



Krioprezewacja zasobów genowych czosnku pospolitego (*Allium sativum* L.) w ciekłym azocie

WSTĘP

Krioprezewacja jest uznawana za najbezpieczniejszą metodę długoterminowego zabezpieczenia cennego materiału roślinnego w temperaturze ciekłego azotu. Jednym z takich gatunków jest czosnek (*Allium sativum* L.), który należy do roślin stanowiących bardzo bogate źródło różnorodnych substancji biologicznie czynnych i z tego względu znajduje on szerokie zastosowanie zarówno w żywieniu jak i w medycynie. W ostatnim czasie, obserwuje się wzrost zainteresowania tym cennym warzywem właśnie ze względu na jego różnorodne zastosowanie. W celu ochrony materiałów wyjściowych czosnku charakteryzujących się dużą zmiennością genetyczną cech niezbędne jest ich długoterminowe zabezpieczenie w ciekłym azocie. Dla właściwego zabezpieczenia materiału roślinnego w ciekłym azocie zostały zastosowane dwie metody krioprezewacji. Obiekty czosnku pospolitego zostały poddane krioprezewacji z wykorzystaniem metody witrifikacji oraz metody kapsułkowania/witrifikacji.

MATERIAŁY I METODY

Materiałem roślinnym przeznaczonym do badań było 12 odmian miejscowych czosnku pospolitego (*Allium sativum* L.) wybranych z kolekcji banku genów utrzymywanej w Instytucie Ogrodnictwa w Skierniewicach. Ząbki czosnku sterylizowano w 70% alkoholu przez 20 sek., następnie w 3% roztworze podchlorynu sodu przez 25 min., po czym płukano 3–4-krotnie wodą destylowaną. Siedem obiektów zostało zabezpieczonych metodą witrifikacji. Eksplantaty umieszczano w kriofiolkach i traktowano roztworem wstępnym (0,4 M sacharoza, 2 M glicerol) przez 20 minut, następnie roztworem witrifikacyjnym PVS3 (50% sacharoza, 50% glicerol) przez 120 minut, po czym bezpośrednio zanurzano w ciekłym azocie. Pozostałe obiekty zostały zabezpieczone z wykorzystaniem metody kapsułkowania/witrifikacji. Eksplantaty umieszczano w alginianie sodu na 10 min., następnie formowano kulki alginianowe wkraplając eksplantaty do roztworu 0,1 M chlorku wapnia, pozostawiając na 10 min. Otrzymane kulki alginianowe traktowano roztworem wstępnym, następnie roztworem witrifikacyjnym, po czym bezpośrednio zanurzano w ciekłym azocie. Przeżywalność i regenerację eksplantatów kontrolnych oceniano po 2 i 10 tygodniach.

WYNIKI

Tabela 1. Przeżywalność i regeneracja obiektów po witrifikacji

Numer obiektu	Metoda krioprezewacji	Eksplantaty kontrolne	Liczba eksplantatów po 2 tygodniach	Przeżywalność po 2 tygodniach (%)	Liczba zregenerowanych eksplantatów po 10 tygodniach	Regeneracja po 10 tygodniach (%)
1004K	witrifikacja	50	42	84,0	30	60,0
46K	witrifikacja	50	31	62,0	28	56,0
5136	witrifikacja	50	43	86,0	31	62,0
32K	witrifikacja	50	48	96,0	33	66,0
27K	witrifikacja	50	11	22,0	8	16,0
824S	witrifikacja	50	39	78,0	28	56,0
801S	witrifikacja	50	30	60,0	20	40,0

