Statistika 14.0 a pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu. Hodnoty, které byly vyjádřeny jako relativní četnost (životnost) byly před analýzou upraveny pomocí Arcsin transformace v tabulkovém editoru Excel ($\text{ARCSIN}(\text{ODMOCNINA}(p))$). Statistická významnost jednotlivých variant byla testována pomocí Fisherova LSD testu (LSD – least significant difference).

5 Výsledky

V této práci byl zkoumán vliv otužování explantátů chmele otáčivého (*Humulus lupulus* L.) pomocí nízké teploty a osmotickým působením na jejich schopnost otužit se vůči kryogenním teplotám u genotypů 8765 a 14635. Pro dosažení tohoto cíle byly zvoleny čtyři pokusné varianty předkultivace, otužování, explantátů. Varianta bez jakéhokoliv zásahu byla variantou kontrolní (K), vůči které se porovnávali varianty ostatní. Další varianta byla otužena nízkou teplotou (5 °C), třetí varianta byla otužována osmoticky působením roztoku 0,7 M sacharózy a poslední varianta byla otužována kombinovaným působením nízké teploty a roztoku sacharózy. Míra přizpůsobení se rostlin stresovým podmínkám a jejich schopnost otužit se po působení specifického způsobu předkultivace byl hodnocen na základě životaschopnosti explantátů po působení silné dehydratace a následném působení kryogenních teplot.

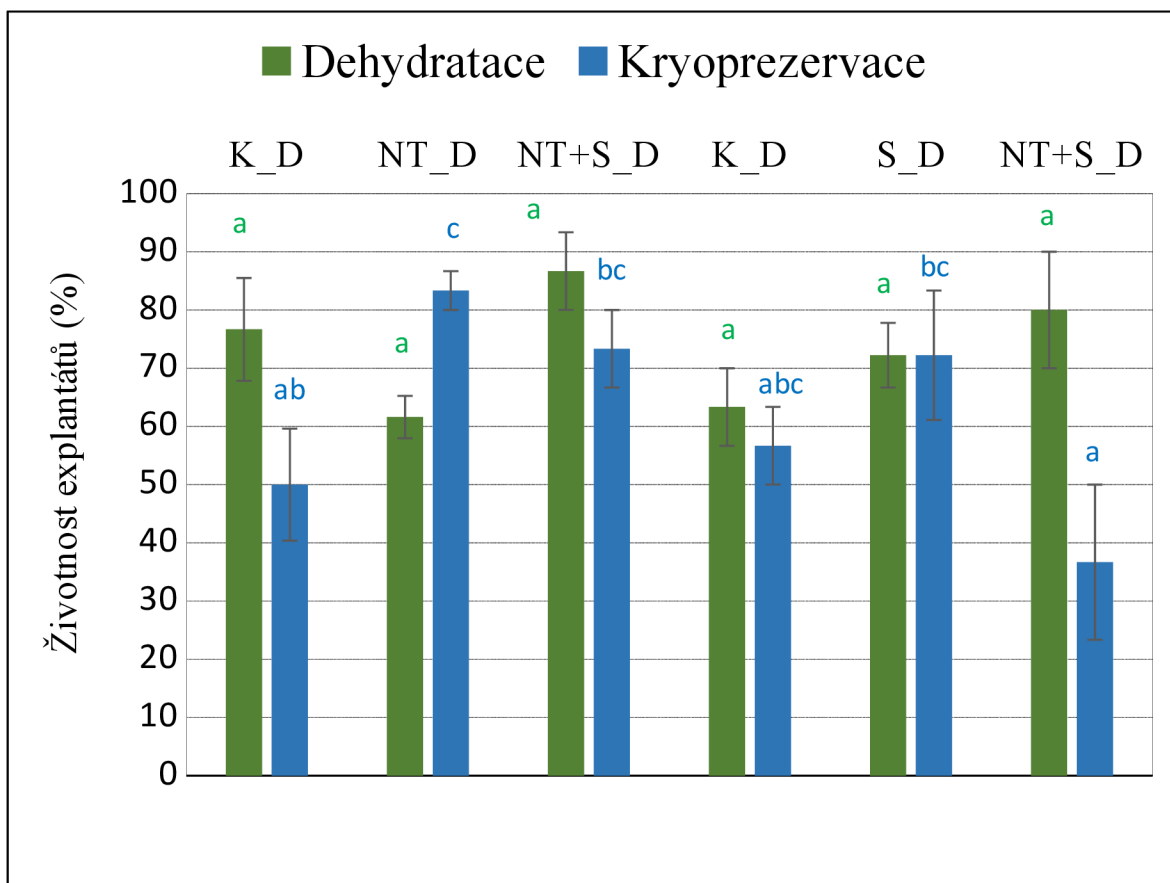
Pro objasnění procesů souvisejících s mrznutím vody v rostlinných pletivech, které obvykle způsobuje jejich poškození, byly pomocí diferenčního skenovacího kalorimetru měřeny termické charakteristiky: teplota mrznutí, teplota tání, skupenské teplo při mrznutí a tání, teplota skelného přechodu, a dále byl na základě výše uvedených parametrů vypočítán podíl krystalické vody. Dále byl u obou genotypů stanoven obsah vody vzrostných vrcholů po každém pokusném zásahu.

5.1 Životaschopnost explantátů chmele po působení stresu dehydratace a kryoprezervaci

Životaschopnost vzrostných vrcholů se vyhodnocovala dva týdny po kryoprezervaci po nasazení vzrostných vrcholů na regenerační médium. Za životaschopné byly považovány vzrostné vrcholy, u nichž byl patrný růst a nedocházelo k degradaci chlorofylu.

Z obrázku 14 je patrné, že nejvyšší životaschopnost vzrostných vrcholů vykazovala v průměru nezamražená, dehydratovaná varianta u genotypu 8765 po otužení nízkou teplotou společně s roztokem sacharózy, a to 86,7 %. Tato hodnota však nebyla statisticky významně odlišná od životnosti explantátů u kontrolních rostlin, která činila 76,7 %. Životaschopnost ostatních variant po dehydrataci byla nižší v rozsahu mezi 60 a 65 %.

Nejvyšší životnost po kryoprezervaci byla zjištěna v průměru u varianty otužované nízkou teplotou a to 83,3 % u genotypu 8765. Druhá nejvyšší životnost explantátů po kryoprezervaci byla zjištěna u varianty otužované kombinací nízké teploty a sacharózy a to 73,3 % také u genotypu 8765. U neotužených variant byla hodnota životnosti explantátů po kryoprezervaci nižší u obou genotypů, 8765 i 14635 a to 50, respektive 5,7 %.



Obrázek 14 Životnost vzrostných vrcholů chmele, genotypů 8765 a 14635, kontrolních podmínek kultivace bez otužování (K), po otužování nízkou teplotou (NT). Po otužování sacharózou (S) a po otužování oběma faktory, nízkou teplotou a sacharózou (NT+S) po dehydrataci (D). Hodnoty sloupcového grafu jsou průměrem tří nezávislých opakování, chybové úsečky reprezentují standardní chybu průměru. Varianty označené různými písmeny stejné barvy (a, b, c, d, e) jsou vzájemně statisticky významně odlišné na hladině významnosti 0,05 dle Fisher-LSD post-hoc testu po provedení jednofaktorové analýzy variance.

5.2 Termické vlastnosti vzrostných vrcholů chmele po působení osmotického stresu, nízké teploty a dehydratace

Otužování explantátů chmele mělo vliv na sledované parametry termické analýzy: teplota mrznutí a tání charakterizovaná jako tzv. onset, teplota skelného přechodu charakterizována jako střední hodnota změny tepelného toku fázového přechodu a skupenské teplo fázového přechodu (mrznutí a tání) při chlazení z +25 do -90 °C a při ohřevu z -90 do +25 °C. Ze zjištěného množství skupenského efektu fázových přechodů byl vypočítán podíl krystalické vody z celkového množství vzorku (Tabulka 1 pro genotyp 8765, Tabulka 2 pro genotyp 14635). Dále byl stanoven celkový obsah vody a vyjádřen v g vody na 1 g sušiny.

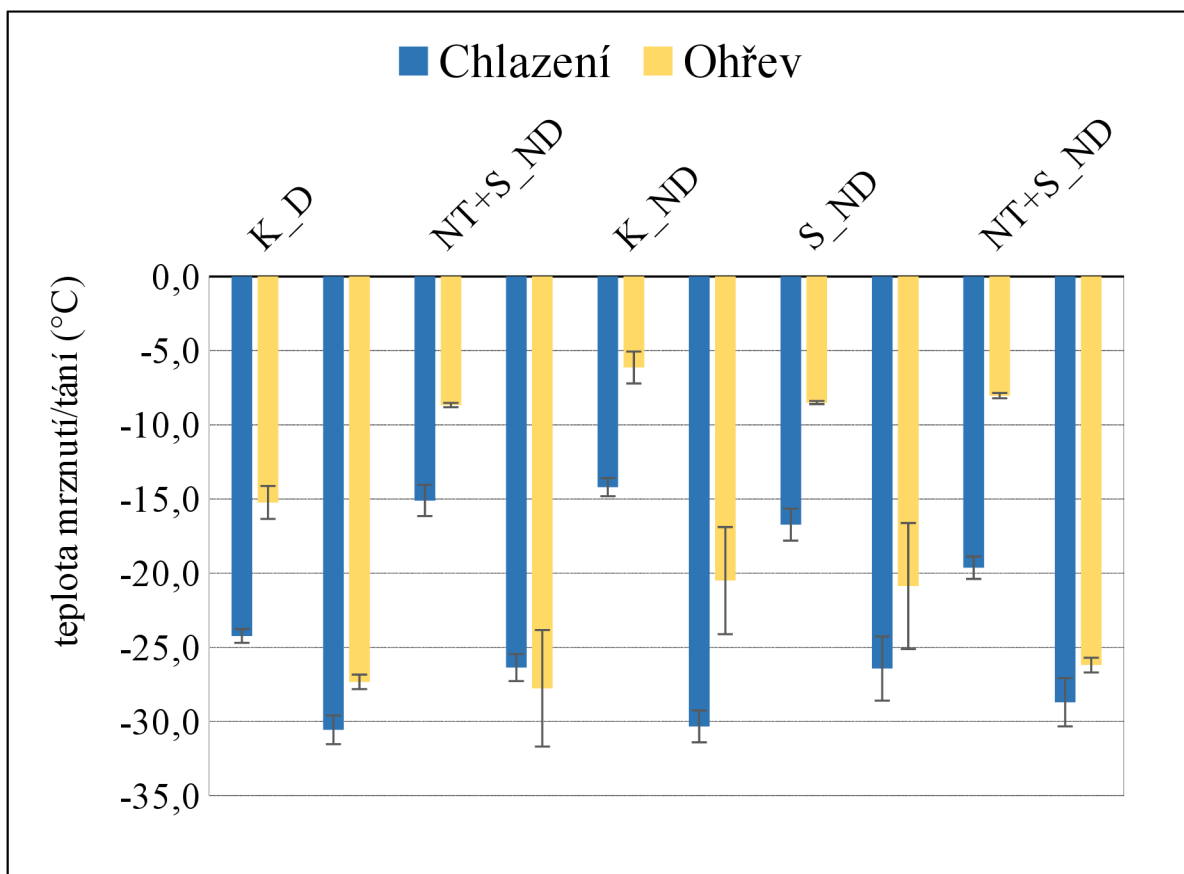
Nejvyšší obsah zmrzlé vody byl zjištěn při ohřevu u kontrolních, neotužených rostlin genotypu 14635 (Tabulka 2) bez jakéhokoliv dalšího pokusného zásahu (52,7 %), ale i u varianty otužené společným působením nízké teploty a sacharózy ještě před dehydratací vzrostných vrcholů nad silikagelem (51 %). Další variantou s vysokým obsahem zmrzlé vody byl zjištěn u rostlin otužených společným působením nízké teploty a sacharózy před dehydratací nad silikagelem u genotypu 8765 ve výši 47,9 %. Vysoký obsah zmrzlé vody byl zjištěn dále u varianty otužované sacharózou před dehydratací nad silikagelem u genotypu 14635 a to 43,8 %. Z dehydratovaných variant nad silikagelem byl zjištěn nejvyšší obsah zmrzlé vody u varianty kontrolních rostlin genotypu 8765 po jejich dehydrataci nad silikagelem, a to 14,4 %. Více dehydratované byly vzorky varianty otužené společným působením nízké teploty a sacharózy a následné dehydrataci s podílem krystalické vody 5,5 %. Ještě více byly dehydratované vzorky genotypu 8765 otužené nízkou teplotou po sycení 0,7 M roztokem sacharózy a následné dehydrataci s podílem krystalické vody 3,7 %. Nejnižší obsah krystalické vody byl zjištěn u varianty kontrolních rostlin genotypu 14635 po následné dehydrataci nad silikagelem s podílem krystalické vody 1,2 %.

Tabulka 1 Výsledky termické analýzy vzrostných vrcholů chmele, genotypu 8765. Každé ze tří nezávislých opakování je průměrem měření 10 jedinců, \bar{x} znázorňuje hodnotu průměru a SE standardní chybu průměru.

Varianta	Opakování	Chlazení			Ohřev				
		Teplota mrznutí – onset (°C)	Skupenské teplo (J/g)	Podíl krystalické vody na 1 g FW	Teplota tání – onset (°C)	Skupenské teplo (J/g)	Podíl krystalické vody na 1 g FW	Teplota skelného přechodu (°C)	Obsah vody g vody/ g sušiny
8765 KONTROLA dehydratovaná	1	-24,3	40,8	12,2	-17,3	47,8	14,3		0,55
	2	-25,0	26,2	7,8	-14,9	32,0	9,6		0,39
	3	-23,4	50,1	15,0	-13,5	64,8	19,4		0,75
	\bar{x}	-24,2	39,0	11,7	-15,2	48,2	14,4		0,56
	SE	0,5	7,0	2,1	1,1	9,5	2,8		0,10
8765 NT dehydratovaná	1	-29,5	4,5	1,4	-26,5	9,3	2,8	-50,3	0,54
	2	-29,7	4,5	2,3	-27,3	12,8	3,8	-42,1	0,61
	3	-32,5	8,7	2,6	-28,2	14,5	4,4	-47,1	0,57
	\bar{x}	-30,6	5,9	2,1	-27,3	12,2	3,7	-46,5	0,57
	SE	1,0	1,4	0,4	0,5	1,5	0,5	2,4	0,02
8765 NT + SACHARÓZA ne-dehydratovaná	1	-13,0	146,0	43,7	-8,4	156,8	46,9		1,65
	2	-16,3	153,9	46,1	-8,7	162,9	48,8		1,80
	3	-16,0	147,6	44,2	-8,9	159,8	47,9		1,92
	\bar{x}	-15,1	149,2	44,7	-8,7	159,8	47,9		1,79
	SE	1,1	2,4	0,7	0,1	1,8	0,5		0,08
8765 NT + SACHARÓZA dehydratovaná	1	-25,0	9,9	3,0	-20,4	12,5	3,7	-34,8	0,36
	2	-28,1	6,6	2,0	-33,8	16,3	4,9		0,32
	3	-26,0	17,4	5,2	-29,1	26,7	8,0	-55,4	0,44
	\bar{x}	-26,4	11,3	3,4	-27,8	18,5	5,5	-45,1	0,37
	SE	0,9	3,2	0,9	3,9	4,2	1,3	8,4	0,03

