

**KRIOPREZERWACJA ZASOBÓW GENOWYCH CZOSNKU
POSPOLITEGO (*ALLIUM SATIVUM* L.)
NIE TWORZĄCEGO PĘDÓW KWIATOSTANOWYCH**

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

Marta Olas-Sochacka, Teresa Kotlińska

Instytut Ogrodnictwa, Skierniewice

e-mail: marta.olas@inhort.pl

WSTĘP

Krioprezerwacja jest bezpieczną metodą długoterminowego zabezpieczenia roślinnych zasobów genowych w bardzo niskich temperaturach, w tym w temperaturze ciekłego azotu (-196°C) (Kaviani 2011). Technika krioprezerwacji składa się z wielu etapów: prekultura materiału, jego wstępne traktowanie, zamrażanie, przechowywanie w ciekłym azocie i rozmrażanie (Mikuła 2008). Podczas krioprezerwacji wszystkie procesy biochemiczne są znacząco spowolnione. Istotnym czynnikiem decydującym o sukcesie krioprezerwacji jest zminimalizowanie negatywnego wpływu desykacji i mrożenia, a zapewnienie wysokiego stopnia regeneracji materiału roślinnego. W ciekłym azocie może być przechowywany różnorodny materiał roślinny, przez bardzo długi okres czasu. Dzięki tej metodzie unika się problemów związanych z utratą stabilności genetycznej, infekcją czy błędem ludzkim (Kaviani 2011).

Formowanie kryształków lodu podczas krioprezerwacji ma destrukcyjny wpływ na integralność struktur komórkowych i przyczynia się do fizycznego zniszczenia komórek. Aby uniknąć formowania kryształków lodu w trakcie mrożenia i rozmrażania, materiał roślinny poddawany jest dehydratacji osmotycznej za pomocą mieszaniny substancji kriochronnych (wnikających lub nie wnikaących do wnętrza komórki), dehydratacji powietrznej bądź hartowania, a łączenie i wybór tych zabiegów i procesów stanowi strategię kriogeniczną (Kaviani 2011).

Różnorodne techniki krioprezerwacji stosowane są dla około 100 gatunków roślin (Harding 2004). Klasyczne metody krioprezerwacji wykorzystywane były do mrożenia niezróżnicowanego materiału roślinnego oraz wierzchołków wzrostu gatunków roślin tolerujących niskie temperatury. Nowe techniki krioprezerwacji, opierające się na witrifikacji, skuteczne są dla wszystkich rodzajów eksplantatów, począwszy od zawiesi-

ny komórkowej, kalusa, poprzez wierzchołki wzrostu, po zarodki somatyczne oraz zygotyczne, zarówno dla gatunków roślin klimatu umiarkowanego jak i tropikalnego (Engelmann 2004).

Metoda witrifikacji została opracowana dla zawiesiny komórkowej *Asparagus officinalis* przez zespół Uragami w 1989 roku (Kami 2012). Przez wiele lat była udoskonalana, aby stać się jedną z najefektywniejszych metod krioprezerwacji. Witrifikacja jest procesem polegającym na działaniu wysokoskoncentrowanymi kriochronnymi roztworami, mającymi za zadanie właściwe odwodnienie i przechłodzenie tkanki roślinnej, aby finalnie po zanurzeniu w ciekłym azocie przybrała ona zeszkłą postać, unikając formowania kryształków lodu. W komórkach, które przybierają postać „szkła” wszystkie reakcje chemiczne zostają zahamowane, co prowadzi do ich metabolicznej dezaktywacji (Sakai i in. 2007). Utrzymywanie kolekcji czosnku pospolitego w warunkach polowych przez wiele lat stwarza wiele zagrożeń, dlatego też zastosowanie krioprezerwacji może być dodatkowym zabezpieczeniem tych cennych materiałów. W tym celu w dniu 1 kwietnia 2010 roku został uruchomiony Międzynarodowy Trójstronny Kriobank Genów (Czechy-Niemcy-Polska) w Pracowni Zasobów Genowych Roślin Warzywnych Instytutu Ogrodnictwa. Głównym założeniem działalności Kriobanku Genów jest przechowywanie materiału roślinnego tego samego obiektu czosnku w co najmniej dwóch lokalizacjach. Obecnie w Kriobanku Genów Instytutu Ogrodnictwa jest przechowywanych 147 obiektów czosnku pospolitego: 51 obiektów z Crop Research Institute (CRI), Praha - Ruzyně, Czechy; 34 obiekty z Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Gatersleben, Niemcy oraz 62 obiekty pochodzące z kolekcji czosnku Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach. Dla właściwego zabezpieczenia materiału roślinnego Instytut Ogrodnictwa wysłał do długoterminowego przechowywania 58 bezpiecznych duplikatów czosnku: 31 obiektów do IPK Gatersleben oraz 27 obiektów do CRI Praga.