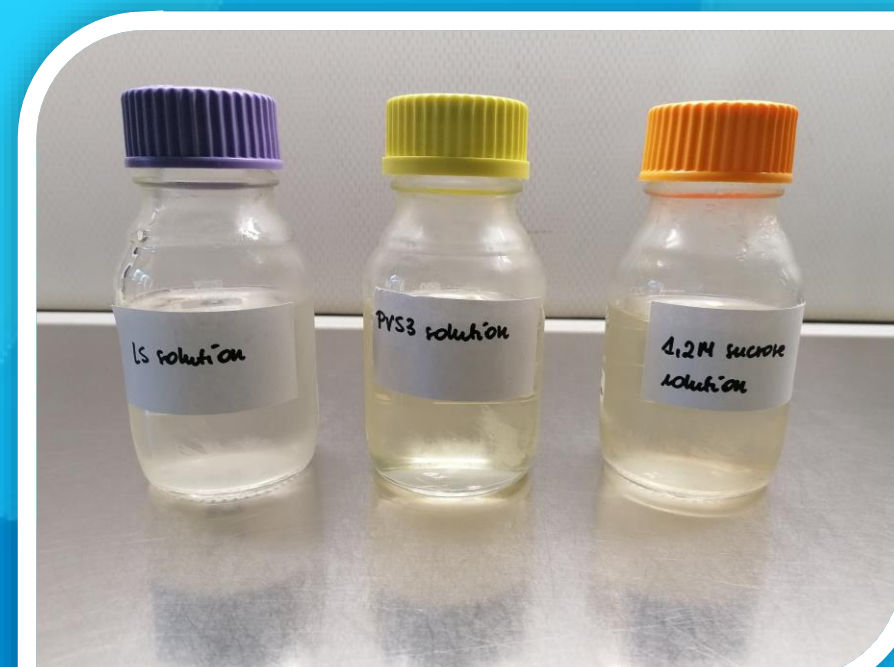
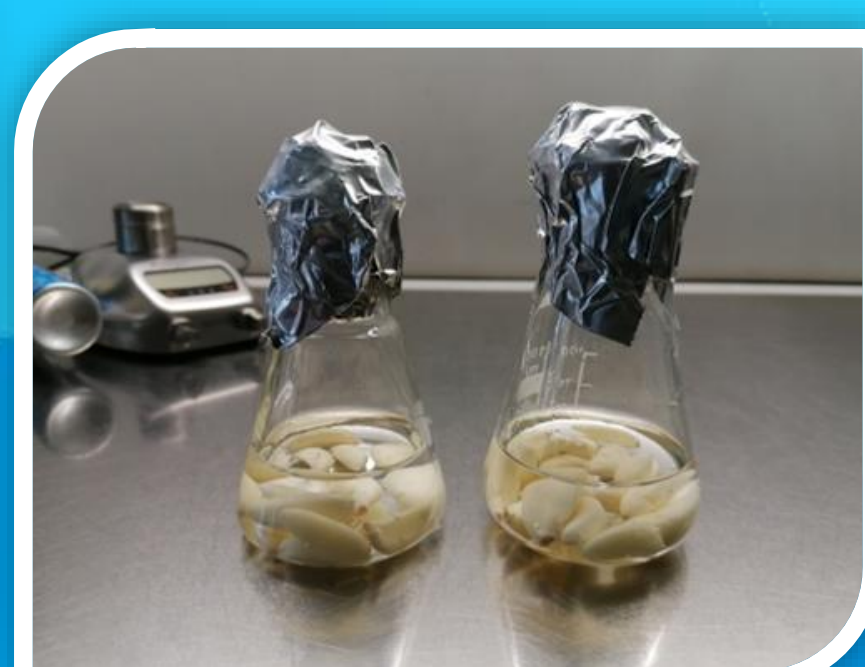
Tabela 2. Przeżywalność i regeneracja obiektów po kapsułkowaniu/witrifikacji

Numer obiektu	Metoda krioprezewacji	Eksplantaty kontrolne	Liczba eksplantatów po 2 tygodniach	Przeżywalność po 2 tygodniach (%)	Liczba zregenerowanych eksplantatów po 10 tygodniach	Regeneracja po 10 tygodniach (%)
658S	kapsułkowania/witrifikacji	50	35	70,0	20	40,0
5118	kapsułkowania/witrifikacji	50	37	74,0	16	32,0
5124	kapsułkowania/witrifikacji	50	35	70,0	16	32,0
719S	kapsułkowania/witrifikacji	50	41	82,0	15	30,0
374K	kapsułkowania/witrifikacji	50	40	80,0	15	30,0

Sterylizacja materiału badawczego oraz izolacja merystemów z ząbków czosnku

Eksplantaty w kriofiolkach traktowano roztworem wstępnym oraz roztworem witrifikacyjnym PVS3

