

Badania nad mikrorozmnażaniem czosnku

Waldemar Kiszczak, Urszula Kowalska, Krystyna Górecka



Instytut Ogrodnictwa, Zakład Biologii Ogólnej,
ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice,
email: waldemar.kiszczak@inhort.pl



WSTĘP I CEL

Czosnek uprawiany jest w Polsce na powierzchni około ok. 6000 ha. Jego produkcja wynosi rocznie ok. 30-40 tys. ton. Utrzymujące się wysokie ceny oraz popyt wpływają na wzrastające zainteresowanie uprawą tej rośliny. Czosnek rozmnażany jest głównie wegetatywnie. Materiałem nasadzeniowym są ząbki. Taki sposób rozmnażania sprzyja rozprzestrzenianiu się chorób wirusowych, co stanowi ważny problem gospodarczy, ponieważ w znaczny sposób wpływa na obniżenie plonu. Najczęściej w uprawach czosnku występują mieszaniny różnych wirusów: *Onion yellow dwarf virus* (OYDV, Potyvirus), *Leek yellow stripe virus* (LYSV, Potyvirus), *Garlic common latent virus* (GarCLV, Carlavirus), *Shallot latent virus* (SLV, Carlavirus) (Klukáčková i in. 2007). Dlatego też w Instytucie Ogrodnictwa podjęto badania mające na celu opracowanie technologii wytwarzania metodami *in vitro* wolnego od wirusów materiału nasadzeniowego czosnku. Technologia odwirusowania, nad którą prowadzone są badania składa się z dwóch nieodłącznych elementów tj. dobór odpowiednich metod usuwania wirusa z materiału roślinnego w warunkach *in vitro* oraz wydajnej metody mikrorozmnażania. Poniżej prezentowane są wyniki doświadczeń nad mikrorozmnażaniem czosnku. W ramach doświadczeń poszukiwano optymalnego składu pożywek dla regeneracji czosnku z eksplantatów w kulturach *in vitro*. Badano wpływ na regenerację bazy pożywki B5 (Gamborg i in. 1968) i MS (Murashige i Skoog 1962), cytokinin: kinetyny i 2iP (2-izopentyloadenina), dwóch wartości pH 5,6 i 5,8 oraz substancji eliminującej w pożywce B5 wtórne zakażenia PPM (Plant Preservative Mixture) w połączeniu z różnymi fitohormonami.

METODY

Materiałem wyjściowym do zakładania kultur *in vitro* były fragmenty mięsistych łusek z merystemem i częścią piętki wycinane z cebul tzw. „twin scales” odmiany czosnku Jarus. Eksplantaty pobierano i wyjaławiano w warunkach sterylnych komory z laminarnym przepływem powietrza. Wyjaławianie przeprowadzono przez 2 min. w 70% etanolu, następnie 10 min. w 5% podchlorynie wapnia (CaClO_2) z dodatkiem Tween 20, a następnie trzykrotnie płukano dejonizowaną sterylną wodą. Przeprowadzono trzy doświadczenia. Do pożywek dodawano 30 g/L sacharozy oraz 6 g/L agaru. W doświadczeniu nr 1 i 3 zastosowano pH 5,8.

Obserwacje kultur prowadzono w 8 tygodniu po założeniu kultury.

Doświadczenie nr 1

Badano wpływ na wydajność mikrorozmnażania czosnku dwóch pożywek: MS i B5 oraz cytokinin: 10mg/L kinetyny (pożywka Cz-1) oraz 0,5mg/L 2iP (pożywka Cz-2) zastosowanych w wyżej wymienionych pożywkach.

Doświadczenie nr 2

Porównano wpływ dwóch zakresów pH (5,6 i 5,8) w pożywce B5 na wzrost i rozwój kultur *in vitro* czosnku.

Doświadczenie nr 3

W trzecim doświadczeniu celem wyeliminowania z kultur wtórnych zakażeń przetestowano różne kombinacje substancji wzrostowych: Kin (kinetyka), NAA (kwas 1-naftylooctowy), BAP (6-benzyloaminopuryna), TDZ (Thidiazuron) w połączeniu z PPM.

WYNIKI

Doświadczenie nr 1

Stwierdzono pozytywny wpływ 2iP na proces regeneracji czosnku w kulturach *in vitro*. Na pożywkach MS i B5 zawierających w swoim składzie 0,5mg/L 2iP (Cz-2) zregenerowano więcej w stosunku do pożywek z 10mg/L kinetyny (Cz-1) prawidłowych zielonych ukorzenionych rozet (kompletnych roślin). W przypadku zaczątków rozet (nie do końca wykształconych) zauważono że więcej eksplantatów zamierało na pożywkach w wariacie Cz-2. Natomiast te, które przeżyły i rozwinęły się w rozety bez korzeni przeżywały w 100% niezależnie od bazy na pożywkach Cz-2. System korzeniowy wytworzyło 30,4 % roślin na pożywce MS-Cz-2 i 38,1% na pożywce B5 Cz-2. Tak więc najefektywniejszą w prezentowanym doświadczeniu pożywką regeneracyjną była pożywka B5 Cz-2, uzyskano na niej najwięcej kompletnych roślin (Tab. 1).

