

**KRIOPREZERWACJA ZASOBÓW GENETYCZNYCH
CZOSNKU POSPOLITEGO (*ALLIUM SATIVUM* L.)
TWORZĄCEGO PĘDY KWIATOSTANOWE**

**CRYOPRESERVATION OF GENETIC RESOURCES
OF BOLTING GARLIC (*ALLIUM SATIVUM* L.)**

Marta Olas-Sochacka, Teresa Kotlińska

Instytut Warzywnictwa im. Emila Chroboczka w Skierniewicach

WSTĘP

Krioprezerwacja jest bezpieczną i opłacalną metodą długoterminowego zabezpieczania materiału roślinnego w temperaturze ciekłego azotu (-196°C), w której podziały komórkowe i procesy metaboliczne zostają zahamowane. Krioprezerwacja znalazła zastosowanie w przechowywaniu nasion, gatunków roślin rozmnażanych wegetatywnie oraz produktów biotechnologii (Engelmann 2004). Najważniejszym czynnikiem decydującym o przeżyciu komórek, po gwałtownym ich zamrożeniu w ciekłym azocie, jest właściwe zabezpieczenie i przygotowanie na stres ultraniskiej temperatury, a także rozmrażanie. Przygotowanie tkanek roślinnych na stres odbywa się poprzez optymalne odwodnienie komórek, w celu uniknięcia tworzenia się kryształków lodu (Sakai 2000). Kryształki lodu powodują mechaniczne uszkodzenia, nadmierne zagęszczenie soku komórkowego, a także rozrywanie błon podczas plazmolizy i dep plazmolizy (Meryman, Williams 1985). Zaletą przechowywania materiału roślinnego w temperaturze ciekłego azotu jest niewielka powierzchnia przechowywania, ochrona przed zakażeniami oraz stosunkowo niewielkie koszty utrzymania próbek (Engelmann 2004).

Obecnie krioprezerwacja jest wykorzystywana do przechowywania materiału roślinnego w postaci: merystemów wierzchołkowych pochodzących z ząbków czosnku, cebulek powietrznych, a także niedojrzałych kwiatostanów czosnku (Kim i in. 2006). Długoletnie utrzymywanie kolekcji polowej wegetatywnie rozmnażanego czosnku wiąże się z dużymi nakładami robocizny, wysokimi kosztami oraz wieloma zagrożeniami fitosanitarnymi. Krioprezerwacja może być efektywną metodą stosowaną do długoterminowego przechowywania wartościowych zasobów genetycznych, zachowania zmienności genetycznej oraz obniżenia kosztów.

Celem niniejszych badań było wykorzystanie metody witrifikacji do przechowywania zasobów genetycznych czosnku pospolitego tworzącego pędy kwiatostanowe w ciekłym azocie. Witrifikacja jest techniką

polegającą na jednostopniowym, szybkim zamrażaniu materiału biologicznego w kriochronnej, wysokoskoncentrowanej mieszaninie krioprotektantów. Wysokie ciśnienie osmotyczne roztworu kriochronnego powoduje szybkie odwodnienie materiału i zapobiega formowaniu kryształów lodu (Grajek 2001).

MATERIAŁ I METODY

Przedmiotem badań było 10 odmian miejscowych czosnku pospolitego (*Allium sativum* L.) tworzącego pędy kwiatostanowe wybrane z kolekcji banku genów utrzymywanej w Instytucie Warzywnictwa im. Emila Chroboczka w Skierniewicach. Badane obiekty były zebrane podczas ekspedycji banku genów na terenie Czech, Litwy, Rosji, Japonii i Polski. Wykaz i pochodzenie omawianych obiektów czosnku zamieszczono w tabeli 1.

Tabela 1. Lista obiektów czosnku tworzącego pędy kwiatostanowe poddane krioprezerwacji

Table 1. List of cryopreserved bolting garlic accessions

Nr obiektu Accession number	Nr kolek- cyjny Collection number	Rok włą- czenia do kolekcji Acquisi- tion year	Miejsce zebrania Collection site	Kraj pochodzenia Origin country
159K	55P1	1989	Olomouc	Czechy
168K	BYS 1	1990	Okolice Wilna	Litwa
171K	A006	1990	Gorno Altajsk, Bijsk	Rosja
190K	A109	1990	Lesnoj Gorodok, Moskwa	Rosja
230K	G 142	1991	Ano Mie, Tsu	Japonia
352K	BES 022	1997	Pewel Wielka, Żywiec	Polska
354K	BES 041	1997	Bażanowice, Cieszyn	Polska
358K	BES 077	1997	Milówka, Żywiec	Polska
396K	POLBIA 98-075	1998	Folwarki Tylwickie, Biały- stok	Polska
444K	POLMRO 012	2002	Nowe Kiejkuty, Szczytno	Polska

Materiałem badawczym były cebulki powietrzne dziesięciu odmian miejscowych czosnku tworzącego pędy kwiatostanowe. Do zabezpieczenia badanych obiektów czosnku w ciekłym azocie zastosowano metodę

witryfikacji. Materiał roślinny sterylizowano w 70% etanolu przez 20 sekund, a następnie w 3% roztworze podchlorynu sodu przez 20-25 minut. Z cebulek powietrznych izolowano stożki wzrostu o długości 3-5 mm i średnicy ok. 2 mm.