Celem niniejszych badań była ocena przydatności metody witrifikacji do długoterminowego przechowywania w ciekłym azocie zasobów genetycznych czosnku pospolitego nie tworzącego pędów kwiatostanowych.

MATERIAŁ I METODY

Przedmiotem badań było 10 odmian miejscowych czosnku pospolitego (*Allium sativum* L.), nie tworzącego pędów kwiatostanowych, wybranych z kolekcji banku genów utrzymywanej w Instytucie Ogrodnic-

stwa w Skierniewicach. Badane obiekty były zebrane podczas ekspedycji na terenie Albanii, Włoch i Polski. Wykaz i pochodzenie omawianych obiektów czosnku zamieszczono w tabeli 1.

Tabela 1. Wykaz obiektów czosnku pospolitego, nie tworzącego pędów kwiatostanowych, poddanych krioprezewacji

Table 1. List of cryopreserved non-bolting garlic accessions

Nr obiektu Accession number	Nr kolekcyjny Collection number	Rok włączenia do kolekcji Acquisition year	Miejsce zebrania Collection site	Kraj pochodzenia Origin country
14K	33/80	1986	Pacanów, k/Stopnicy	Polska
50K	185/83	1983	Rekowo, k/Redy	Polska
445K	POLMRO-40	2002	Uźranki, k/Mrągowa	Polska
72K	155/82	1982	Czarnopole k/Lęczycy	Polska
VC90-04	ITA365CV100004	1995	Altamura	Włochy
VC90-61	ITA365CV1000061	2001	Corigliano	Włochy
1014K	POLTAR00-20	2000	Topola k/Kazimierzy Wielkiej	Polska
VC90-22	ITA365CV1000022	1997	Tirana	Albania
33K	29/80	1980	Stopnica k/Buska Zdrój	Polska
VC90-24	ITA365CV1000024	1997	Marsicovetere	Włochy

Materiałem badawczym były rośliny *in vitro* dziesięciu odmian miejscowych czosnku pospolitego nie tworzącego pędów kwiatostanowych. Do wyprowadzenia kultur *in vitro* wykorzystano merystemy wyizolowane z ząbków czosnku o długości 5 mm i szerokości 4 mm. Ząbki czosnku sterylizowano w 70% alkoholu przez 20 sekund, a następnie w 3% roztworze podchlorynu sodu przez 25 minut, po czym materiał przepłukiwano 3 - 4-krotnie wodą destylowaną. Do zabezpieczenia badanych obiektów czosnku w ciekłym azocie zastosowano metodę witrifikacji.

Obiekty czosnku w postaci roślin *in vitro* przygotowywano na stres ultraniskiej temperatury poprzez umieszczenie ich w fitotronie, w alternatywnych warunkach, tj. w temperaturze 25°C przez 16 godz.

w świetle oraz w temperaturze -1°C przez 8 godz. w ciemności, przez 4 tygodnie. Następnie izolowano merystemy z roślin *in vitro* o długości 2-3 mm i szerokości 1-2 mm i poddawano prekulturyze na pożywce MS (Murashige, Skoog 1962) wzbogaconej 0,1 mg/L kwasu naftylo-1-octowego (NAA), 0,5 mg/L 2-izopentyloadeniną (2i-P) oraz 10% sacharozą przez 24 godziny w świetle w temperaturze 20°C . 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. Do długoterminowego przechowywania przeznaczono 100 eksplantatów, jeśli regeneracja była równa lub wyższa niż 30%. Jeżeli regeneracja wynosiła 10-30% do długoterminowego przechowywania przeznaczano 200 eksplantatów, natomiast jeśli regeneracja wynosiła poniżej 10%, taki obiekt nie był typowany do przechowywania w ciekłym azocie. 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 1,2M roztworem sacharozy przez 10 minut. Następnie eksplantaty pozostawiono do oceny przeżywalności i regeneracji na pożywce MS (Murashige, Skoog 1962) wzbogaconej 0,1 mg/L NAA, 0,5 mg/L 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

Prezentowane w niniejszej pracy wyniki krioprezerwacji wykazały bardzo duże zróżnicowanie przeżywalności eksplantatów czosnku po stresie w ultraniskiej temperaturze. Po dwóch tygodniach od rozmrożenia przeżywalność eksplantatów wahała się od 10,4% do 84%, w zależności od obiektu. Natomiast regeneracja eksplantatów czosnku była zdecydowanie niższa i wynosiła od 2,0% do 40,0% w zależności od genotypu (tab. 2). Podobne wyniki uzyskał Keller (2005) w badaniach dotyczących krioprezerwacji czosnku, nie tworzącego pędów kwiatostanowych, w których regeneracja była również zróżnicowana i wahała się od 0% do 60%.