Doświadczenie nr 2

Na zastosowanej do regeneracji czosnku pożywce B5 o pH 5,8 uzyskano ponad dwukrotnie więcej kompletnych roślin, oraz wyższe w porównaniu do pożywki o pH 5,6, wartości w kategoriach zielonych nieukorzenionych rozet i zielonego kalusa (Tab. 2).

Doświadczenie nr 3

W doświadczeniu stwierdzono pozytywny wpływ BAP z PPM na liczbę zregenerowanych roślin. W pasażu najwyższy procent (21,3) zielonych prawidłowo ukorzenionych rozet uzyskano na pożywce B5-Cz-4, a najniższy 1,7 na pożywce B5-Cz-5. Na trzech pozostałych pożywkach tj. B5-Cz-2 było ich 11,7%, na B5-Cz-6 10,0%, a na B5-Cz-7 tylko 5,0%. Procent eksplantatów w kategorii „zamarły zaczątek rozety” był zbliżony na większości pożywek i zawierał się w przedziale 13,1-15,0. Jedynie na pożywce B5-Cz-7 zanotowano więcej (21,7%) zamarłych zaczątków rozet (Tab. 3, Fot. 1).

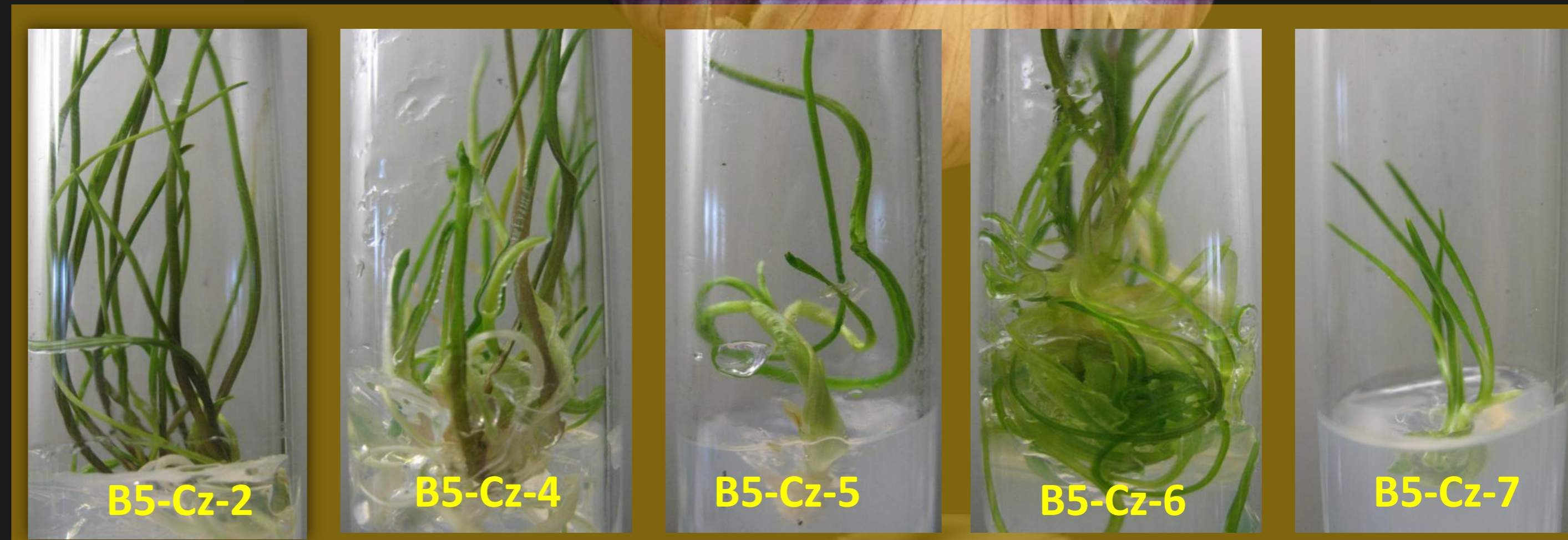
WIOSKI

- Na wzrost i rozwój eksplantatów czosnku miały mniejszy wpływ rodzaj pożywki (MS, B5), co zastosowane w tych pożywkach substancje wzrostowe.
- Wykazano pozytywny wpływ 0,5mg/L 2iP na wydajność regeneracji roślin czosnku w kulturach tkanek.
- Optymalne pH dla prowadzenia kultur *in vitro* czosnku wyznaczono na poziomie 5,8.
- Pożywka B5-Cz-4 z 1mg/L BAP i 0,1% PPM pozwoliła na uzyskanie sterylnych kultur z największą liczbą zregenerowanych roślin.