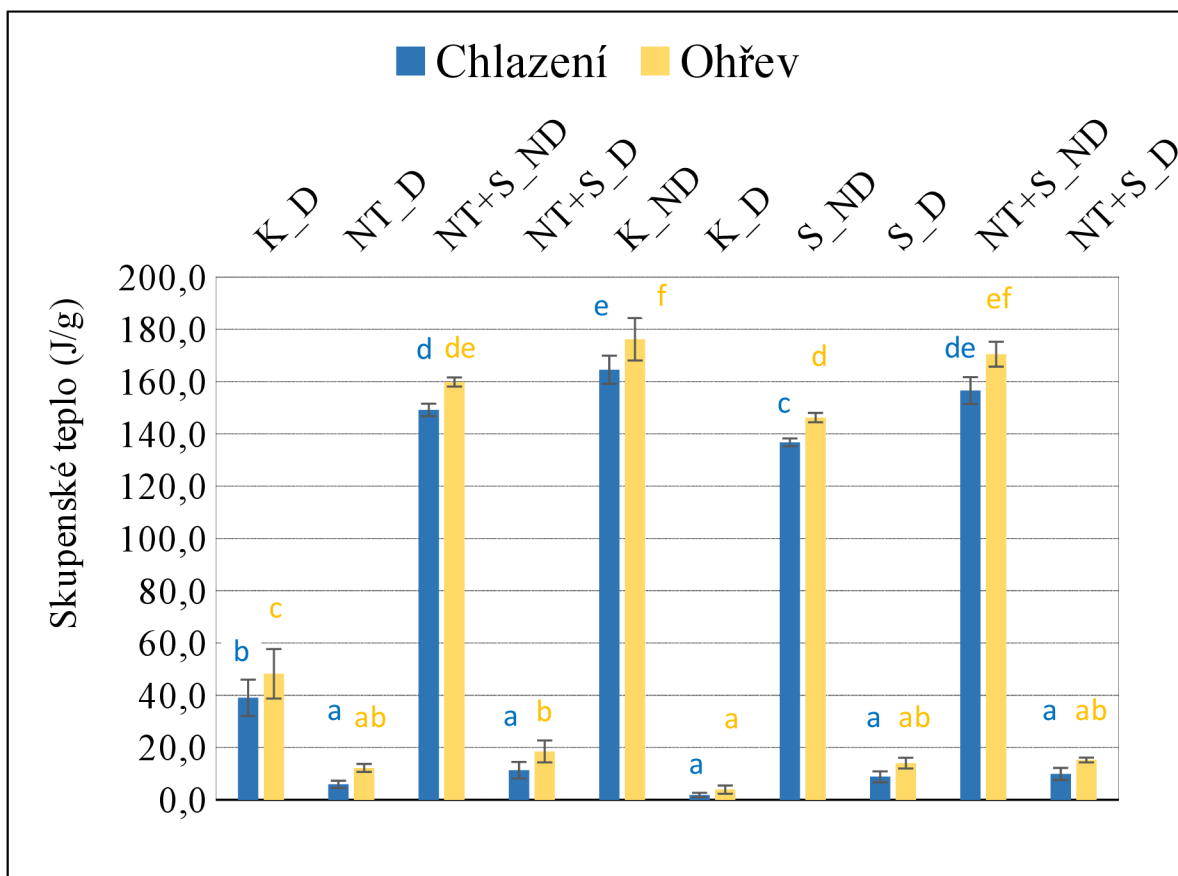
Tabulka 2 Výsledky termické analýzy vzrostných vrcholů chmele, genotypu 14635. Každé ze tří nezávislých opakování je průměrem měření 10 jedinců, \bar{x} znázorňuje hodnotu průměru a SE standardní chybu průměru.

Varianta	opakování	Chlazení			Ohřev				
		Teplota mrznutí – onset (°C)	Skupenské teplo (J/g)	Podíl krystalické vody na 1 g FW	Teplota tání – onset (°C)	Skupenské teplo (J/g)	Podíl krystalické vody na 1 g FW	Teplota skelného přechodu (°C)	Obsah vody g vody/ g sušiny
14635 KONTROLA ne- dehydratovaná	1	-13,8	157,7	47,2	-7,4	168,8	50,5		1,73
	2	-15,4	175,1	52,4	-4,0	192,4	57,6		2,13
	3	-13,4	160,8	48,1	-7,0	167,4	50,1		1,64
	\bar{x}	-14,2	164,5	49,2	-6,1	176,2	52,7		1,84
	SE	0,6	5,4	1,6	1,1	8,1	2,4		0,15
14635 KONTROLA dehydratovaná	1	-32,3	1,8	0,6	-25,2	7,0	2,1	-39,2	0,01
	2	-28,6	3,3	1,0	-13,4	2,7	0,8	-27,2	0,11
	3	-30,1	0,4	0,1	-22,9	2,0	0,6	-27,6	0,87
	\bar{x}	-30,3	1,8	0,6	-20,5	3,9	1,2	-31,3	0,33
	SE	1,1	0,8	0,3	3,6	1,6	0,5	3,9	0,27
14635 SACHARÓZA ne- dehydratovaná	1	-14,8	134,71	40,3	-8,6	143,1	42,8		1,63
	2	-18,5	139,6	41,8	-8,6	149,3	44,7		1,63
	3	-16,9	135,9	40,7	-8,3	146,4	43,8		1,59
	\bar{x}	-16,7	136,7	40,9	-8,5	146,3	43,8		1,62
	SE	1,1	1,5	0,4	0,1	1,8	0,5		0,0
14635 SACHARÓZA dehydratovaná	1	-27,1	12,9	3,9	-25,7	17,9	5,3	-51,1	0,35
	2	-22,4	7,5	2,2	-12,4	13,1	3,9	-43,7	0,35
	3	-29,8	6	1,8	-24,5	11,1	3,3	-31,6	0,31
	\bar{x}	-26,4	8,8	2,6	-20,9	14,0	4,2	-42,1	0,34
	SE	2,2	2,1	0,6	4,2	2,0	0,6	5,7	0,0
14635 NT + SACHARÓZA ne- dehydratovaná	1	-18,4	146,3	43,8	-8,1	161,0	48,2		2,21
	2	-21,0	161,7	48,4	-8,3	174,8	52,3		2,48
	3	-19,5	161,7	48,4	-7,7	175,7	52,6		2,95
	\bar{x}	-19,6	156,6	46,9	-8,0	170,5	51,0		2,5
	SE	0,8	5,1	1,5	0,2	4,8	1,4		0,2
14635 NT + SACHARÓZA dehydratovaná	1	-29,8	5,5	1,6	-26,7	13,4	4,0	-43,2	0,39
	2	-30,8	11,0	3,4	-25,2	16,0	4,8	-43,2	0,40
	3	-25,5	13,2	4,0	-26,7	16,2	4,8	-36,7	0,40
	\bar{x}	-28,7	9,9	3,0	-26,2	15,2	4,5	-41,0	0,40
	SE	1,6	2,3	0,7	0,5	0,9	0,3	2,2	0,0



Obrázek 15 Teplota mrznutí a tání vzrostných vrcholů chmele, genotypů 8765 a 14635, kontrolních podmínek kultivace bez otužování (K), po otužování nízkou teplotou (NT). Po otužování sacharózou (S) a po otužování oběma faktory, nízkou teplotou a sacharózou (NT+S), bez dehydratace (ND) a po dehydrataci (D). Hodnoty sloupcového grafu jsou průměrem tří nezávislých opakování, chybové úsečky reprezentují standardní chybu průměru. Varianty označené různými písmeny stejné barvy (a, b, c, d, e) jsou vzájemně statisticky významně odlišné na hladině významnosti 0,05 dle Fisher-LSD post-hoc testu po provedení jednofaktorové analýzy variance.

Z obrázku 15 je patrné, že nejvyšší vliv na pokles teploty mrznutí a tání měla dehydratace vzrostných vrcholů nad silikagelem (D) oproti variantám nedehydratovaným (ND). Dále je patrné, že všechny způsoby otužování explantátů, nízká teplota (NT), sacharóza (S) a působení obou faktorů (NT+S) mělo pozitivní vliv na pokles teploty mrznutí i tání u obou testovaných genotypů. U genotypu 14635 nebyla kontrolní varianta po dehydrataci (K_D) významně odlišná od varianty otužené sacharózou a dehydratovanou nad silikagelem (S_D). Nejnižší teplota tání po otužení a následné dehydrataci byla zjištěna u genotypu 8765 u variant otužených nízkou teplotou (NT_D) 27,8 °C, a nízkou teplotou spolu s působením sacharózy (NT+S_D), -27,3 °C, a u genotypu 14635 u varianty otužené rovněž nízkou teplotou spolu se sacharózou (NT+S_D), 26,2 °C.

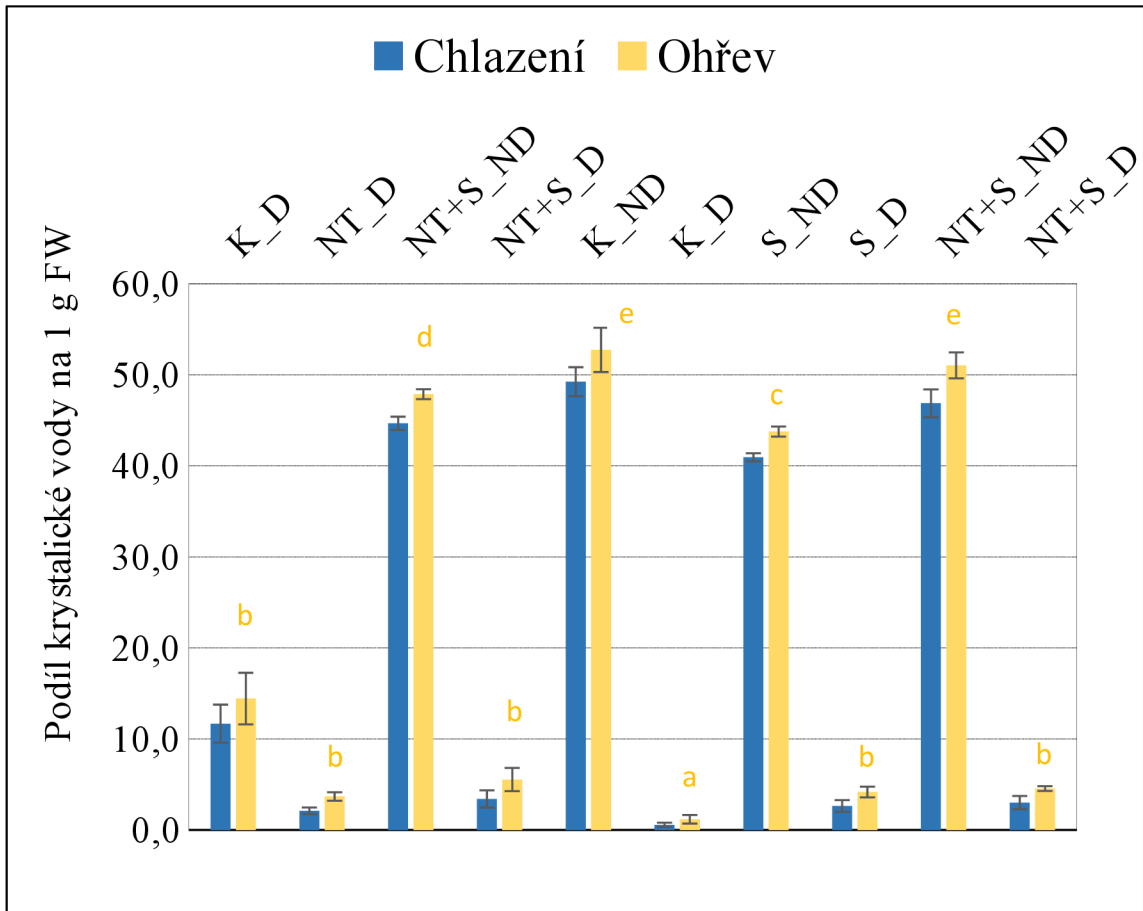


Obrázek 16 Skupenské teplo tání vzrostných vrcholů chmele, genotypů 8765 a 14635, kontrolních podmínek kultivace bez otužování (K), po otužování nízkou teplotou (NT). Po otužování sacharózou (S) a po otužování oběma faktory, nízkou teplotou a sacharózou (NT+S), bez dehydratace (ND) a po dehydrataci (D). Hodnoty sloupcového grafu jsou průměrem tří nezávislých opakování, chybové úsečky reprezentují standardní chybu průměru. Varianty označené různými písmeny stejné barvy (a, b, c, d, e) jsou vzájemně statisticky významně odlišné na hladině významnosti 0,05 dle Fisher-LSD post-hoc testu po provedení jednofaktorové analýzy variance.

Z obrázku 16 je patrné, že nedehydratované vzrostné vrcholy (ND) obsahují vysoké množství volné vody, které se projevuje velkým objemem skupenského tepla souvisejícím s krystalizací a tání vody ve vzorcích. Dehydratace vzrostných vrcholů nad silikagelem (D) vedlo k poklesu množství tohoto skupenského tepla u obou odrůd a všech variant. U genotypu 8765 byla tato hodnota nejnižší u varianty otužované nízkou teplotou (NT_D) a dále varianty otužované nízkou teplotou spolu se sacharózou (NT+S_D). Absolutně nejnižší hodnota skupenského tepla byla zjištěna u odrůdy 14635 u kontrolní varianty po dehydrataci. Hodnoty otužených variant pomocí sacharózy (S_D) a nízkou teplotou a sacharózou (NT+S_D) byly u tohoto genotypu srovnatelné s otuženými variantami genotypu 8765.

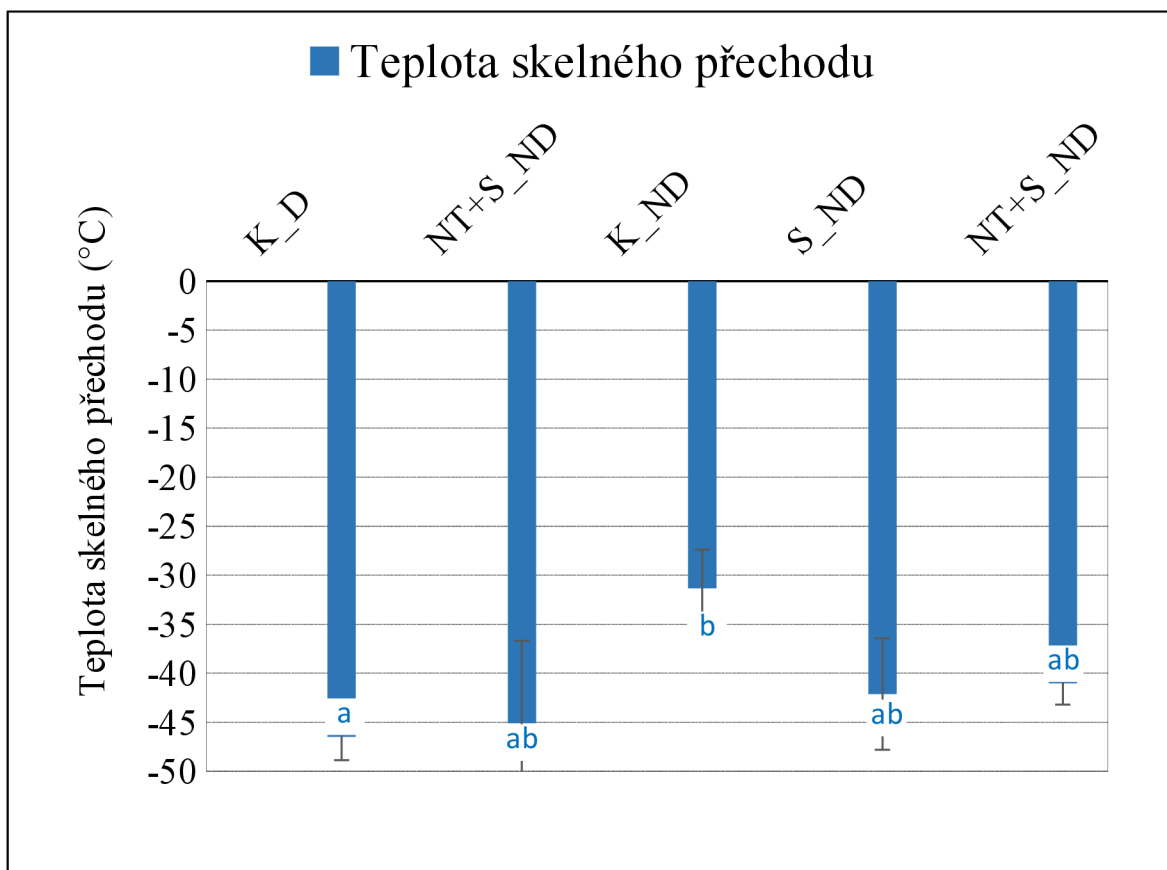
Hodnoty skupenského tepla mrznutí a tání odpovídají množství zmrzlé vody na obrázku 17. Zatímco u nedehydratovaných variant (ND) se pohyboval podíl zmrzlé vody od 40,9 % (genotyp 14635, varianta S_ND při chlazení) do 52,7 % (genotyp 8765, varianta K_ND při ohřevu). Hodnota podílu zmrzlé vody se pohybovala při ohřevu od 14,4 % u genotypu 8765 do 1,2 % u genotypu 14635. U otužených a následně dehydratovaných

variant byla hodnota podílu zmrzlé vody poměrně vyrovnaná a pohybovala se od 3,7 % do 5,5 % u genotypu 8765.