Eksplantaty w kriofiolkach bezpośrednio zanurzano w ciekłym azocie

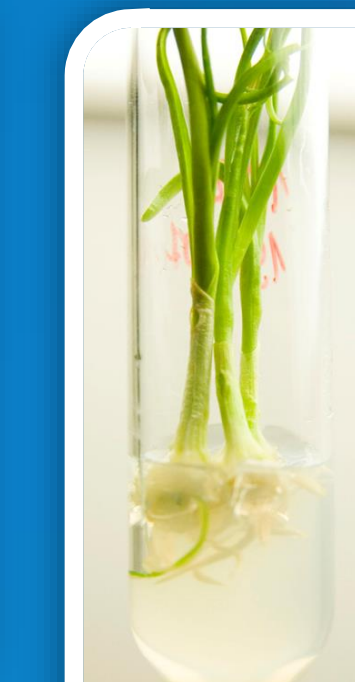
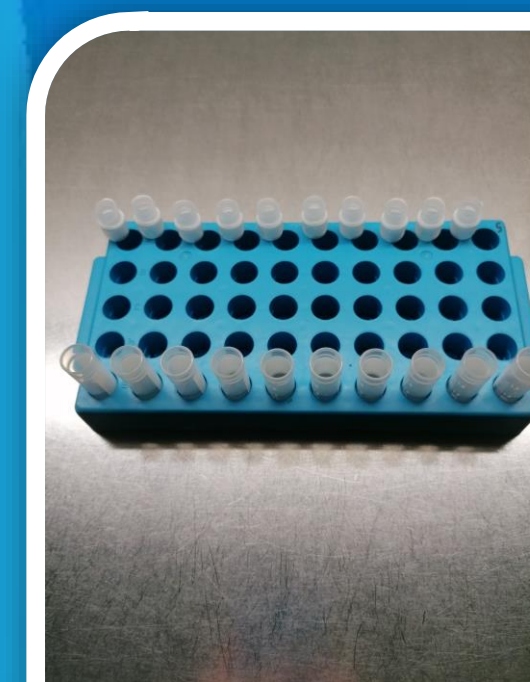
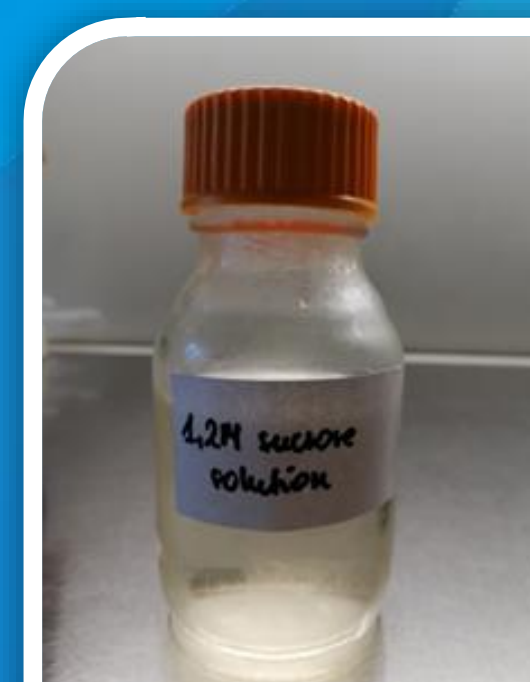
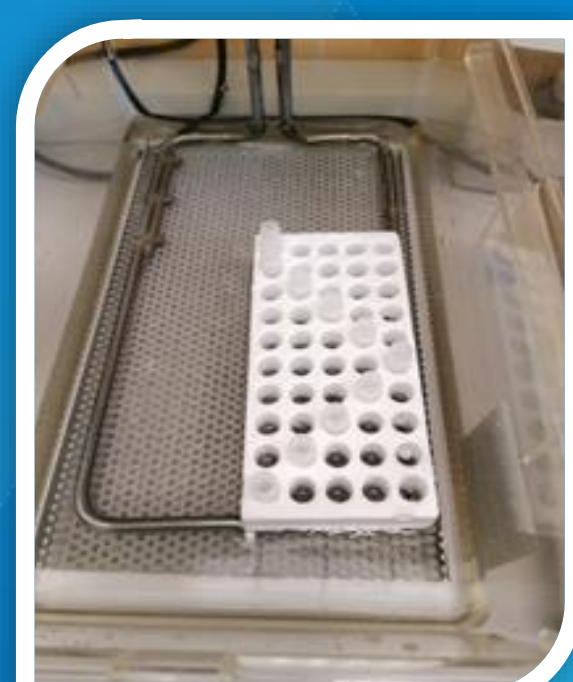


Eksplantaty kontrolne w kriofiolkach pozostawiono na 1 godzinę w ciekłym azocie

Eksplantaty kontrolne rozmrażano w łaźni wodnej w temperaturze 40°C przez 2 minuty

Eksplantaty kontrolne przepłukiwano 1,2 M roztworem sacharozy przez 10 minut

Eksplantaty kontrolne wykładano na pożywkę MS wzbogaconej 0,1 mg/l NAA, 0,5 mg/l 2i-P



PODSUMOWANIE

Po 2 tygodniach przeżywalność wynosiła 22 - 95% w obu zastosowanych metodach. Natomiast regeneracja obiektów czosnku wprowadzonych do długoterminowego przechowywania wynosiła 16 - 66%. Efektywność przeprowadzonego procesu krioprezewacji w znacznym stopniu zależy od genotypu czosnku, jednak wyższy procent zregenerowanych roślin czosnku pospolitego uzyskano po zastosowaniu metody witrifikacji.