LITERATURA

Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. (1968) *Experimental Cell Research*, 50: 148-151
Klukáčková J., Navrátil M., Duchoslav M. J. (2007) *Journal of Plant Diseases and Protection* 114/3: 97-100
Murashige T., Skoog F. (1962). *Physiologiae Plantarum*, 15: 473-497

Fot.1 Regeneracja czosnku odm. Jarus na 5 pożywkach



Tab. 1 Procentowy udział poszczególnych kategorii eksplantatów czosnku odm. Jarus na 4 pożywkach

Kategoria namnożenia	Rodzaj pożywki (%)			
	MS		B5	
	Cz-1*	Cz-2*	Cz-1*	Cz-2*
Rozeta ziel. prawidł. ukorz.	0,0	30,4	30,0	38,1
Rozeta ziel. prawidł.	40,0	13,0	0,0	23,8
Rozeta żółto/zielona	0,0	4,3	5,0	0,0
Rozeta żółta	0,0	0,0	0,0	0,0
Rozeta kalusowa ta	0,0	0,0	0,0	0,0
Zielony zaczątek rozety	10,0	0,0	20,0	4,8
Rozeta ziel. nie w pełni wykształcone.	0,0	8,7	5,0	0,0
Rozeta żółta nie w pełni wykształcona	0,0	0,0	0,0	0,0
Kalus zielony	0,0	0,0	5,0	4,8
Rozeta zamarła	15,0	0,0	15,0	0,0
Zamarły zaczątek rozety	25,0	26,1	10,0	14,3
Kalus zamarły	10,0	17,4	10,0	9,5
Liczba próbek szt.	20	23	20	21

Tab. 2 Procentowy udział poszczególnych kategorii eksplantatów czosnku odm. Jarus na pożywce B5 pH 5,6 i pH 5,8.

Kategorie namnożeń	Odczyn pH	
	5,6	5,8
Rozeta ziel. prawidł. ukorz.	9,1	22,7
Rozeta ziel. prawidł.	0,0	4,5
Rozeta żółto/zielona	0,0	0,0
Rozeta żółta	0,0	0,0
Rozeta kalusowa ta	0,0	0,0
Zielony zaczątek rozety	18,2	18,2
Rozeta ziel. nie w pełni wykształ.	0,0	0,0
Rozeta żółta nie w pełni wykształcona	0,0	0,0
Kalus zielony	0,0	9,1
Rozeta zamarła	13,6	13,6
Zamarły zaczątek rozety	18,2	36,4
Kalus zamarły	31,8	4,5
Liczba próbek szt.	22	22

Tab. 3 Procentowy udział poszczególnych kategorii eksplantatów czosnku odm. Jarus na 5 pożywkach.

Kategorie namnożeń	Rodzaj pożywki				
	B5-Cz-2*	B5-Cz-4*	B5-Cz-5*	B5-Cz-6*	B5-Cz-7*
Rozeta ziel. prawidł. ukorz.	11,7	21,3	1,7	10,0	5,0
Rozeta ziel. prawidł.	30,0	16,4	41,7	28,3	21,7
Rozeta żółto/zielona	1,7	3,3	6,6	11,7	8,3
Rozeta żółta	1,7	0,0	0,0	0,0	0,0
Rozeta kalusowata	6,7	0,0	1,7	0,0	3,3
Zielony zaczątek rozety	15,0	19,7	5,0	15,0	16,7
Rozeta ziel. nie w pełni wykształ.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Rozeta żółta nie w pełni wykształ.	5,0	3,3	0,0	1,7	3,3
Kalus żółty	0,0	3,3	3,3	0,0	1,7
Kalus zielony	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Rozeta zamarła	8,3	4,9	11,7	1,7	0,0
Zamarły zaczątek rozety	15,0	13,1	13,3	13,3	21,7
Kalus zamarły	10,0	16,7	16,7	20,0	11,7
Liczba próbek	60	61	60	60	60

B5-Cz-2*, z 10mg/L Kin 0,1mg/L NAA
B5-Cz-4*, z 1mg/L BAP, 0,1% PPM
B5-Cz-5*, z 1mg/L TDZ, 1mg/L NAA, 0,1% PPM
B5-Cz-6*, z 0,1mg/L TDZ, 0,1mg/L NAA, 0,1% PPM
B5-Cz-7*, z 10mg/L Kin, 0,1mg/L NAA, 0,1% PPM

Podziękowania

Prace realizowane w ramach zadania 1.5 Programu Wieloletniego „Działania na rzecz poprawy konkurencyjności i innowacyjności sektora ogrodnictwa z uwzględnieniem jakości i bezpieczeństwa żywności oraz ochrony środowiska naturalnego”