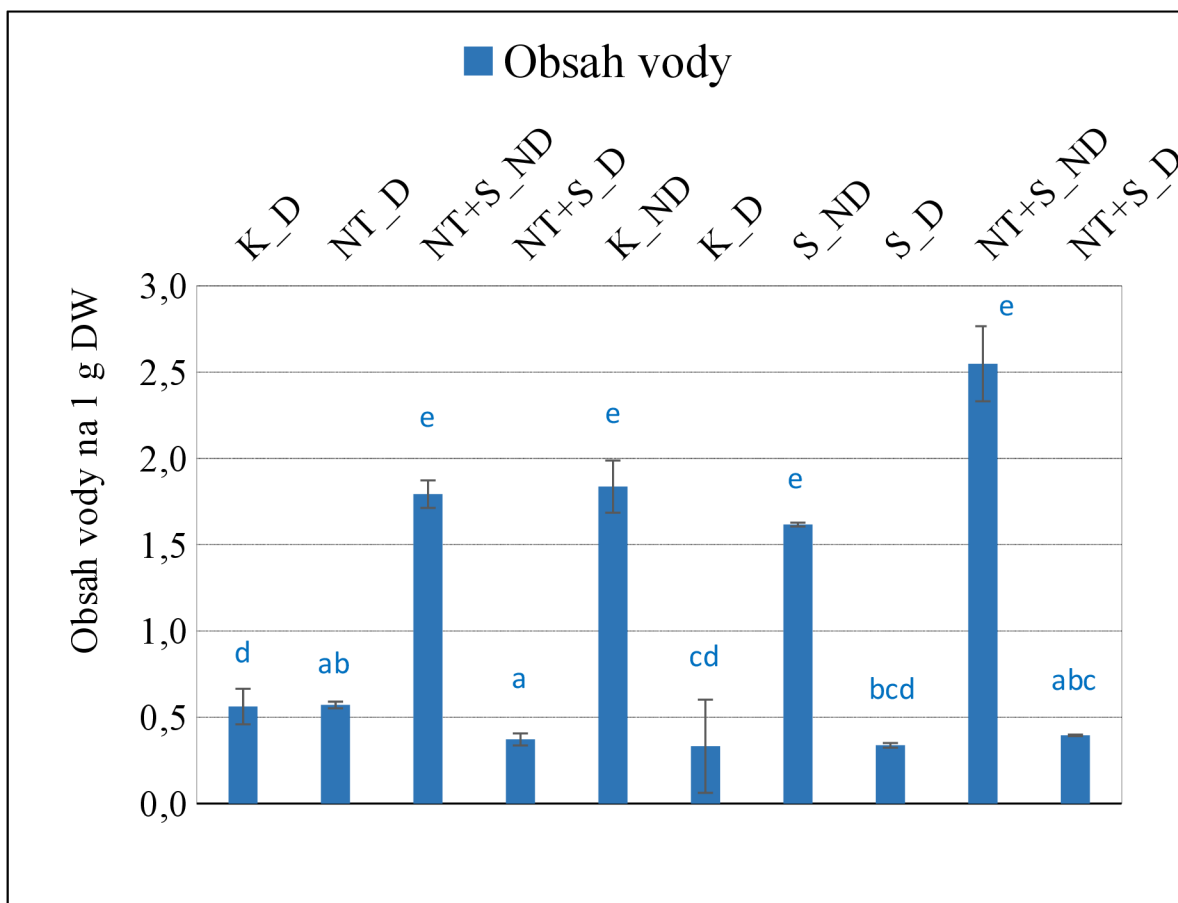
Obrázek 17 Podíl krystalické vody vzrostných vrcholů chmele, genotypů 8765 a 14635, kontrolních podmínek kultivace bez otužování (K), po otužování nízkou teplotou (NT). Po otužování sacharózou (S) a po otužování oběma faktory, nízkou teplotou a sacharózou (NT+S), bez dehydratace (ND) a po dehydrataci (D). Hodnoty sloupcového grafu jsou průměrem tří nezávislých opakování, chybové úsečky reprezentují standardní chybu průměru. Varianty označené různými písmeny stejné barvy (a, b, c, d, e) jsou vzájemně statisticky významně odlišné na hladině významnosti 0,05 dle Fisher-LSD post-hoc testu po provedení jednofaktorové analýzy variance.

Hodnoty teploty skelného přechodu na obrázku 18 byly zjištěny pouze u variant, které byly dehydratovány nad silikagelem (D). Nejvyšší hodnota byla zjištěna u kontrolní varianty genotypu 14635 a to $-31,3$ °C, u otužených variant jsou všechny hodnoty skelného přechodu nižší než -40 °C. U genotypu 8765 byla hodnota skelného přechodu u varianty otužené nízkou teplotou (NT_D) $-46,5$ °C a u varianty otužené společným působením nízké teploty a sacharózy (NT+S_D) $-45,1$ °C. U genotypu 14635 byla hodnota skelného přechodu u varianty otužené sacharózou (S_D) $-42,1$ °C a u varianty otužené společným působením nízké teploty a sacharózy (NT+S_D) $-41,0$ °C.



Obrázek 18 Teplota skelného přechodu vzrostných vrcholů chmele, genotypů 8765 a 14635, kontrolních podmínek kultivace bez otužování (K), po otužování nízkou teplotou (NT). Po otužování sacharózou (S) a po otužování oběma faktory, nízkou teplotou a sacharózou (NT+S), bez dehydratace (ND) a po dehydrataci (D). Hodnoty sloupcového grafu jsou průměrem tří nezávislých opakování, chybové úsečky reprezentují standardní chybu průměru. Varianty označené různými písmeny stejné barvy (a, b) jsou vzájemně statisticky významně odlišné na hladině významnosti 0,05 dle Fisher-LSD post-hoc testu po provedení jednofaktorové analýzy variance.

S hodnotami skelného přechodu, ale hlavně hodnotami podílu zmrzlé vody koresponduje i celkový obsah vody ve vzorcích na obrázku 19. Je patrné, že vysoký obsah vody byl zjištěn hlavně u variant nedehydratovaných nad silikagelem (ND), kdy se hodnoty obsahu vody pohybovaly od 1,62 g vody na g sušiny u genotypu 14635 u varianty otužované sacharózou (S_ND) po 1,84 g vody na 1 g sušiny u varianty kontrolní (K_ND). Otužené a dehydratované varianty se pohybovali v rozmezí hodnot od 0,34 u genotypu 14635 varianty otužené sacharózou (S_D) po 0,57 u genotypu 8765 u varianty otužované kombinací nízké teploty a sacharózy (NT+S_D).



Obrázek 19 Obsah vody vzrostných vrcholů chmele, genotypů 8765 a 14635, kontrolních podmínek kultivace bez otužování (K), po otužování nízkou teplotou (NT). Po otužování sacharózou (S) a po otužování oběma faktory, nízkou teplotou a sacharózou (NT+S), bez dehydratace (ND) a po dehydrataci (D). Hodnoty sloupcového grafu jsou průměrem tří nezávislých opakování, chybové úsečky reprezentují standardní chybu průměru. Varianty označené různými písmeny stejné barvy (a, b, c, d, e) jsou vzájemně statisticky významně odlišné na hladině významnosti 0,05 dle Fisher-LSD post-hoc testu po provedení jednofaktorové analýzy variance.

6 Diskuze

V této práci byla sledována účinnost metody kryoprezervace vzrostných vrcholů chmele otáčivého (*Humulus lupulus* L.), kde byla vyhodnocována životaschopnost vrcholů po vysazení na regenerační médium. Cílem bylo sledovat vliv osmotického stresu, chladu a působení obou stresů zároveň na samotný proces kryoprezervace. Životaschopnost se vyhodnocovala dva týdny po kryokonzervaci a sledovány byly vizuální znaky (růst, chlorofyl). Pro ověření stanovených vědeckých hypotéz byly otestovány čtyři varianty předkultivace rostlin. První varianta (kontrolní), zahrnovala rostliny, které nebyly ošetřeny ani osmoticky ani nízkou teplotou. Druhá varianta byla ošetřena osmoticky prostřednictvím roztoku 0,7 M sacharózy, který byl aplikován do plastových kultivačních boxů obsahujících nodální segmenty chmele. Třetí varianta byla ošetřena nízkou teplotou, a to přenesením plastových kultivačních boxů s nodálními segmenty do kultivační komory se sníženou teplotou (5 °C). Čtvrtá varianta zahrnovala působení obou faktorů, nízké teploty a osmotického působení.

Ozudogru & Kaya (2012) tvrdí, že předúprava explantátů je běžně používaný přístup, který zlepšuje přežití rostlin po kryoprezervaci, pokud je aplikovaná před vinitrifikací nebo současně. Mezi typické předúpravy patří vystavení rostlin nižší teplotě nebo předpěstování vzrostných vrcholů v médiu obsahující vysoké množství cukru k dehydrataci vrcholů před mražením. Výsledky jsou se schodou s touto prací, kde otužování chladem prokázalo vliv na přežití vzrostných vrcholů, a to na 83,3 %. Působení obou stresů zároveň vykazovalo o něco menších výsledků, a to 73,3 %, což představuje rozdíl 10 %. Tento rozdíl může být způsobený vlivem velikosti vzrostných vrcholů, které by měly být v ideálních podmínkách velké 2 mm. Velikost vzrostných vrcholů může mít značný vliv na samotný proces kryoprezervace, protože pro všechny vrcholy byly nastaveny stejné podmínky. V optimálních podmínkách se přizpůsobí doba dehydratace nad silikagelem velikosti vzrostných vrcholů. Standartní doba vysušování u chmelových rostlin činí 90 minut. Nejnižších výsledků dosahovaly neotužené varianty po kryoprezervaci u obou genotypů chmele. Na tomto základě lze tvrdit, že předúprava pomocí chladu a sacharózy přispěje k lepší životaschopnosti vzrostných vrcholů po procesu kryoprezervace.

Elliot et al. (2017) tvrdí, že přežití rostlin závisí na optimální dehydrataci pomocí kryoprotektivních látek (CPA – cryoprotective agent). Funkcí CPA je zabránit tvorbě ledu a kryogennímu poškození prostřednictvím interference vodíkových vazeb v molekulách vody (Towey & Dougan 2012). Z tohoto tvrzení vychází i výsledky této práce, kde se prokázal vliv CPA na samotný proces kryoprezervace a následné životaschopnosti. Otužované varianty chladem prokázaly nejlepších výsledků a následně varianty s působením obou stresů zároveň. Ze získaných výsledků se lze tedy domnívat, že působení obou stresů má značný vliv na životaschopnost vzrostných vrcholů po kryoprezervaci. Otužování 0,7 M roztokem sacharózy, která v pokusu sloužila jako kryoprotektivum, se významný vliv neprokázal u žádného genotypu. Větší vliv na proces kryoprezervace měl chlad, který z kryoprezervovaných variant dosahoval nejlepších výsledků, těsně za chladem byla varianta otužená oboumi stresy zároveň. Rozdíl mezi oběmi variantami činil kolem 10 %.

Byla testována hypotéza, že předkultura explantátů, zvýšení jejich tolerance k dehydrataci a významné snížení obsahu mrznoucí vody může zlepšit kryotoleranci

vzrostných vrcholů chmele. Úspěch kryoprezervace je ovlivněn citlivostí genotypu na konkrétní kryoprezervační proces a obvykle zahrnuje citlivost na silnou dehydrataci tkání (Benson 2008). Protože kryotolerance není přirozenou schopností žádného rostlinného druhu, zlepšení tolerance k dehydrataci může být způsob, jak se vyrovnat s podmínkami kryoprezervace. Předpoklad, že vysoká tolerance k dehydrataci umožňuje velmi masivní pokles obsahu vody, což omezuje vznik a letální růst ledových krystalů během chlazení do ultranízkých teplot. Pro aklimatizaci explantátů před jejich kryokonzervací bylo úspěšně použito přizpůsobení rostlin za nízkých teplot (Bilavčík et al. 2015) nebo současnou nízkoteplotní a osmotickou úpravu (Faltus et al. 2009).

Z výsledků přístroje DSC byly porovnány obsahy vody před dehydratací a po dehydrataci. Obsah zmrazitelné vody před dehydratací se pohyboval přibližně kolem 50 % v závislosti na variantě. Tato voda by mohla zapříčinit poškození rostlin během procesu kryoprezervace a následné životaschopnosti, proto je nezbytné z materiálu odstanit co největší množství této zmrazitelné vody dehydratací. Nejlepších výsledků po dehydrataci dosahovala varianta 'Žatecký poloranný červeňák', otužená nízkou teplotou s podílem krystalické vody 3,7 %. Varianta otužená společným působením nízké teploty a sacharózy a následné dehydrataci s podílem krystalické vody 5,5 %. Největší podíl zmrazitelné vody po dehydrataci vykazovala kontrolní varianta 'Žatecký poloranný červeňák'. Ze získaných výsledků se lze domnívat, že otužení chladem dosahuje nejlepších hodnot.

Beck et al. (2007) tvrdí, že pokles obsahu mrznoucí vody potvrdil schopnost explantátů chmele přizpůsobovat se nízké teplotě a osmotickému stresu. Toto snížení obsahu mrznoucí vody může nastat v důsledku snížení celkového obsahu vody nebo osmotické přizpůsobení, tj. akumulace osmoticky aktivních látek, jako jsou rozpustné cukry. Toto tvrzení se prokázalo i z výsledků této práce, kde se potvrdilo, že rostliny otužované nízkou teplotou a 0,7 M sacharózou dosahovaly vysokého úbytku vody 47,9 % před dehydratací a na 5,5 % po dehydrataci, což představuje pokles o 42,4 % vody. Tyto rostliny vykazovaly schopnost přežití více než 70 %.

Cukry (sacharóza, glukóza, mannitol a sorbitol) byly také aplikovány v kultivačním médiu pro výhonky před vystavením vitrifikaci nebo dehydrataci. K navození kryotolerance se nejčastěji používá sacharóza. Halmagyi et al. (2005) úspěšně prokázali zvýšenou toleranci ke kryokonzervaci aplikací 0,5 M sacharosové předkultury po dobu 24 hodin při 24 °C. Folgado et al. (2014) také prokázali zlepšenou obnovu meristémů po ošetření zvýšenou sacharózou (0,3 M) během 2 týdnů otužování matečných rostlin za studena. V této práci bylo použito ošetření explantátu chmele pomocí nízké teploty (5 °C) a 0,7 M sacharózou po dobu 14 dní. Ošetření za studena při 4 °C, aplikované po dobu 3 týdnů (Hirai & Sakai 1999) a 1 týdne (Halmagyi et al. 2005) neprokázalo žádné významné zlepšení ve srovnání s vitrifikací PVS2 bez otužování za studena. Zlepšení však bylo pozorováno, když se střídavé teploty [21–22/8 °C (den/noc)] aplikovaly po dobu 1 týdne na vylepšené evropské odrůdy brambor metodou kapkového zmrazování DMSO (Kryszczuk et al. 2006; Kaczmarczyk et al. 2011). Výzkum ukázal, že samotné přidání kryoprotektiv často neposkytuje dostatečnou ochranu proti smrtelnému poškození kryoprezervace. Chlad i osmotický stres, nebo jejich kombinace prokázalo pozitivní účinky na kryotoleranci u chmele, brambor (Chang et al. 2000; Reed et al. 2003; Leunufna & Keller 2005; Folgado et al. 2014). Toto tvrzení lze prokázat i v této práci, kde nejlepších hodnot po kryoprezervaci dosahovaly varianty

otužované chladem nebo společným působením chladu a 0,7 M sacharózou. U varianty otužované pouze 0,7 M sacharózou se neprojevil významný vliv na proces kryoprezervace a následné životaschopnosti.