Wyizolowane merystemy (ok. 150 stożków wzrostu) poddawano prekulturze na pożywce MS (Murashige, Skoog 1962) wzbogaconej $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA, $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2i-P oraz 10% sacharozą przez 24 godziny w świetle i w temperaturze 20°C . Następnego dnia eksplantaty umieszczano w kriofiolkach i traktowano roztworem wstępnym (0,4 M sacharoza, 2 M glicerol) przez 20 minut, następnie roztworem witryfikacyjnym PVS3 (50% sacharoza, 50% glicerol) przez 120 minut, po czym bezpośrednio zanurzano w ciekłym azocie. Do długoterminowego przechowywania przeznaczono 100 eksplantatów, które umieszczono w pojemniku z ciekłym azotem. Kontrolę stanowiło 50 eksplantatów, które pozostawiano na jedną godzinę w ciekłym azocie. Eksplantaty kontrolne rozmrażano w łaźni wodnej w temperaturze 40°C przez 2 minuty, po czym przepłukiwano 1,2 M roztworem sacharozy przez 10 minut. Następnie eksplantaty pozostawiono do oceny przeżywalności i regeneracji na pożywce MS (Murashige, Skoog 1962) wzbogaconej $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA, $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2i-P oraz 3% sacharozą.

Efektywność krioprezerwacji oceniano odpowiednio po dwóch i dziesięciu tygodniach. Przeżywalność określano po dwóch tygodniach jako liczbę zieleniejących, formujących część pędową i korzeniową eksplantatów. Regenerację zdefiniowano jako liczbę prawidłowo wykształconych roślin, nie wykazujących cech szklistości (Keller 2005).

WYNIKI I DYSKUSJA

Oceniono dziesięć obiektów czosnku tworzącego pędy kwiatostanowe (tab. 2). Prezentowane w niniejszej pracy wyniki krioprezerwacji wykazały bardzo wysoką przeżywalność eksplantatów czosnku po stresie ultraniskiej temperatury. Przeżywalność badanych eksplantatów czosnku była wysoka i w dużym stopniu uzależniona od genotypu. Okazało się, że tylko w przypadku jednego obiektu 159K przeżywalność wynosiła 66%, natomiast u pozostałych obiektów wynosiła 100%.

Stwierdzono, że regeneracja eksplantatów była zdecydowanie niższa niż przeżywalność i mieściła się w przedziale od 30% do 92% (tab. 2). Natomiast Makowska i in. (1999) podaje, że przy użyciu do krioprezerwacji roztworu PVS3 uzyskano niższy procent zregenerowanych eksplantatów od 10% do 53%, a w badaniach Kim i in. (2004) osiągnięto regenerację na poziomie 80,4%.

Liczba zregenerowanych eksplantatów po 10 tygodniach zwykle nie była równa liczbie odtworzonych roślin. Częstym zjawiskiem było formowanie z jednego eksplantatu większej niż jedna liczby roślin. W przypadku obiektu 444K zregenerowało 46 eksplantatów, a z nich uzyskano aż 150 prawidłowo wykształconych roślin (tab. 2).

Tabela 2. Przeżywalność i regeneracja obiektów czosnku tworzącego pędy kwiatostanowe po krioprezerwacji
Table 2. Survival and regrowth of bolting garlic accessions after cryopreservation

Numer obiektu Access. number	Eksplantaty kontrolne Number of control explants	Liczba eksplantatów po 2 tyg. Survived explants after 2 weeks	Przeżywalność po 2 tygodniach Survival after 2 weeks (%)	Liczba zregenerowanych eksplantatów po 10 tyg. Regrowth plants after 10 weeks	Regeneracja po 10 tygodniach Regrowth plants after 10 weeks (%)	Liczba żyjących roślin Number of living plants after 10 weeks
159K	50	33	66	15	30,0	15
168K	50	50	100	21	42,0	42
171K	50	50	100	34	68,0	34
190K	50	50	100	16	32,0	16
230K	50	50	100	28	56,0	28
352K	50	50	100	34	68,0	42
354K	50	50	100	36	72,0	36
358K	50	50	100	41	82,0	98
396K	50	50	100	42	84,0	42
444K	50	50	100	46	92,0	150

W prezentowanej pracy średnia regeneracja czosnku tworzącego pędy kwiatostanowe wynosiła 62,8%. Natomiast Makowska i in. (1999) wykazali wyższą przeżywalność i regenerację eksplantatów izolowanych bezpośrednio z ząbków niż izolowanych z cebulek powietrznych, które wynosiły odpowiednio 42% i 13%. Podobne wyniki uzyskał Ellis i in. (2006), gdzie regeneracja stożków wzrostu wycinanych z ząbków była powyżej 60%.