Halmagyi et al. (2005); Hirai & Sakai (1999) použili předkultivační teplotu 4 °C a výsledky neprokázaly výrazné zlepšení ve srovnání s kontrolními ošetřeními. Kultivary testované v těchto studiích byly vylepšené odrůdy s žádnou nebo nízkou aklimatizační schopností. Jiné studie využívající předkultivaci při střídavých teplotách prokázaly, že předkultivace za studena po dobu 7 dnů při 21 nebo 22/8 °C (teplota den/noc) vedla ke zlepšení míry obnovy (Kryszczuk et al. 2006; Kaczmarczyk et al. 2008), kdy je aplikována kapková metoda DMSO. Očekávalo se, že genotypy odolné vůči mrazu budou reagovat pozitivně na kryokonzervaci a že ošetření sacharózou tuto odpověď zesílí bez ohledu na jejich schopnost aklimatizace na chlad. Oba genotypy *S. commersonii* mrazuvzdorné vykazovaly vysokou schopnost zotavit se z kryoprezervace bez ohledu na teplotu před kultivací nebo aplikované dávky cukru, což naznačuje, že schopnost tolerovat kryokonzervaci je způsobena jejich genetickými vlastnostmi namísto ošetření otužováním. Studie prokázaly, že plně aklimatizované genotypy *S. commersonii* snesou -10 °C (Bamberg et al. 2005), a proto není překvapivé vidět tak vysokou kryotoleranci tohoto druhu. Z výsledků této práce byl prokázán vliv otužování explantátů chmele (5 °C) po dobu 14 dnů. Otužovaná varianta po kryoprezervaci dosahovala nejlepších výsledků v přežití vzrostných vrcholů, a to více jak 83 %. Ostatní varianty vykazovaly menší schopnost přežití. Očekávalo se, že nejlepších výsledků bude dosahovat varianta, která byla vystavena společným působením chladu a 0,7 M sacharóze. Tato varianta dosahovala přibližně o 10 % nižší životaschopnosti než varianta otužovaná pouze chladem. Z tohoto důvodu se lze domnívat, že otužování chmelových explantátů před procesem kryokonzervace má zásadní vliv na samotnou metodu.

Aklimatizace na chlad se používá ve studiích mrazuvzdornosti a ošetření cukrem bylo použito ve výzkumu tolerance vůči suchu. Reakce rostlin na mráz a sucho znamená biochemické a molekulární změny. Změny v množství a složení membránových lipidů mohou chránit před poškozením způsobeným mrazem. Odezva na suchu souvisí hlavně se syntézou rozpuštěných látek potřebných k osmotické úpravě, jako jsou rozpustné cukry, prolin a glycin betain. U brambor několik studií odhalilo roli lipidů v buněčných membránách chránících před stresem (Palta 1994), akumulaci několika cukrů a osmoprotektivních látek (Mane et al. 2008; Evers et al. 2010), stejně jako genů a proteinů pro osmotickou úpravu (Schafleitner et al. 2007; Carvallo et al. 2011; Pino et al. 2013) a stabilitu membrány a oxidační homeostázu (Vasquez-Robinet et al. 2008; Folgado et al. 2014).

Studie Panta et al. (2014) zdůrazňuje velký rozdíl mezi mírou přežití a mírou zotavení. Ve všech případech byla míra zotavení mnohem nižší ve srovnání s mírou přežití s celkovým poklesem od přežití do zotavení přibližně o 25 %. To zdůrazňuje potřebu vývoje kryoprezervačních protokolů založených na rychlosti obnovy výhonků a nejen na přežití tkáně.

Obnova kryoprezervace u 80 % pěstovaných brambor pomocí předúpravy za studena otevírá cestu pro testování a aplikaci chladové aklimatizace ve větším měřítku (Panta et al. 2009). Vliv působení chladu během předkultivatizace explantátů chmele se ukázala jako vhodný nástroj k lepší životaschopnosti rostlin po kryoprezervaci. Tato varianta dosahovala úspěšnosti více jak 83 %, což v porovnání s předchozí studií je přibližně o 3 % více. Tyto

procenta mohou být zapříčiněny vlivem jiného druhu rostlin. Ve studii Panta et al. 2009 byly porovnávány odrůdy brambor, v této práci chmel.

Techniky vitrifikace představují zjednodušený kryogenní postup založený na dehydrataci rostlinné tkáně dosažené ošetřením kryoprotektivními sloučeninami s následným ponořením do vysoce koncentrovaných roztoků před uložením do LN (Danso & Ford-Lloyd 2011). Kromě toho vitrifikace umožňuje přechod vody z kapalné fáze do amorfni fáze nebo struktury skelného stavu, aby se zabránilo nukleaci ledových krystalů (Fahy et al. 1984). Čím méně vody, tím je přechod do vitrifikačního stavu méně rizikový, s menší pravděpodobností tvorby ledových krystalů uvnitř buněk. Fázové přechody rostlinných materiálů spojené se změnou teploty a tepelným tokem jsou měřeny diferenciální skenovací kalorimetrií (DSC), která přesně monitoruje množství tepla vyzařovaného nebo nadměrně absorbovaného vzorkem při změně teploty v čase (Gill et al. 2010). Dosud byl v celé rostlinné říši aplikován přístup termické analýzy v kombinaci s technikou vitrifikace, včetně druhů dřevin (Ryynänen & Aronen 2005; Vidal et al. 2005; Uchendu et al. 2010; Gantait et al. 2015).

Pomocí přístroje DSC bylo prokázáno, že nedehydratované vzrostné vrcholy obsahují vysoké množství volné vody, které se projevuje velkým objemem skupenského tepla souvisejícím s krystalizací a tání vody ve vzorcích. Dehydratace vzrostných vrcholů nad silikagelem vedlo k poklesu množství tohoto skupenského tepla u obou odrůd a všech variant.

Benelli et al. (2013) tvrdí, že rostlinný materiál s vysokým množstvím buněčné vody a tím ohrožený vnitrobuněčnou krystalizací vody (pupeny, špičky výhonků, nodální segmenty, embrya, kalusy a suspenze buněk) musí být chráněny dehydratací před zmrazením na rozdíl od přímé kryoprezervace některých rostlinných materiálů, ve kterých dochází k přirozeným dehydratačním procesům. V práci bylo prokázáno, že nejvyšší vliv na pokles teploty mrznutí a tání měly dehydratované rostliny oproti nedehydratovaným. Dále bylo prokázáno, že otužování explantátů chmele pomocí chladu, sacharózy a působení obou vlivů zároveň mělo pozitivní vliv na pokles teplot tání i mrznutí u obou testovaných genotypů. Nedehydratované vzrostné vrcholy obsahují vysoké množství volné vody, které se projevuje velkým objemem skupenského tepla souvisejícím s krystalizací a tání vody ve vzorcích. Dehydratace vzrostných vrcholů nad silikagelem vedlo k poklesu množství tohoto skupenského tepla u obou odrůd a všech variant.

Typ cukru použitý jako kryoprotektor je jedním z nejvýznamnějších parametrů, které je třeba charakterizovat při vývoji kryokonzervačního protokolu. Zprávy o kryoprezervaci technikou enkapsulace/dehydratace obvykle uvádějí jako jediný kryoprotektor sacharózu, která může kromě vyvolání osmotické dehydratace přispět k udržení plazmy a vnitřních buněk (Plessis et al. 1993). V této práci byl studován vliv 0,7 M sacharózy, která zde sloužila jako kryoprotektivum.

Byla studována *in vitro* konzervace při nízké teplotě a kryoprezervace pomocí enkapsulace-dehydratace a vitrifikace u plané hrušně (*Pyrus syriaca*). *In vitro* vypěstované mikrovýhonky (1,0 cm) plané hrušně byly skladovány při 4, 8 nebo 24 °C ve tmě po dobu 12 týdnů.

S poklesem skladovací teploty se snížil růst a kvalita explantátu (změnila se barva listů a zvýšilo se procento zahnědlých vzrostných vrcholů). Nízká teplota (4 °C) měla za následek nižší růst a přežití vzrostných vrcholů. Nicméně otužování *in vitro* při 8 °C dokázala snížit

růst a zachovat vitalitu explantátu. Při nízké teplotě (8 °C) opětovný růst a procento přežití bylo vysoké.

Zvýšení koncentrace sacharózy v médiu při předkultivaci na 0,75 M spolu s pětihodinovou dehydratací zlepšilo přežití (40 %) a opětovný růst (50 %) při použití enkapsulace dehydratace dehydratovaných vzrostných vrcholů (3,0 mm) po kryokonzervaci. Otuzování rostlinného materiálu za nízké teploty při 4 °C po dobu tří týdnů v temných podmínkách s následným použitím vitrificační metody zlepšilo přežití a opětovný růst kryokonzervovaných vzrostných vrcholů plané hrušně. Z výsledků vyplývá, že působení obou stresů zároveň vykazuje životaschopnost 73,3 %. Tento rozdíl mohl vzniknout na základě menší molární koncentrace sacharózy nebo kratší dobou dehydratace.

Studie Song et al. (2020) byla provedena za účelem zlepšení a doplnění systému kryoprezervace pro adventivní cibule lilie (*Lilium* spp.) cvs. 'Milky way'. Explantáty cibulí lilií (*Lilium* spp.) cvs. 'Mléčná dráha' cibulky a cibulek z vytvořených z šupin cibule lilie. Nejvyšší regenerace 65,7 % po kryoprezervaci byla dosažena pomocí PVS3 a byla získána při působení chladu (4 °C) po dobu 7 dní a posléze v osmotickém roztoku 35% PVS3 40 minut. Z výsledků práce vyplývá, že nejlepší životaschopnosti dosahovala varianta otuzovaná nízkou teplotou. Toto otužení přispělo k životaschopnosti vzrostných vrcholů chmele 'Žatecký poloranný červeňák', a na 83,3 %. Otuzení trvalo dva týdny při teplotě 5 °C.

Předkultura nebo předpěstování zahrnuje vystavení rostlinek nebo explantátů *in vitro* na médiu doplněném kryoprotektivy, jako je sacharóza nebo glukóza, před zmrazením do kapalného dusíku (LN - liquid nitrogen). I toto tvrzení lze z výsledků potvrdit, protože nejhorších výsledků po kryokonzervaci prokazovaly neotužované varianty u obou genotypů. Z tohoto zjištění lze vycházet a tvrdit, že značný vliv na životaschopnost vzrostných vrcholů mají otuzované varianty.

Dehydratace před růstem byla poprvé popsána Uragami et al. (1990) u postranních pupenů chřestu. Tato technika má výhodu v tom, že je jednoduchá a nákladově efektivní, vyhýbá se použití toxických kryoprotektiv. Tato technika byla aplikována na zygotická a somatická embrya a také meristémy některých druhů, jako je mrkev, banán, lilie, hruška a datle (Engelmann 2004; Kaviani 2011).

Ze získaných výsledků lze tvrdit, že otuzování nízkou teplotou explantátů chmele přispělo k vyšší životaschopnosti vzrostných vrcholů po kryokonzervaci. Dále lze tvrdit, že otuzování osmotickým stresem přispělo k lepší životaschopnosti vzrostných vrcholů po kryokonzervaci. Působení obou stresů zároveň pozitivně přispělo k procesu kryoprezervace a následné životaschopnosti vzrostných vrcholů. Zároveň se v této práci povedlo potvrdit, že působení obou vlivů zároveň mělo pozitivní vliv na pokles teplot tání i mrznutí u obou testovaných genotypů. Lze tedy tvrdit, že se v této práci povedlo prokázat pozitivní vliv otuzování jak osmotickým stresem, tak chladem pro zvýšení kryotolerance rostlin chmele.

Z práce vyplývá, že nejlepších výsledků po kryokonzervaci bylo dosaženo u otužených rostlin chladem a to více než 83 %. Následným krokem pro zlepšení výsledků životaschopnosti by mohlo být zopakování pokusu u jiných odrůd chmelových rostlin a sledovat, jak rostliny reagují na výše uvedené stresy. Dále by se také dalo zaměřit na stáří rostlin, zda mladší nebo starší rostliny reagují lépe na vliv stresů a následnou životaschopnost.

7 Závěr

Byl prokázán statisticky významný vliv otužování na životnost rostlin chmele po kryoprezervaci. Kontrolní varianta vykazovala nejmenší životaschopnost po kryokonzervaci oproti ostatním variantám. Otužování nízkou teplotou u odrůdy 'Žatecký poloranný červeňák' mělo značný vliv na vzrostné vrcholy po kryokonzervaci rostlinného materiálu. Po otužení explantátů chmele byla prokázána vyšší životaschopnost vzrostných vrcholů po kryokonzervaci. U neotužených variant byla hodnota životnosti explantátů po kryoprezervaci nižší u obou genotypů.

Dále byl prokázán statisticky významný vliv otužování na termické charakteristiky a obsah vosy ve vzrostných vrcholech testovaných odrůd chmele. Nejvyšší obsah zmrzlé vody vykazovala kontrolní varianta odrůdy 'Žatecký poloranný červeňák'. Nejnižší obsah zmrzlé vody vykazovala varianta otužená nízkou teplotou.

Na základě výsledků se lze tvrdit, že otužování nízkou teplotou mělo pozitivní vliv na proces kryoprezervace a následnou životaschopnost, která byla přibližně 83 %. Ze získaných dat nelze jednoznačně prokázat pozitivní vliv otužování pomocí osmotického stresu na proces kryoprezervace.

Stanovisko k vědeckým hypotézám:

- Na základě výsledků lze potvrdit vliv otužování nízkou teplotou na proces kryoprezervace a následnou životaschopnost vzrostných vrcholů chmele.
- Na základě výsledků nelze prokázat, že otužování pomocí osmotického stresu má statisticky významný vliv na proces kryoprezervace a následnou životaschopnost.
- Na základě výsledků lze potvrdit vliv otužování osmotickým stresem a chladem přispělo k lepší kryokonzervaci a následné životaschopnosti vzrostných vrcholů chmele.

8 Literatura

AHMAD, Farhan; SINGH, Ananya; KAMAL, Aisha. Osmoprotective role of sugar in mitigating abiotic stress in plants. *Protective chemical agents in the amelioration of plant abiotic stress: biochemical and molecular perspectives*, 2020, 53-70.

ALONSO-ESTEBAN, José Ignacio, et al. Phenolic composition and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties of hop (*Humulus lupulus* L.) Seeds. *Industrial Crops and Products*, 2019, 134: 154-159.

ALTOVÁ, Markéta. Situační a výhledová zpráva Chmel, pivo. Praha: Ministerstvo Zemědělství České republiky, 2022.

ALTPETER, Fredy, et al. Advancing crop transformation in the era of genome editing. *The Plant Cell*, 2016, 28.7: 1510-1520.

ALVAREZ, María E., et al. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell*, 1998, 92.6: 773-784.

AMORIELLO, Tiziana. Multi-criteria approach for land suitability assessment of hop cultivation in Italy. *Int. J. Agric. Environ. Res*, 2019, 5: 277-286.

AMTMANN, Anna; TROUFFLARD, Stephanie; ARMENGAUD, Patrick. The effect of potassium nutrition on pest and disease resistance in plants. *Physiologia plantarum*, 2008, 133.4: 682-691.

ATKINSON, Nicky J.; URWIN, Peter E. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of experimental botany*, 2012, 63.10: 3523-3543.

BAMBERG, J. B.; PALTA, J. P.; VEGA, S. E. *Solanum commersonii* cytoplasm does not improve freezing tolerance in substitution backcross hybrids with frost-sensitive potato species. *American journal of potato research*, 2005, 82: 251-254.

BANERJEE, Aditya; ROYCHOUDHURY, Aryadeep. Cold stress and photosynthesis. *Photosynthesis, productivity and environmental stress*, 2019, 27-37.

BECK, Erwin H., et al. Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. *Journal of biosciences*, 2007, 32: 501-510.

BILAVCIK, Alois; ZAMECNIK, Jiri; FALTUS, Milos. Cryotolerance of apple tree bud is independent of endodormancy. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 695.

BENELLI, Carla; DE CARLO, Anna; ENGELMANN, Florent. Recent advances in the cryopreservation of shoot-derived germplasm of economically important fruit trees

- of Actinidia, Diospyros, Malus, Olea, Prunus, Pyrus and Vitis. *Biotechnology Advances*, 2013, 31.2: 175-185.
- BENELLI, Carla. Plant cryopreservation: A look at the present and the future. *Plants*, 2021, 10.12: 2744.
- BENSON, Erica E. Cryoconserving algal and plant diversity: historical perspectives and future challenges. In: *Life in the frozen state*. CRC Press, 2004. p. 325-354.
- BENSON, Erica E. Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory & practice. *Critical reviews in Plant sciences*, 2008, 27.3: 141-219.
- CARVALLO, Marcela A., et al. A comparison of the low temperature transcriptomes and CBF regulons of three plant species that differ in freezing tolerance: *Solanum commersonii*, *Solanum tuberosum*, and *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany*, 2011, 62.11: 3807-3819.
- DANILOVA, T. V.; KARLOV, G. I. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism for detection of sex-specific molecular markers in hop (*Humulus lupulus* L.). *Euphytica*, 2006, 151.1: 15-21.
- DANSO, K. E., et al. Cryopreservation of cassava micropropagules using simple slow freezing and vitrification techniques. *Biotechnology*, 2011, 10.5: 415-420.
- DAVIES, William J.; ZHANG, Jianhua. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annual review of plant biology*, 1991, 42.1: 55-76.
- DE SOUZA, Rúbia, et al. Phenotypical changes in hop induced by micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 2021, 147.2: 379-387.
- DEBNATH, Mousumi; MALIK, C. P.; BISEN, Prakash S. Micropropagation: a tool for the production of high quality plant-based medicines. *Current pharmaceutical biotechnology*, 2006, 7.1: 33-49.
- DING, Yanglin; SHI, Yiting; YANG, Shuhua. Advances and challenges in uncovering cold tolerance regulatory mechanisms in plants. *New Phytologist*, 2019, 222.4: 1690-1704.
- DING, Yanglin; SHI, Yiting; YANG, Shuhua. Molecular regulation of plant responses to environmental temperatures. *Molecular plant*, 2020, 13.4: 544-564.
- DONNER, Pavel, et al. Influence of weather conditions, irrigation and plant age on yield and alpha-acids content of Czech hop (*Humulus lupulus* L.) cultivars. *Plant, Soil and Environment*, 2020, 66.1: 41-46.

- ELLIOT, M., BIDWELL, R. G. S. and MASON, J. G. (eds.). *Advances in Botanical Research*. Vol. 82. Academic Press, 2017. 272 s. ISBN 978-0-12-812024-4.
- ENGELMANN, Florent. Plant cryopreservation: progress and prospects. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 2004, 40.5: 427-433.
- ERIKSEN, Renée L., et al. Photosynthetic activity of six hop (*Humulus lupulus* L.) cultivars under different temperature treatments. *HortScience*, 2020, 55.4: 403-409.
- EVERS, Daniele, et al. Identification of drought-responsive compounds in potato through a combined transcriptomic and targeted metabolite approach. *Journal of experimental botany*, 2010, 61.9: 2327-2343.
- FAHY, Gregory M., et al. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*, 1984, 21.4: 407-426.
- FAHY, Gregory M. The relevance of cryoprotectant “toxicity” to cryobiology. *Cryobiology*, 1986, 23.1: 1-13.
- FAHY, Gregory M.; WOWK, Brian. Principles of ice-free cryopreservation by vitrification. *Cryopreservation and Freeze-drying protocols*, 2021, 27-97.
- FALTUS, M., et al. Progress in the Czech hop germplasm cryoconservation. In: *International Symposium on Cryopreservation in Horticultural Species 908*. 2009. p.453 -460.
- FARAGÓ, JURAJ; PŠENÁKOVÁ, IVANA; FARAGOVÁ, NATÁLIA. The use of biotechnology in hop (*Humulus lupulus* L.) improvement. *Nova Biotechnologica*, 2009, 9.3: 279-293.
- FAROOQ, Muhammad, et al. Drought stress in plants: an overview. *Plant responses to drought stress: From morphological to molecular features*, 2012, 1-33.
- FEHÉR, Attila. Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology?. *Frontiers in plant science*, 2019, 10: 536.
- FINKLE, Bernard J.; ULRICH, Jane M. Effects of cryoprotectants in combination on the survival of frozen sugarcane cells. *Plant Physiology*, 1979, 63.4: 598-604.
- FOLGADO, Raquel, et al. Changes in sugar content and proteome of potato in response to cold and dehydration stress and their implications for cryopreservation. *Journal of Proteomics*, 2014, 98: 99-111.

- FUKAI, Seiichi; OE, Masaharu. Morphological observations of chrysanthemum shoot tips cultured after cryoprotection and freezing. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 1990, 59.2: 383-387.
- FULLER, Barry J.; LANE, Nick; BENSON, Erica E. (ed.). *Life in the frozen state*. CRC press, 2004.
- GANTAIT, Saikat, et al. Improved cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) polyembryoids using droplet vitrification approach and assessment of genetic fidelity. *Protoplasma*, 2015, 252: 89-101.
- GEORGE, Edwin F.; HALL, Michael A.; KLERK, Geert-Jan De. Plant tissue culture procedure-background. *Plant Propagation by Tissue Culture: Volume 1. The Background*, 2008, 1-28.
- GILL, Jacquelyn L., WILLIAMS, John W., JACKSON, Stephen T., LININGER, Katherine B. and ROBINSON, Guy S. Pleistocene megafaunal collapse, novel plant communities, and enhanced fire regimes in North America. *Science*, 2010, roč. 326, č. 5956, s. 1100-1103. ISSN 0036-8075.
- GLOSER, Vit, et al. The response of *Humulus lupulus* to drought: the contribution of structural and functional plant traits. *Acta Horti*, 2013, 1010: 149-154.
- GOEL, Ajay K., et al. The *Pseudomonas syringae* type III effector HopAM1 enhances virulence on water-stressed plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2008, 21.3: 361 - 370.
- GRABOWSKA-JOACHIMIAK, Aleksandra, et al. Genome size in *Humulus lupulus* L. and *H. japonicus* Siebold and Zucc.[Cannabaceae]. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 2006, 75.3: 207-214.
- GREENWAY, H.; MUNNS, Rana. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annual review of plant physiology*, 1980, 31.1: 149-190.
- GUO, Xiaoyu; LIU, Dongfeng; CHONG, Kang. Cold signaling in plants: Insights into mechanisms and regulation. *Journal of integrative plant biology*, 2018, 60.9: 745-756.
- HABERLANDT, Gottlieb. *Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen*. Springer Vienna, 2003.
- HALMAGYI, A.; DELIU, C.; COSTE, A. Plant regrowth from potato shoot tips cryopreserved by a combined vitrification-droplet method. *CryoLetters*, 2005, 26.5: 313-322.

- HAMPTON, Richard; SMALL, Ernest; HAUNOLD, Alfred. Habitat and variability of *Humulus lupulus* var. *lupuloides* in upper Midwestern North America: a critical source of American hop germplasm. *Journal of the Torrey Botanical Society*, 2001, 35-46.
- HARDING, K.; STAINES, H. Biometric analysis of phenotypic characters of potato shoot tips recovered from tissue culture, dimethyl sulphoxide treatment and cryopreservation. *Cryo Letters*, 2001, 22.4: 255-262.
- HARRISON, J. Effect of hop seeds on beer quality. *Journal of the Institute of Brewing*, 1971, 77.4: 350-352.
- HASEGAWA, Paul M., et al. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual review of plant biology*, 2000, 51.1: 463-499.
- HAUNOLD, A., et al. Agronomic and quality characteristics of native North American hops. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 1993, 51.3: 133-137.
- HIRAI, Dai; SAKAI, Akira. Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of potato (*Solanum tuberosum* L.) by encapsulation-vitrification. *Potato Research*, 1999, 42: 153-160.
- HIRAI, Dai; SAKAI, Akira. Recovery growth of plants cryopreserved by encapsulation-vitrification. *Bulletin of Hokkaido Prefectural Agricultural Experiment Stations (Japan)*, 2001.
- CHANG, Yongjian; REED, Barbara M. Extended alternating-temperature cold acclimation and culture duration improve pear shoot cryopreservation. *Cryobiology*, 2000, 40.4: 311-322.
- CHANG, Y.; BARKER, R. E.; REED, B. M. Cold acclimation improves recovery of cryopreserved grass (*Zoysia* and *Lolium* sp.). *Cryo Letters*, 2000, 21.2: 107-116.
- CHANG, Yongjian; REED, Barbara M. Preculture conditions influence cold hardiness and regrowth of *Pyrus cordata* shoot tips after cryopreservation. *HortScience*, 2001, 36.7: 1329-1333.
- CHAROENSUB, Rommanee; HIRAI, Dai; SAKAI, Akira. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of cassavaby encapsulation-vitrification method. *CryoLetters*, 2004, 25.1: 51-58.
- CHAVES, Manuela M.; MAROCO, João P.; PEREIRA, João S. Understanding plant responses to drought—from genes to the whole plant. *Functional plant biology*, 2003, 30.3: 239-264.
- IQBAL, Zahra, et al. Plant defense responses to biotic stress and its interplay with fluctuating dark/light conditions. *Frontiers in plant science*, 2021, 12: 631810.

- JONES, H. G., ORTHS, K., and GRACE, J. (eds.). *Plants under Stress*. Cambridge: Cambridge University Press, 2008. 557 p. ISBN 0521053037.
- KACZMARCZYK, Anja, et al. Influence of alternating temperature preculture on cryopreservation results for potato shoot tips. *Plant cell reports*, 2008, 27: 1551-1558.
- KACZMARCZYK, Anja; ROKKA, Veli-Matti; KELLER, ER Joachim. Potato shoot tip cryopreservation. A review. *Potato research*, 2011, 54: 45-79.
- KALBERER, Scott R.; WISNIEWSKI, Michael; ARORA, Rajeev. Deacclimation and reacclimation of cold-hardy plants: current understanding and emerging concepts. *Plant Science*, 2006, 171.1: 3-16.
- KARPINSKI, Stanislaw, et al. Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in Arabidopsis. *science*, 1999, 284.5414: 654-657.
- KAVIANI, B. Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. *Australian Journal of Crop Science*, 2011, 5.6: 778-800.
- KOBUS-CISOWSKA, Joanna, et al. Composition and *in vitro* effects of cultivars of *Humulus lupulus* L. hops on cholinesterase activity and microbial growth. *Nutrients*, 2019, 11.6: 1377.
- KOLENC, Zala, et al. Hop (*Humulus lupulus* L.) response mechanisms in drought stress: Proteomic analysis with physiology. *Plant physiology and biochemistry*, 2016, 105: 67-78.
- KOROVETSKA, Halyna, et al. Signalling mechanisms involved in the response of two varieties of *Humulus lupulus* L. to soil drying: II. changes in the concentration of abscisic acid catabolites and stress-induced phytohormones. *Plant growth regulation*, 2016, 78: 13-20.
- KOSAŘ, Karel. *Technologie výroby sladu a piva*. Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, 2000.
- KRYSZCZUK, Artur, et al. Cryopreservation of potato (*Solanum tuberosum* L.) shoot tips using vitrification and droplet method. 2006.
- LAMERS, Jasper; VAN DER MEER, Tom; TESTERINK, Christa. How plants sense and respond to stressful environments. *Plant Physiology*, 2020, 182.4: 1624-1635.
- LEUNUFNA, S.; KELLER, E. R. J. Cryopreservation of yams using vitrification modified by including droplet method: effects of cold acclimation and sucrose. *CryoLetters*, 2005, 26.2: 93-102.

- LIN, Chiahsin, et al. Refined novel techniques for long term cryo-storage using vitrification and laser warming. *bioRxiv*, 2023, 2023.01.04.521297.
- LOPEZ-HUERTAS, Eduardo, et al. Stress induces peroxisome biogenesis genes. *The EMBO journal*, 2000, 19.24: 6770-6777.
- LOVELOCK, James. The Gaia hypothesis: The Earth as a living organism. *New Scientist*, 1975, vol. 67, no. 965, p. 410-413.
- MANE, Shrinivasrao P., et al. Molecular and physiological adaptation to prolonged drought stress in the leaves of two Andean potato genotypes. *Functional Plant Biology*, 2008, 35.8: 669-688.
- MARCEDDU, Roberto; CARRUBBA, Alessandra; SARNO, Mauro. Cultivation trials of hop (*Humulus lupulus* L.) in semi-arid environments. *Heliyon*, 2020, 6.10: e05114.
- MARCEDDU, Roberto; CARRUBBA, Alessandra; SARNO, Mauro. Resilience of hop (*Humulus lupulus* L.) to salinity, heat and drought stresses: A mini-review. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 4941.
- MATSUMOTO, Toshikazu. Cryopreservation of plant genetic resources: conventional and new methods. *Reviews in Agricultural Science*, 2017, 5: 13-20.
- MERYMAN, Harold T.; WILLIAMS, Robert J. Basic principles of freezing injury to plant cells: natural tolerance and approaches to cryopreservation. *Cryopreservation of plant cells and organs*, 1985, 13-47.
- MAZUR, Peter. A biologist's view of the relevance of thermodynamics and physical chemistry to cryobiology. *Cryobiology*, 2010, 60.1: 4-10.
- MITTLER, Ron; BLUMWALD, Eduardo. Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives. *Annual review of plant biology*, 2010, 61: 443-462.
- MIURA, Kenji; FURUMOTO, Tsuyoshi. Cold signaling and cold response in plants. *International journal of molecular sciences*, 2013, 14.3: 5312-5337.
- MOZNY, Martin, et al. The impact of climate change on the yield and quality of Saaz hops in the Czech Republic. *Agricultural and Forest Meteorology*, 2009, 149.6-7: 913-919.
- MULDREW, Ken, et al. The water to ice transition: implications for living cells. In: *Life in the frozen state*. CRC Press, 2004. p. 93-134.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 1962, 15: 473-497.

- NAKAWUKA, Prossie, et al. Effect of deficit irrigation on yield quantity and quality, water productivity and economic returns of four cultivars of hops in the Yakima Valley, Washington State. *Industrial Crops and Products*, 2017, 98: 82-92.
- NEJAT, Naghmeh; MANTRI, Nitin. Plant immune system: crosstalk between responses to biotic and abiotic stresses the missing link in understanding plant defence. *Current Issues in Molecular Biology*, 2017, 23.1: 1-16.
- OSENI, Ojo Michael; PANDE, Veena; NAILWAL, Tapan Kumar. A review on plant tissue culture, a technique for propagation and conservation of endangered plant species. *International journal of current microbiology and applied sciences*, 2018, 7.7: 3778-3786.
- OZUDOGRU, Elif Aylin; KAYA, Ergun. Cryopreservation of *Thymus cariensis* and *T. vulgaris* shoot tips: comparison of three vitrification-based methods. *CryoLetters*, 2012, 33.5: 363-375.
- PALTA, Jiwan P. Sorting genes controlling freezing stress resistance: strategy for moving desired traits by merging physiological and genetic approaches. In: *Biochemical and cellular mechanisms of stress tolerance in plants*. Springer Berlin Heidelberg, 1994. p. 569-586.
- PANTA, A., et al. The effect of pre-culture temperature treatment on the cryopreservation of potato shoot-tips. In: *I International Symposium on Cryopreservation in Horticultural Species 908*. 2009. p. 509-512.
- PANTA, Ana, et al. Development of a PVS2 droplet vitrification method for potato cryopreservation. *CryoLetters*, 2014, 35.3: 255-266.
- PECK, Scott; MITTLER, Ron. Plant signaling in biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 2020, 71.5: 1649-1651.
- PINO, María Teresa, et al. Enhanced *in vitro* drought tolerance of *Solanum tuberosum* and *Solanum commersonii* plants overexpressing the ScCBF1 gene. *Ciencia e investigación agraria: revista latinoamericana de ciencias de la agricultura*, 2013, 40.1: 171-184.
- PLESSIS, P., et al. Cryopreservation of *Vitis vinifera* L. cv Chardonnay shoot tips by encapsulation-dehydration: effects of pretreatment, cooling and postculture conditions. *Cryo-Letters*, 1993.
- PNUELI, Lilach, et al. Molecular and biochemical mechanisms associated with dormancy and drought tolerance in the desert legume *Retama raetam*. *The Plant Journal*, 2002, 31.3: 319-330.