Cebulki powietrzne czosnku okazały się bardzo dobrym materiałem wyjściowym do krioprezerwacji metodą witrifikacji, ze względu na ich dostępność, łatwość izolacji merystemów i efektywność regeneracji. Przy stosowaniu eksplantatów bezpośrednio z ząbków czosnku istnieje

większe prawdopodobieństwo infekcji kultur *in vitro* po krioprezerwacji (Volk i in. 2004; Keller 2005). Oprócz większego narażenia na infekcje, mogą pojawić się trudności w izolacji merystemów z ząbków czosnku. Utrudnieniem może być również ilość materiału roślinnego, gdyż liczba ząbków w główce jest zdecydowanie mniejsza niż cebulek powietrznych w kwiatostanie.

WNIOSKI

1. Przeżywalność i regeneracja eksplantatów czosnku pospolitego tworzącego pędy kwiatostanowe po zastosowaniu metody witryfikacji była bardzo wysoka.
2. Zastosowana technika witryfikacji jest przydatna do długoterminowego przechowywania czosnku pospolitego.
3. Efektywność krioprezerwacji w dużym stopniu zależy od genotypu czosnku.
4. Przechowywanie zasobów genetycznych czosnku w ciekłym azocie zapewnia ich lepsze zabezpieczenie, zmniejsza ryzyko utraty zmienności genetycznej oraz obniża koszty utrzymania kolekcji.

Literatura

- Ellis D., Skogerboe D., Andre C., Hellier B., Volk G. 2006. Implementation of garlic cryopreservation techniques in the national plant germplasm system. *CryoLetters* 27(2), 99-106.
- Engelmann F. 2004. Plant cryopreservation: progress and prospects. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 40: 427-433.
- Grajek W. 2001. Kultury roślinne w bioreaktorach. W: *Biotechnologia Roślin. Praca zbiorowa* (red. Malepszy S.). Wydawnictwo PWN, Warszawa: 87-132.
- Keller J. 2005. Improvement of cryopreservation results in garlic using low temperature preculture and high-quality *in vitro* plantlets. *CryoLetters* 26 (6), 357-366.
- Kim H.H., Lee J.K., Yoon J.W., Ji J.J., Nam S.S., Hwang H. S., Cho E.G., Engelmann F. 2006. Cryopreservation of garlic bulbil primordia by the droplet-vitrification procedure. *CryoLetters* 27(3): 143-153.
- Kim H.H., Cho E.G., Baek H.J., Keller J., Engelmann F. 2004. Cryopreservation of garlic shoot tips by vitrification: effects of dehydration, rewarming, unloading and regrowth conditions. *CryoLetters* 25: 59-70.
- Makowska Z., Keller J., Engelmann F. 1999. Cryopreservation of apices isolated from garlic (*Allium sativum* L.) bulbils and cloves. *CryoLetters* 20: 175-182.
- Meryman H.T., Williams R.J. 1985. Cryopreservation of plant cells and organs. Ed. Katha K.K., CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida: 13-47.

- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Sakai A. 2000. Development of cryopreservation techniques. In: Engelmann F., Takagi H., eds. *Cryopreservation of tropical plant germplasm-current research progress and applications*. Tsukuba: JIRCAS, Rome: IPGRI 1-7.
- Volk G., Maness N., Rotini K. 2004. Cryopreservation of garlic (*Allium sativum* L.) using plant vitrification solution 2. *CryoLetters* 25, 219-226.

Marta Olas-Sochacka, Teresa Kotlińska

CRYOPRESERVATION OF GENETIC RESOURCES
OF BOLTING GARLIC (*Allium sativum* L.)

Summary

Cryopreservation by vitrification method was used to long-term storage of bolting garlic germplasm. Shoot tips isolated from garlic bulbils were used as plant material. Shoot tips about size 2-3 mm of length and about 1 mm in diameter were treated with PVS3 (50% sucrose w/v, 50% w/v glycerol) and after directly immersed in liquid nitrogen. Survival was observed two weeks after cryopreservation and regrowth after ten weeks. Regrowth of explants of investigated bolting garlic accessions ranged from 30% to 92%. The regeneration after cryopreservation depends on garlic genotype.