- POLGE, Christopher; SMITH, Audrey U.; PARKES, Alan Sterling. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 1949, 164.4172: 666-666.
- POTOPOVÁ, Vera, et al. Vulnerability of hop-yields due to compound drought and heat events over European key-hop regions. *International Journal of Climatology*, 2021, 41: E2136-E2158.
- PRASAD, P. V. V., et al. Independent and combined effects of high temperature and drought stress during grain filling on plant yield and chloroplast EF-Tu expression in spring wheat. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 2011, 197.6: 430-441.
- REED, Barbara M. Implementing cryogenic storage of clonally propagated plants. *Cryo - Letters*, 2001, 22.2: 97-104.
- REED, Barbara M., et al. Cold storage and cryopreservation of hops (*Humulus L.*) shoot cultures through application of standard protocols. *CryoLetters*, 2003, 24.6: 389-396.
- REVILLA, M. A.; MARTINEZ, D. Cryopreservation of *Humulus lupulus L.*(hop). *Cryopreservation of Plant Germplasm II*, 2002, 136-150.
- RIZHSKY, Ludmila; LIANG, Hongjian; MITTLER, Ron. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant physiology*, 2002, 130.3: 1143- 1151.
- RYBÁČEK, Václav. *Chmelařství*. 2. vydání. Chrást'any: Agrosience spol. s r.o., 2020. ISBN 978-80-906121-4-3.
- RYYNÄNEN, Leena; ARONEN, Tuija. Vitrification, a complementary cryopreservation method for *Betula pendula* Roth. *Cryobiology*, 2005, 51.2: 208-219.
- SAIJO, Yusuke; LOO, Eliza Po-ian. Plant immunity in signal integration between biotic and abiotic stress responses. *New Phytologist*, 2020, 225.1: 87-104
- SAKAI, A.; RAZDAN, M. K.; COCKING, E. C. Conservation of Plant Genetic Resources *In Vitro*. Eds. Razadan MK, Oiyama L, 1997, 1: 53-66.
- SAKAI, Akira; ENGELMANN, Florent. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. *CryoLetters*, 2007, 28.3: 151-172.
- SKYBA, Matúš, et al. Physiological, biochemical and molecular characteristics of cryopreserved *Hypericum perforatum L.* shoot tips. *CryoLetters*, 2010, 31.3: 249-260.
- SALGOTRA, Romesh Kumar; CHAUHAN, Bhagirath Singh. Genetic Diversity, Conservation, and Utilization of Plant Genetic Resources. *Genes*, 2023, 14.1: 174.

- SALVUCCI, Michael E.; CRAFTS-BRANDNER, Steven J. Relationship between the heat tolerance of photosynthesis and the thermal stability of Rubisco activase in plants from contrasting thermal environments. *Plant physiology*, 2004, 134.4: 1460-1470.
- SCHAFLEITNER, Roland, et al. Capturing candidate drought tolerance traits in two native Andean potato clones by transcription profiling of field grown plants under water stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2007, 45.9: 673-690.
- SCHULZE, E. D., et al. Stress physiology. *Plant Ecology. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag*, 2005, 5-250.
- SONG, Jae-young, et al. Preconditioning for Cryopreservation of *in vitro* Grown Bulblets of Lily using Droplet-Vitrification. *Korean Journal of Plant Resources*, 2020, 33.6: 689-695.
- SREČEC, Siniša, et al. Dynamics of hop growth and accumulation of α -acids in normal and extreme climatic conditions. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 2004, 69.2-3: 59-62.
- SUZUKI, Nobuhiro, et al. Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytologist*, 2014, 203.1: 32-43.
- SVOBODA, Petr, ZAMECNIK, Jiri, BILAVCIK, Alois, FALTUS, Miloš. (2018). Cryopreservation method for hop (*Humulus lupulus*, L.) germplasm conservation. 66. 127 - 130
- ŠNOBL, Josef. *Rostlinná výroba IV.:(chmel, len, konopi, využití biomasy k energetickým účelům)*. Česká zemědělská univerzita, Agronomická fakulta, Katedra rostlinné výroby, 2004.
- TAYLOR, M., et al. 22 vitrification in tissue preservation: new developments. *Life in the frozen state*, 2004, 604-641.
- TOWEY, J. J.; DOUGAN, L. Structural examination of the impact of glycerol on water structure. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2012, 116.5: 1633-1641
- TYERMAN, S. D.; NIEMIETZ, C. M.; BRAMLEY, Helen. Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant, cell & environment*, 2002, 25.2: 173-194.
- UCHENDU, Esther E., et al. Antioxidant and anti-stress compounds improve regrowth of cryopreserved *Rubus* shoot tips. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2010, 46: 386-393.
- URAGAMI, A.; SAKAI, A.; NAGAI, M. Cryopreservation of dried axillary buds from plantlets of *Asparagus officinalis* L. grown *in vitro*. *Plant Cell Reports*, 1990, 9: 328-331.

VASQUEZ-ROBINET, Cecilia, et al. Physiological and molecular adaptations to drought in Andean potato genotypes. *Journal of experimental botany*, 2008, 59.8: 2109-2123.

VIDAL, Nieves, et al. Cryopreservation of chestnut by vitrification of *In vitro*-grown shoot tips. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 2005, 41.1: 63-68.

VILE, Denis, et al. Arabidopsis growth under prolonged high temperature and water deficit: independent or interactive effects?. *Plant, cell & environment*, 2012, 35.4: 702-718.

WAY, Danielle A.; OREN, Ram. Differential responses to changes in growth temperature between trees from different functional groups and biomes: a review and synthesis of data. *Tree physiology*, 2010, 30.6: 669-688.

XIONG, Liming; ZHU, J.-K. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant, Cell & Environment*, 2002, 25.2: 131-139.

YADAV, Summy, et al. Effect of abiotic stress on crops. *Sustainable crop production*, 2020, 3.

ZHANG, Heng; ZHAO, Yang; ZHU, Jian-Kang. Thriving under stress: how plants balance growth and the stress response. *Developmental Cell*, 2020, 55.5: 529-543.

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

- ABA** – Kyselina abscisová
BAP – Benzylaminopurin
CPA – (Cryoprotective agent) - Kryoprotektivní látka
D – po dehydrataci
DMSO – Dimethylsulfoxid
DSC – Diferenční skenovací kalorimetrie
GA₃ - Kyselina gibberelová
IBA – Kyselina indol-3-máselná
K – Kontrolní varianta
LN – (Liquid nitrogen) - Kapalný dusík
LSD – Least significant difference (nejmenší významný rozdíl – analýza rozptylu)
MS – Murashige and Skoog médium
ND – bez dehydratace
NT – otužování nízkou teplotou
NT + S – otužování nízkou teplotou a sacharózou
OA – (Osmotic adjustment) – Osmotická úprava
PDG - Preimplantační genetická diagnostika embryí
S – sacharóza
USA – Spojené státy Americké
VÚRV – Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i.
ŽPČ – Žatecký poloraný červeňák
Ψ_w – Vodní potenciál

10 Seznam obrázků

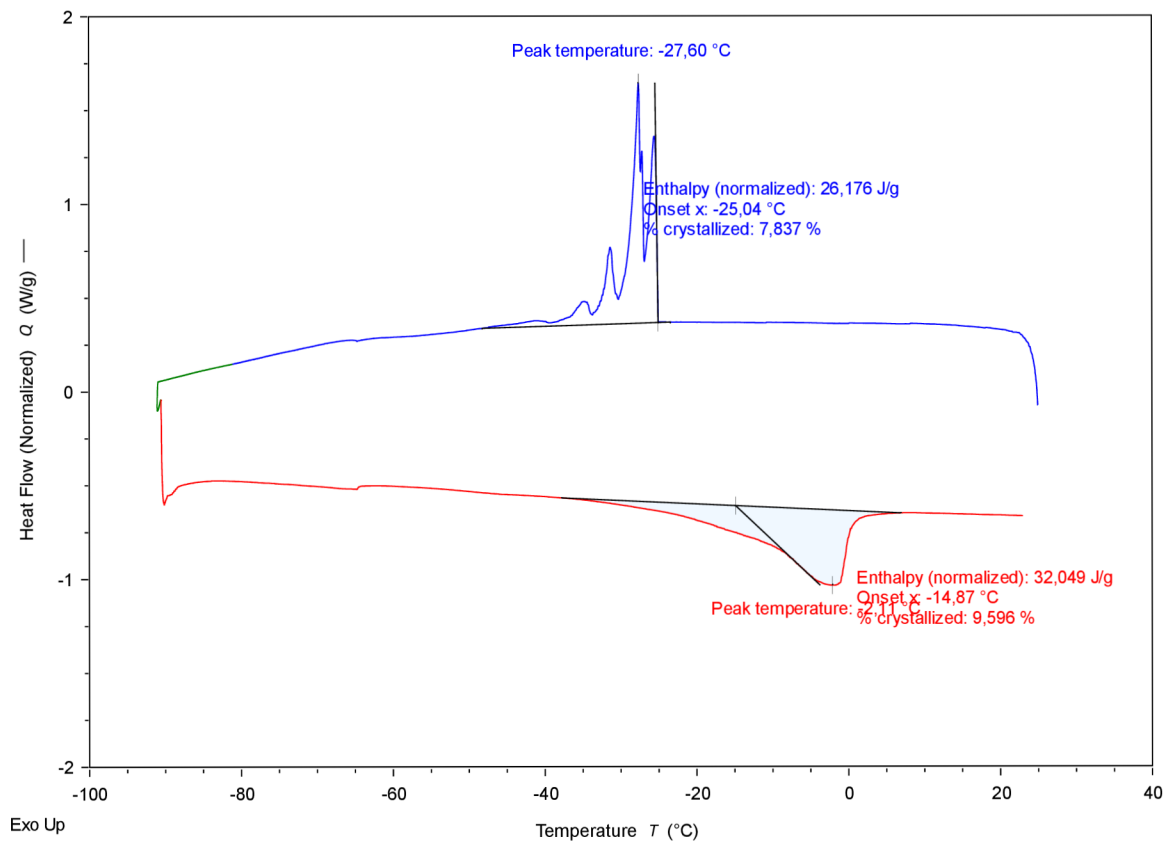
Obrázek 1 Biotické a abiotické faktory prostředí, které způsobují stres u rostlin (Schulze et al. 2005).....	5
Obrázek 2 Rostliny chmele uchovávané v <i>in vitro</i> podmínkách (autor práce).....	13
Obrázek 3 Kultivační médium (autor práce).....	15
Obrázek 4 Kultivační box Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v. v. i. (autor práce).....	16
Obrázek 5 Multiplikace rostlinného materiálu (autor práce).....	17
Obrázek 6 Sycení explantátů chmele 0,7 M sacharózou (autor práce).....	18
Obrázek 7 Izolace vzrostných vrcholů (autor práce).....	19
Obrázek 8 Sycení vzrostných vrcholů (autor práce).....	19
Obrázek 9 Stav vzrostných vrcholů před a po dehydrataci (autor práce).....	20
Obrázek 10 Porovnání nezamražené kontroly a zamražené varianty (autor práce).....	21
Obrázek 11 vysušené vzrostné vrcholy (autor práce).....	21
Obrázek 12 Diferenční skenovací kalorimetrie Discovery X3 DSC (autor práce).....	22
Obrázek 13 Příprava vzorků do přístroje DSC (autor práce).....	23
Obrázek 14 Životnost vzrostných vrcholů chmele, genotypů 8765 a 14635, kontrolních podmínek kultivace bez otužování (K), po otužování nízkou teplotou (NT). Po otužování sacharózou (S) a po otužování oběma faktory, nízkou teplotou a sacharózou (NT+S) po dehydrataci (D). Hodnoty sloupcového grafu jsou průměrem tří nezávislých opakování, chybové úsečky reprezentují standardní chybu průměru. Varianty označené různými písmeny stejné barvy (a, b, c, d, e) jsou vzájemně statisticky významně odlišné na hladině významnosti 0,05 dle Fisher-LSD post-hoc testu po provedení jednofaktorové analýzy variance.....	25
Obrázek 15 Teplota mrznutí a tání vzrostných vrcholů chmele, genotypů 8765 a 14635, kontrolních podmínek kultivace bez otužování (K), po otužování nízkou teplotou (NT). Po otužování sacharózou (S) a po otužování oběma faktory, nízkou teplotou a sacharózou (NT+S), bez dehydratace (ND) a po dehydrataci (D). Hodnoty sloupcového grafu jsou průměrem tří nezávislých opakování, chybové úsečky reprezentují standardní chybu průměru. Varianty označené různými písmeny stejné barvy (a, b, c, d, e) jsou vzájemně statisticky významně odlišné na hladině významnosti 0,05 dle Fisher-LSD post-hoc testu po provedení jednofaktorové analýzy variance.....	29
Obrázek 16 Skupenské teplo tání vzrostných vrcholů chmele, genotypů 8765 a 14635, kontrolních podmínek kultivace bez otužování (K), po otužování nízkou teplotou (NT). Po otužování sacharózou (S) a po otužování oběma faktory, nízkou teplotou a sacharózou (NT+S), bez dehydratace (ND) a po dehydrataci (D). Hodnoty sloupcového grafu jsou průměrem tří nezávislých opakování, chybové úsečky reprezentují standardní chybu průměru. Varianty označené různými písmeny stejné barvy (a, b, c, d, e) jsou vzájemně statisticky významně odlišné na hladině významnosti 0,05 dle Fisher-LSD post-hoc testu po provedení jednofaktorové analýzy variance.....	30
Obrázek 17 Podíl krystalické vody vzrostných vrcholů chmele, genotypů 8765 a 14635, kontrolních podmínek kultivace bez otužování (K), po otužování nízkou teplotou (NT). Po otužování sacharózou (S) a po otužování oběma faktory, nízkou teplotou a sacharózou	

(NT+S), bez dehydratace (ND) a po dehydrataci (D). Hodnoty sloupcového grafu jsou průměrem tří nezávislých opakování, chybové úsečky reprezentují standardní chybu průměru. Varianty označené různými písmeny stejné barvy (a, b, c, d, e) jsou vzájemně statisticky významně odlišné na hladině významnosti 0,05 dle Fisher-LSD post-hoc testu po provedení jednofaktorové analýzy variance.....	31
Obrázek 18 Teplota skelného přechodu vzrostných vrcholů chmele, genotypů 8765 a 14635, kontrolních podmínek kultivace bez otužování (K), po otužování nízkou teplotou (NT). Po otužování sacharózou (S) a po otužování oběma faktory, nízkou teplotou a sacharózou (NT+S), bez dehydratace (ND) a po dehydrataci (D). Hodnoty sloupcového grafu jsou průměrem tří nezávislých opakování, chybové úsečky reprezentují standardní chybu průměru. Varianty označené různými písmeny stejné barvy (a, b) jsou vzájemně statisticky významně odlišné na hladině významnosti 0,05 dle Fisher-LSD post-hoc testu po provedení jednofaktorové analýzy variance.....	32
Obrázek 19 Obsah vody vzrostných vrcholů chmele, genotypů 8765 a 14635, kontrolních podmínek kultivace bez otužování (K), po otužování nízkou teplotou (NT). Po otužování sacharózou (S) a po otužování oběma faktory, nízkou teplotou a sacharózou (NT+S), bez dehydratace (ND) a po dehydrataci (D). Hodnoty sloupcového grafu jsou průměrem tří nezávislých opakování, chybové úsečky reprezentují standardní chybu průměru. Varianty označené různými písmeny stejné barvy (a, b, c, d, e) jsou vzájemně statisticky významně odlišné na hladině významnosti 0,05 dle Fisher-LSD post-hoc testu po provedení jednofaktorové analýzy variance.....	33

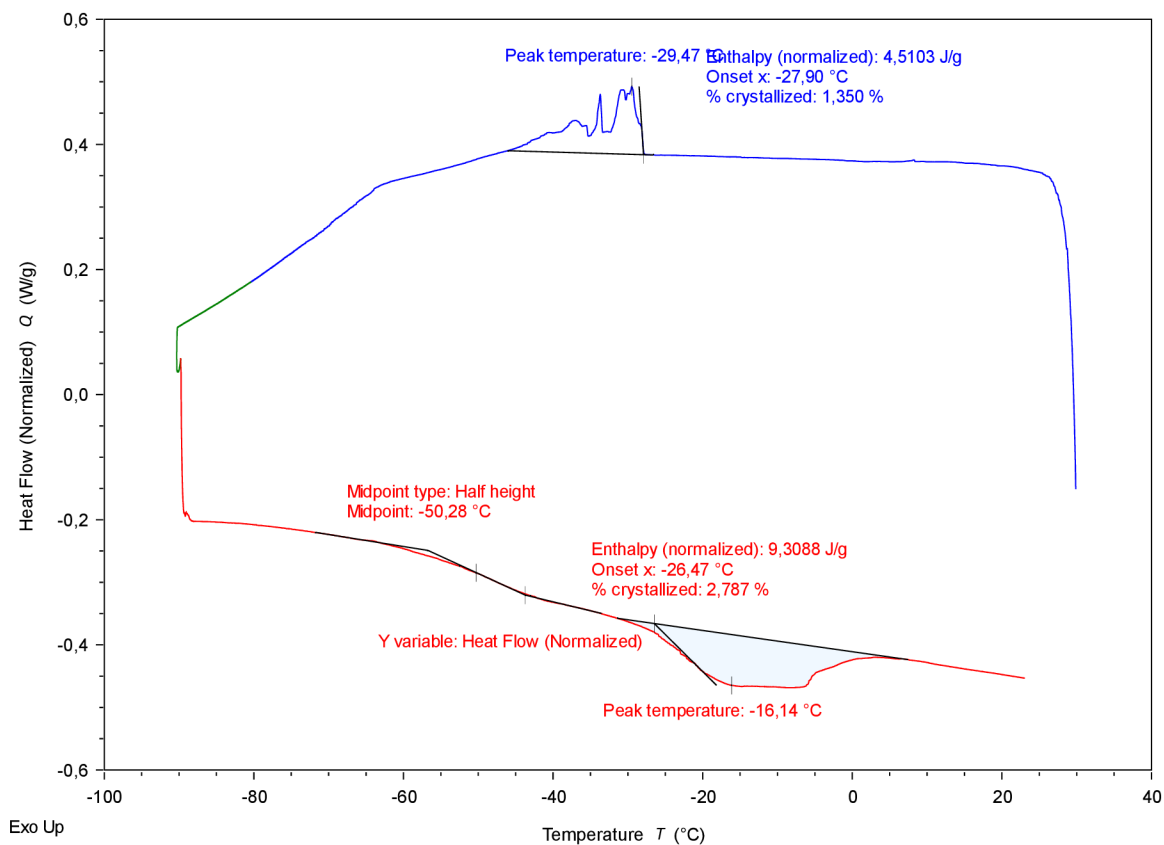
11 Seznam tabulek

Tabulka 1 Výsledky termické analýzy vzrostných vrcholů chmele, genotypu 8765. Každé ze tří nezávislých opakování je průměrem měření 10 jedinců, \bar{x} znázorňuje hodnotu průměru a SE standardní chybu průměru.....	27
Tabulka 2 Výsledky termické analýzy vzrostných vrcholů chmele, genotypu 14635. Každé ze tří nezávislých opakování je průměrem měření 10 jedinců, \bar{x} znázorňuje hodnotu průměru a SE standardní chybu průměru.....	28

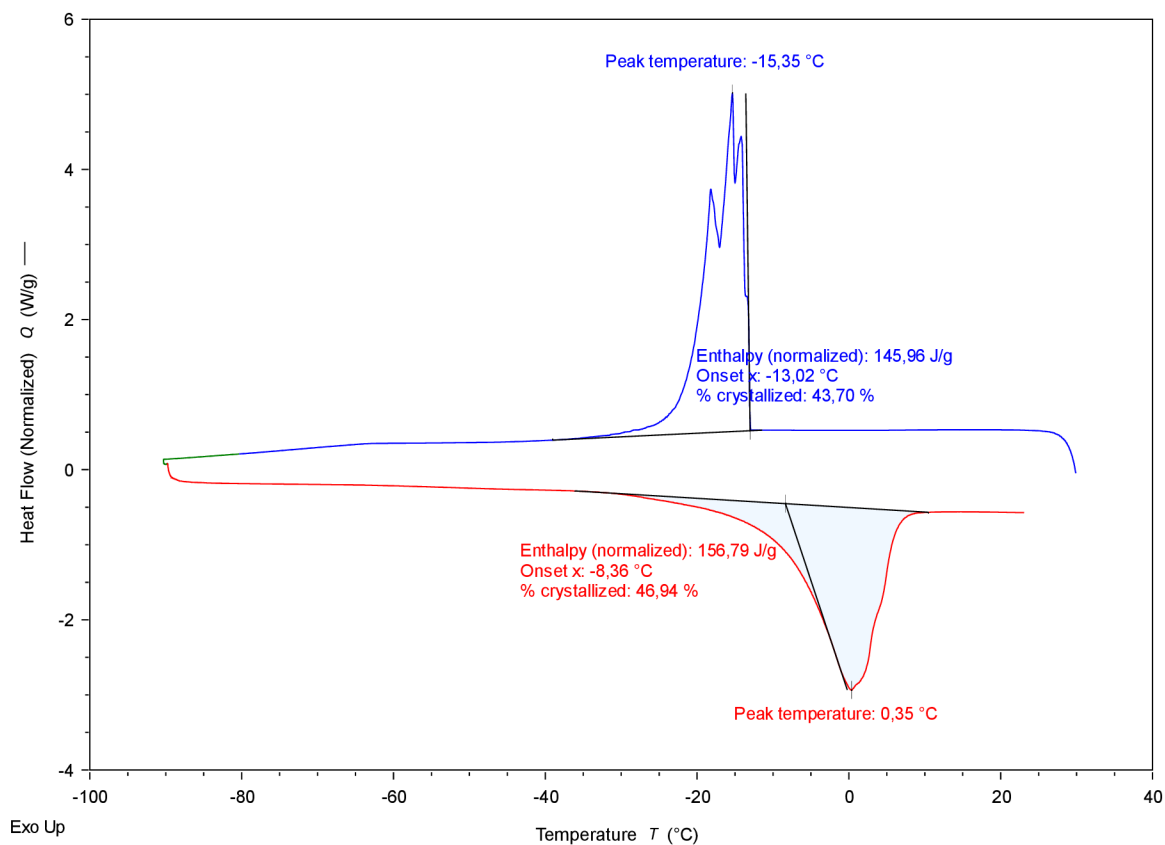
12 Samostatné přílohy



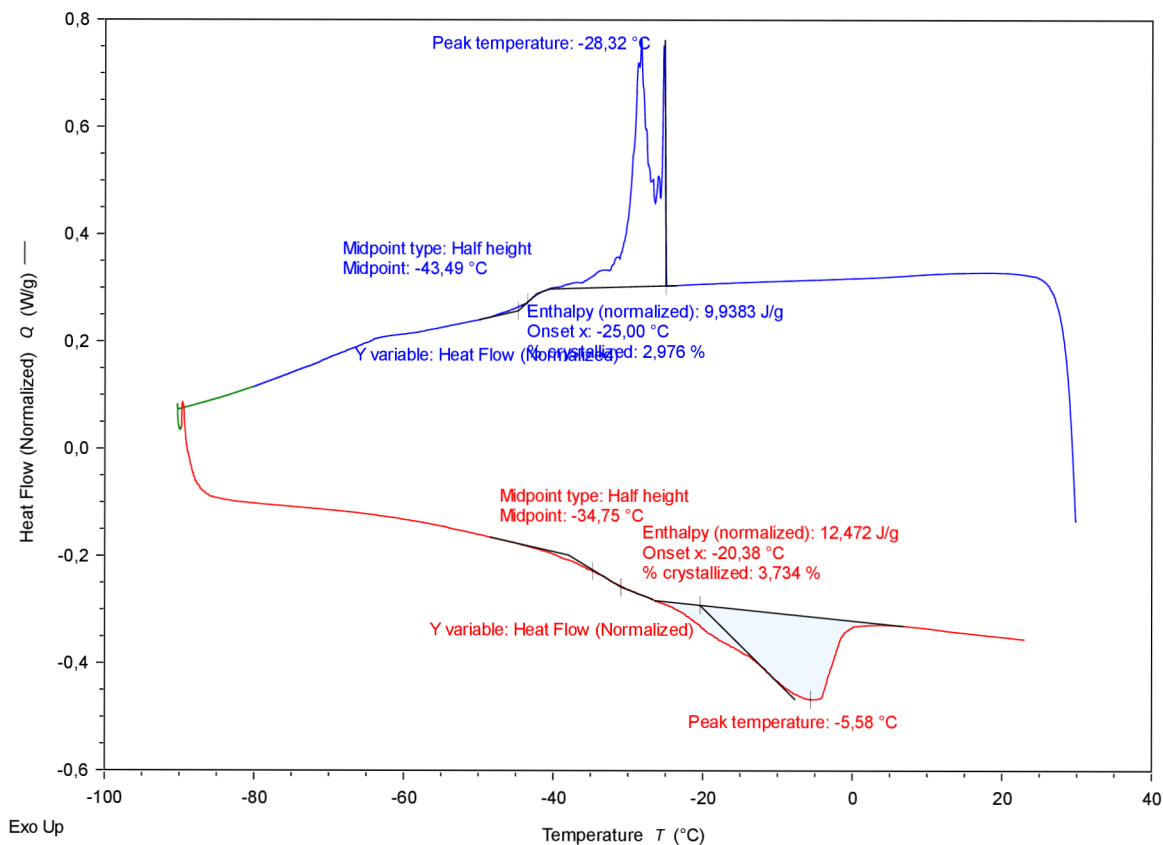
Obrázek A Termogram vzrostných vrcholů chmele, genotyp 8765, izolovaných z kontrolních rostlin po dehydrataci nad silikagelem, při chlazení z teploty +25 °C do -90 °C (modrá křivka) a ohřevu z teploty -90 °C do +25 °C při rychlosti chlazení/ohřevu 10 °C/min. pomocí diferenčního skenovacího kalorimetru Discovery X3 DSC.



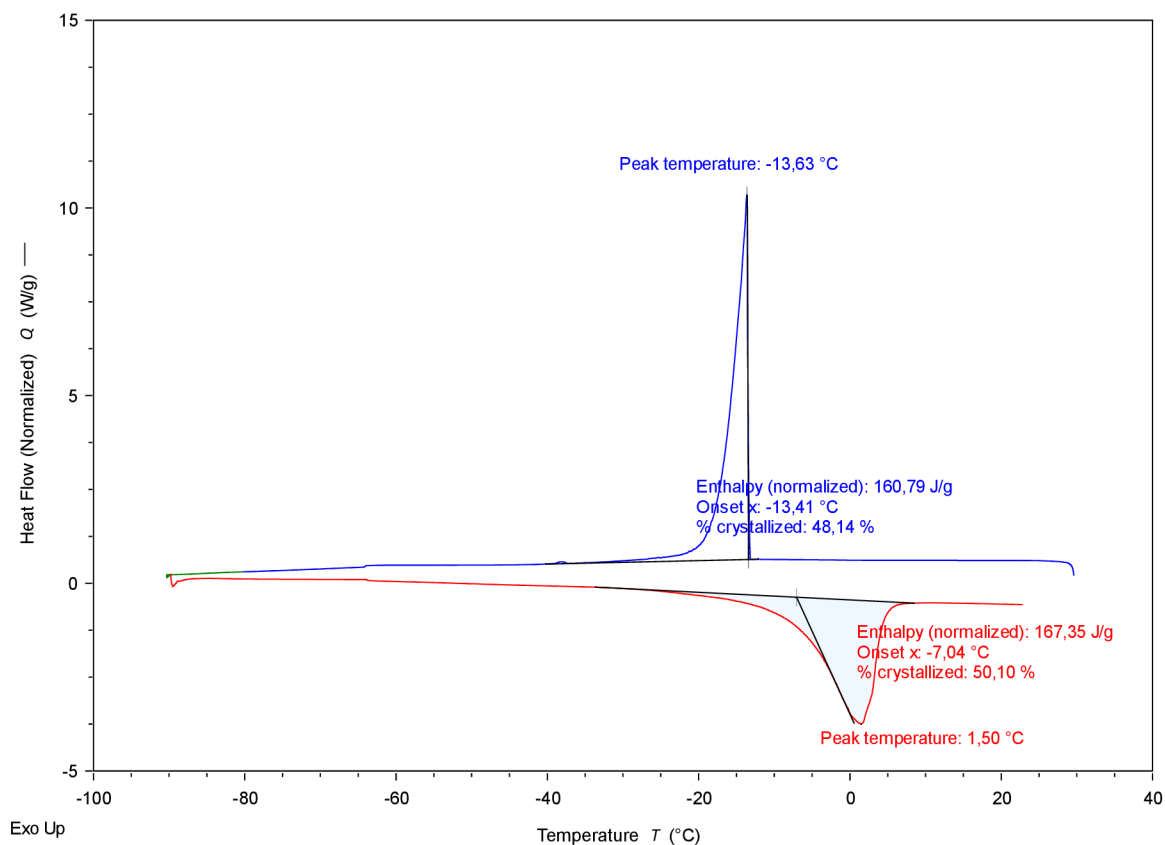
Obrázek B Termogram vzrostných vrcholů chmele, genotyp 8765, izolovaných z rostlin otužovaných nízkou teplotou (5 °C) po dehydrataci nad silikagelem, při chlazení z teploty +25 °C do -90 °C (modrá křivka) a ohřevu z teploty -90 °C do +25 °C při rychlosti chlazení/ohřevu 10 °C/min. pomocí diferenčního skenovacího kalorimetru Discovery X3 DSC.



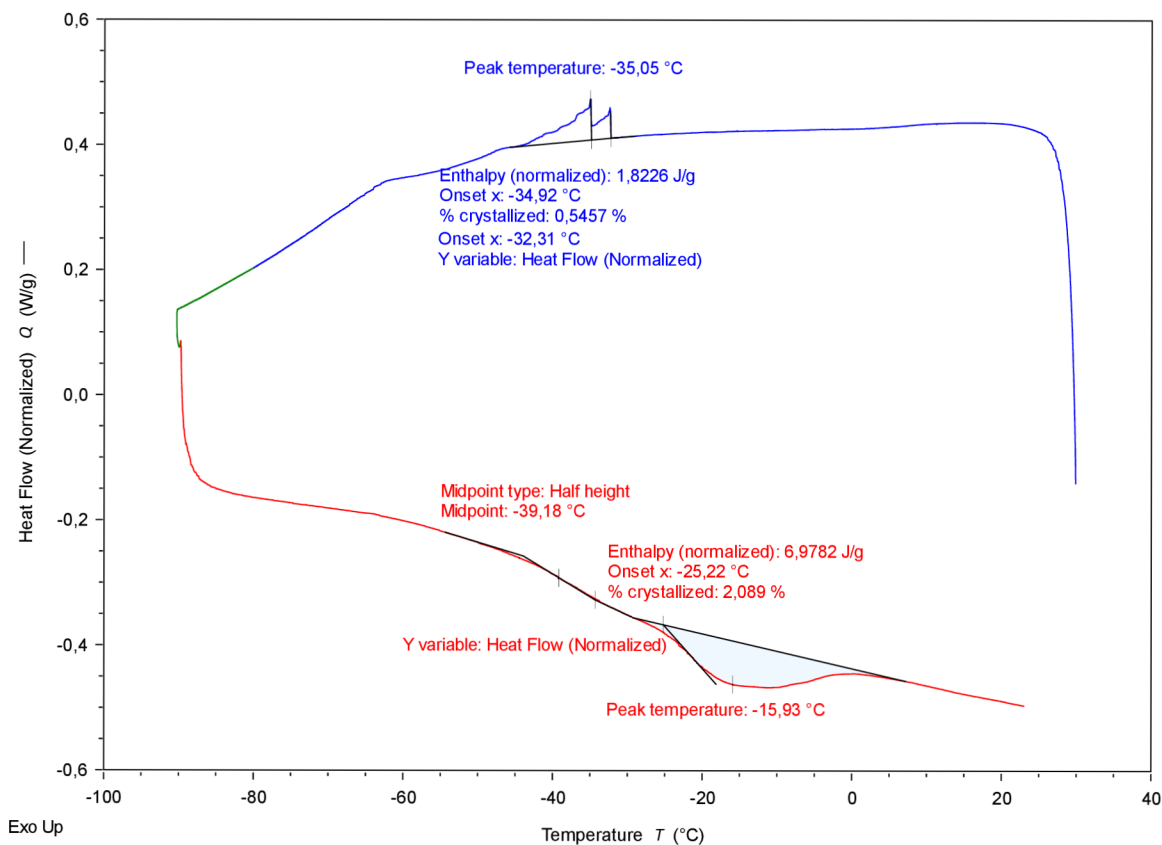
Obrázek C Termogram vzrostných vrcholů chmele, genotyp 8765, izolovaných z rostlin otužovaných nízkou teplotou (5 °C) a 0,7 M sacharózou bez dehydratace nad silikagelem, při chlazení z teploty +25 °C do -90 °C (modrá křivka) a ohřevu z teploty -90 °C do +25 °C při rychlosti chlazení/ohřevu 10 °C/min. pomocí diferenčního skenovacího kalorimetru Discovery X3 DSC.



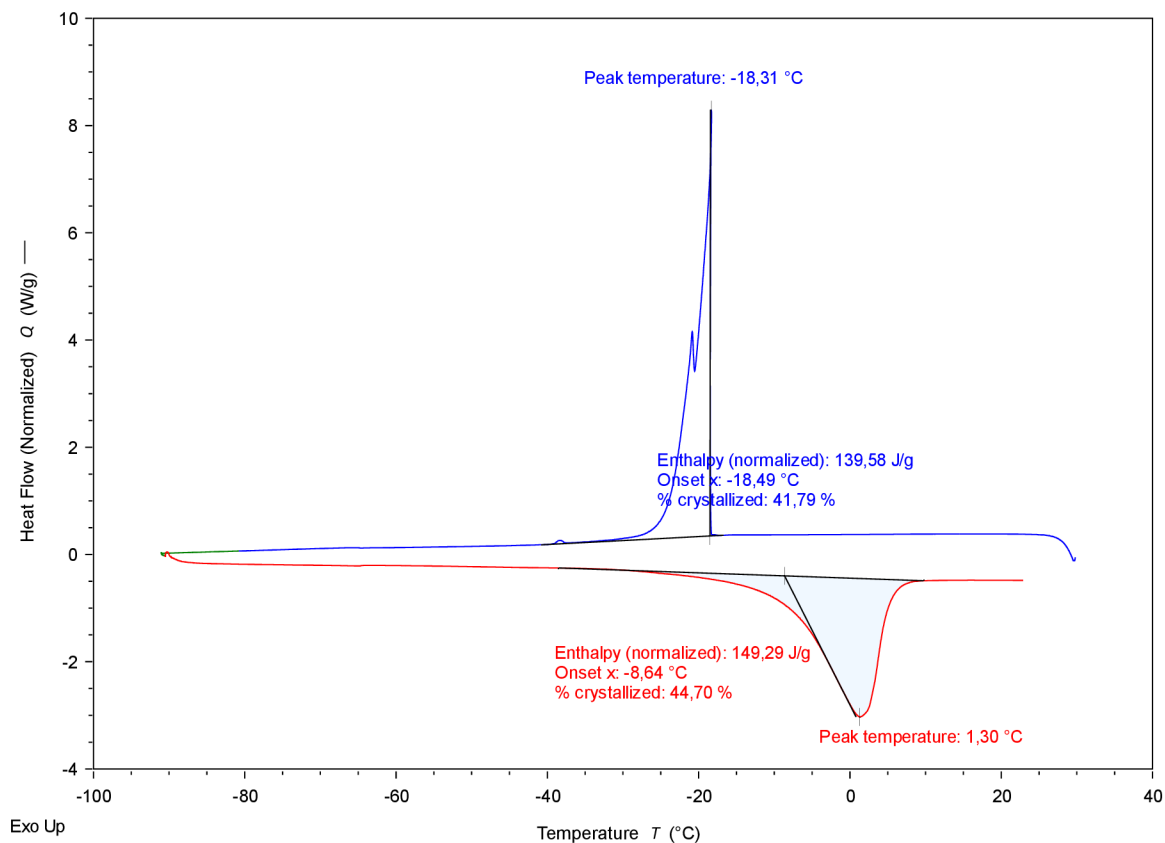
Obrázek D Termogram vzrostných vrcholů chmele, genotyp 8765, izolovaných z rostlin otužovaných nízkou teplotou (5 °C) a $0,7$ M sacharózou po dehydrataci nad silikagelem, při chlazení z teploty $+25$ °C do -90 °C (modrá křivka) a ohřevu z teploty -90 °C do $+25$ °C při rychlosti chlazení/ohřevu 10 °C/min. pomocí diferenčního skenovacího kalorimetru Discovery X3 DSC.



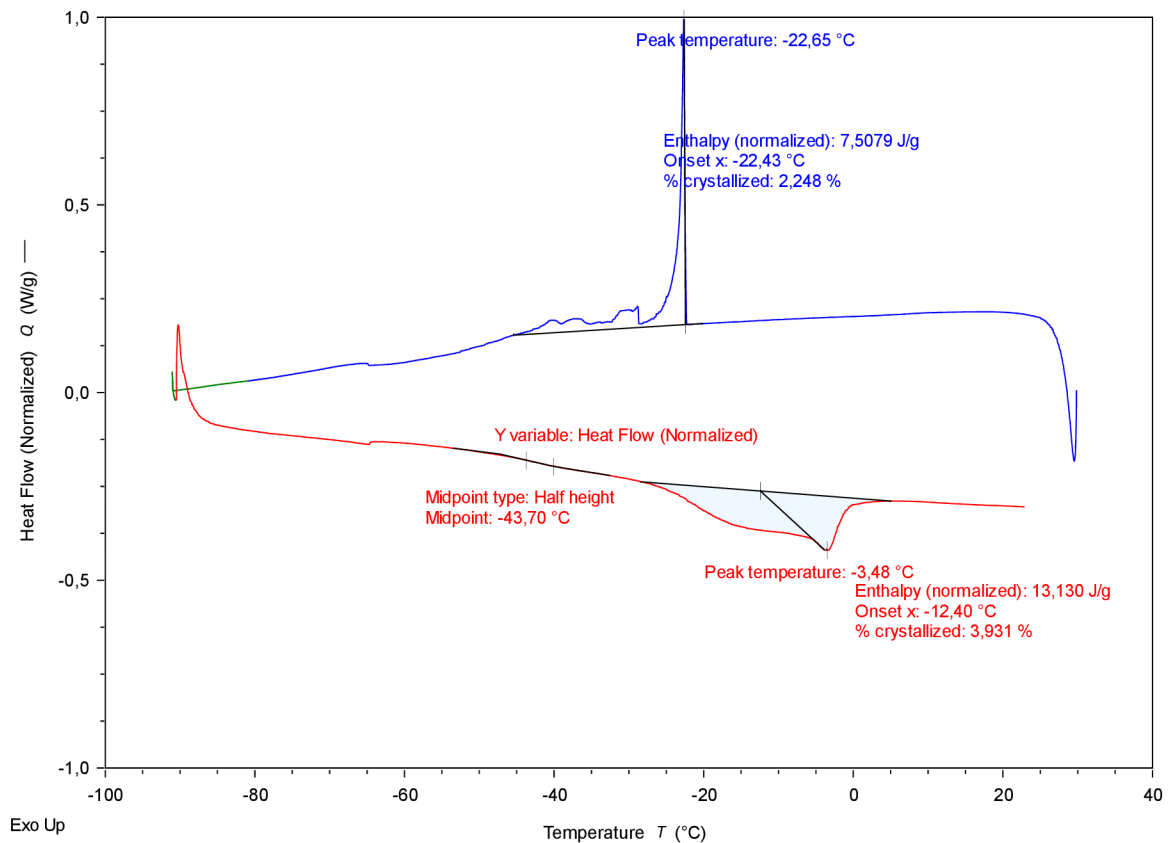
Obrázek E Termogram vzrostných vrcholů chmele, genotyp 14635, izolovaných z kontrolních rostlin před dehydratací nad silikagelem, při chlazení z teploty $+25$ °C do -90 °C (modrá křivka) a ohřevu z teploty -90 °C do $+25$ °C při rychlosti chlazení/ohřevu 10 °C/min. pomocí diferenčního skenovacího kalorimetru Discovery X3 DSC.



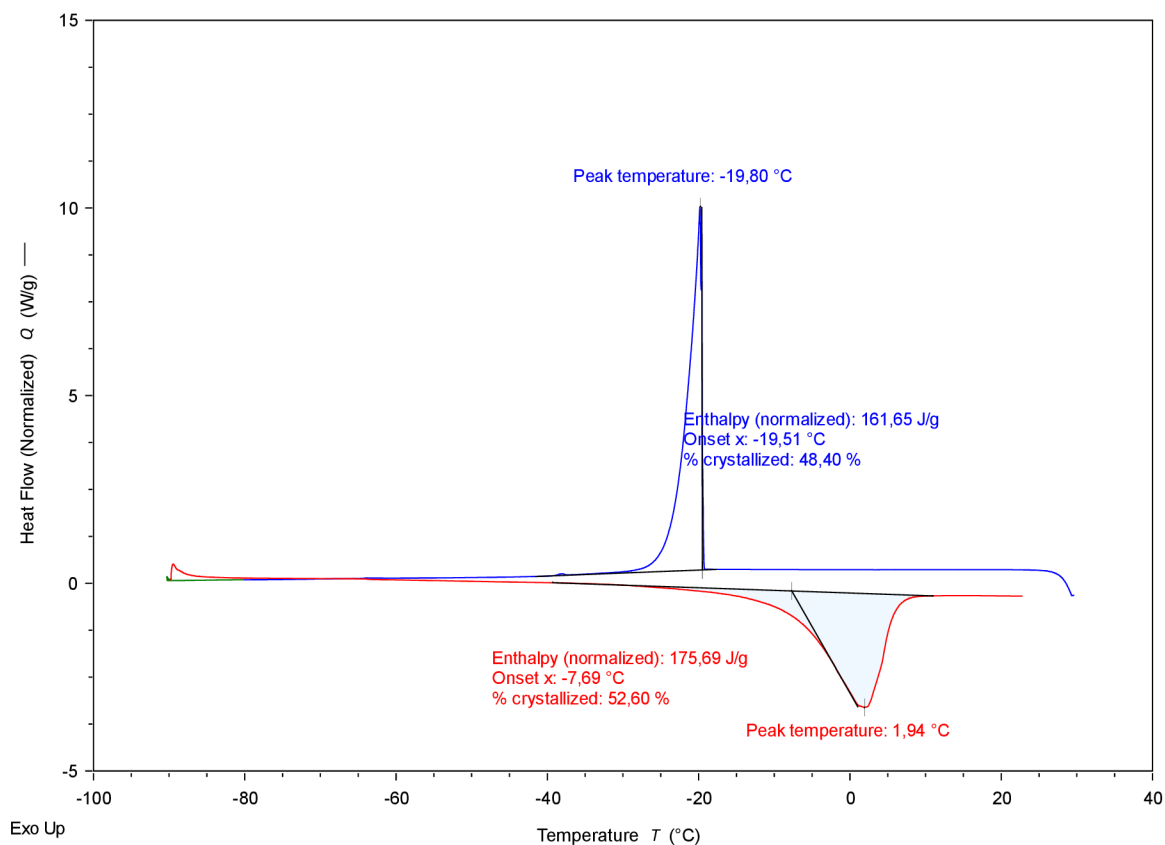
Obrázek F Termogram vzrostných vrcholů chmele, genotyp 14635, izolovaných z kontrolních rostlin po dehydrataci nad silikagelem, při chlazení z teploty $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ (modrá křivka) a ohřevu z teploty $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$ při rychlosti chlazení/ohřevu $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. pomocí diferenčního skenovacího kalorimetru Discovery X3 DSC.



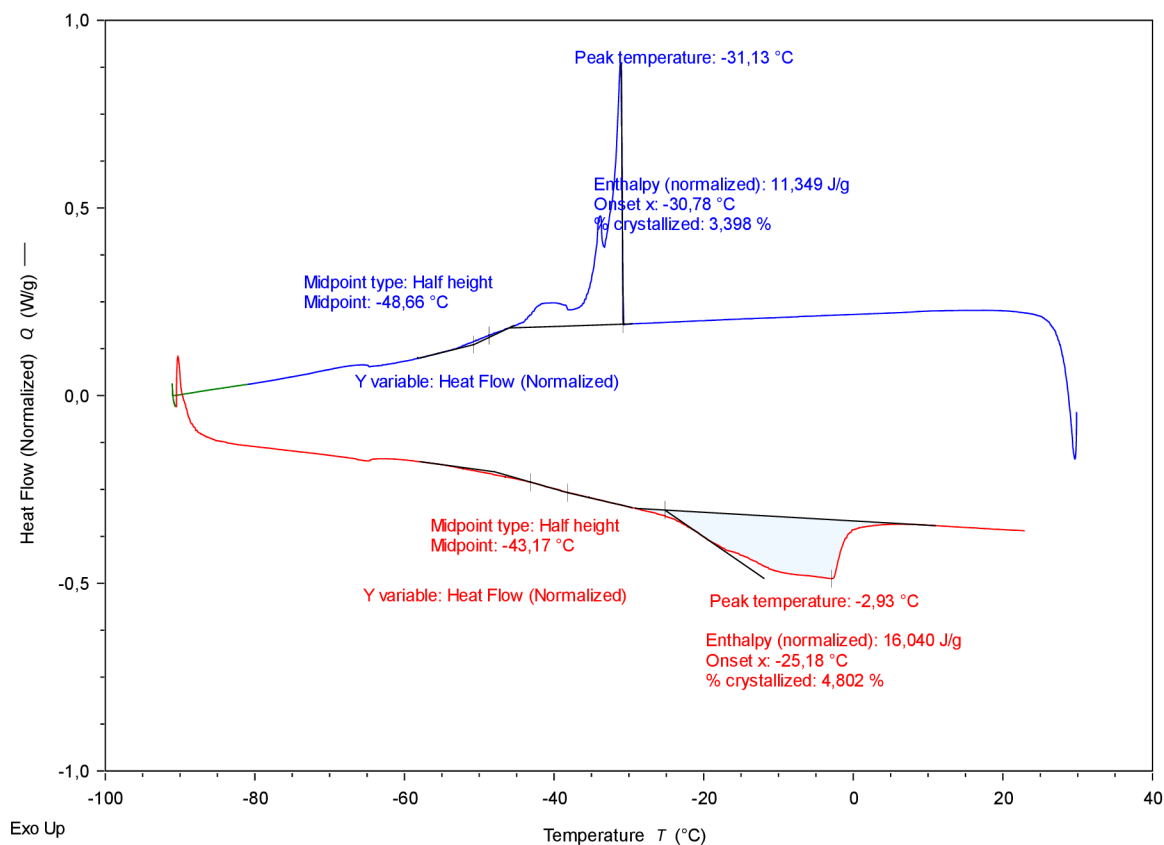
Obrázek G Termogram vzrostných vrcholů chmele, genotyp 14635, izolovaných z rostlin otužených pomocí 0,7 M sacharózy, před dehydratací nad silikagelem, při chlazení z teploty $+25$ °C do -90 °C (modrá křivka) a ohřevu z teploty -90 °C do $+25$ °C při rychlosti chlazení/ohřevu 10 °C/min. pomocí diferenčního skenovacího kalorimetru Discovery X3 DSC.



Obrázek H Termogram vzrostných vrcholů chmele, genotyp 14635, izolovaných z rostlin otužených pomocí 0,7 M sacharózy, po dehydrataci nad silikagelem, při chlazení z teploty +25 °C do -90 °C (modrá křivka) a ohřevu z teploty -90 °C do +25 °C při rychlosti chlazení/ohřevu 10 °C/min. pomocí diferenčního skenovacího kalorimetru Discovery X3 DSC.



Obrázek CH Termogram vzrostných vrcholů chmele, genotyp 14635, izolovaných z rostlin otužených nízkou teplotou (5 °C) a pomocí $0,7$ M sacharózy, před dehydratací nad silikagelem, při chlazení z teploty $+25$ °C do -90 °C (modrá křivka) a ohřevu z teploty -90 °C do $+25$ °C při rychlosti chlazení/ohřevu 10 °C/min. pomocí diferenčního skenovacího kalorimetru Discovery X3 DSC.



Obrázek I Termogram vzrostných vrcholů chmele, genotyp 14635, izolovaných z rostlin otužených nízkou teplotou (5 °C) a pomocí 0,7 M sacharózy, po dehydrataci nad silikagelem, při chlazení z teploty +25 °C do -90 °C (modrá křivka) a ohřevu z teploty -90 °C do +25 °C při rychlosti chlazení/ohřevu 10 °C/min. pomocí diferenčního skenovacího kalorimetru Discovery X3 DSC.