Dla porównania, przeżywalność obiektów czosnku pospolitego, tworzących pędy kwiatostanowe (materiał badawczy stanowiły cebulki powietrzne), była znacznie wyższa niż obiektów nie tworzących pędów kwiatostanowych. Tylko jeden spośród dziesięciu przetestowanych obiektów wykazywał przeżywalność równą 66%, natomiast w przypadku dziewięciu pozostałych wynosiła ona 100%. Z kolei regeneracja obiektów tworzących pędy kwiatostanowe wynosiła od 30% do 92% (Olas-Sochacka, Kotlińska 2010).

Tabela 2. Przeżywalność i regeneracja obiektów czosnku pospolitego nie tworzącego pędów kwiatostanowych po krioprezewacji
Table 2. Survival and regrowth of non-bolting garlic accessions after cryopreservation

Numer obiektu Access. number	Liczba eksplantatów przechowywanych w ciekłym azocie Number of explants stored in liquid nitrogen	Eksplantaty kontrolne Number of control explants	Liczba eksplantatów po 2 tygodniach Survived explants after 2 weeks	Przeżywalność po 2 tyg. Survival after 2 weeks (%)	Liczba zregenerowanych eksplantatów po 10 tyg. Regrowth plantlets after 10 weeks	Regeneracja po 10 tyg. Regrowth plantlets after 10 weeks (%)
14K	100	50	42	84,0	20	40,0
50K	100	50	11	22,0	16	32,0
445K	100	50	16	32,0	16	32,0
72K	100	50	10	20,0	15	30,0
VC90-04	100	50	24	48,0	15	30,0
VC90-61	100	50	21	42,0	15	30,0
1014K	200	47	8	16,0	10	20,0
VC90-22	200	50	14	28,0	7	14,0
33K	0	48	5	10,4	3	6,25
VC90-24	0	50	14	26,0	1	2,0

Keller (2005) zastosował dla roślin *in vitro* czosnku 3 różne reżimy temperatury, przez 10-12 tygodni. Pierwszą kombinacją była stała temperatura 25°C w świetle przez 16 godz. i przez 8 godz. w ciemności, druga kombinacja to 25°C przez 16 godz. w świetle i temperatura -1°C przez 8 godz. w ciemności oraz trzecia kombinacja to stała temperatura 2°C przez 16 godz. w świetle i 8 godz. w ciemności. Najlepsze efekty krio-

prezerwacji Keller (2005) uzyskał w drugiej kombinacji temperatury (25°C przez 16 godz. w świetle i -1°C przez 8 godz. w ciemności), a regeneracja w zależności od genotypu czosnku wynosiła od 0% do 60%. Niino (1992) stosując metodę witrifikacji dla roślin *in vitro* jabłoni po 3 tygodniach hartowania w temperaturze 5°C (przy fotoperiodzie 8 godz. dzień) uzyskał regenerację na poziomie 80%, natomiast dla roślin nie poddanych hartowaniu zaledwie 25%. Zhao (2005) poddawał rośliny *in vitro* ziemniaka hartowaniu przez 3 tygodnie w temperaturze 10°C i fotoperiodzie 16 godz. dzień i 8 godz. noc, po zastosowaniu metody witrifikacji uzyskał regenerację od 10% do 58% w zależności od genotypu.

Prezentowane w niniejszej pracy wyniki pokazują, że regeneracja obiektów nie tworzących pędów kwiatostanowych jest zdecydowanie niższa niż obiektów tworzących pędy kwiatostanowe. Najwyższą regenerację w przypadku obiektów nie tworzących pędów kwiatostanowych osiągnięto na poziomie 40%, natomiast w przypadku obiektów tworzących pędy kwiatostanowe, gdzie materiałem wyjściowym były eksplantaty wyizolowane z cebulek powietrznych, najwyższą regenerację osiągnięto na poziomie 92% (Olas-Sochacka, Kotlińska 2010). Można przypuszczać, że różnice te są uwarunkowane genetycznie, ale warto również dopracować procedury związane z przygotowaniem roślin *in vitro* na stres ultraniskiej temperatury.

Zgodnie ze standardami wyznaczonymi dla Kriobanku Genów, gdy regeneracja eksplantatów czosnku po krioprezerwacji jest równa lub wyższa niż 30% należy przechowywać w ciekłym azocie sto eksplantatów. Spośród dziesięciu obiektów czosnku pospolitego, nie tworzącego pędów kwiatostanowych, sześć obiektów można przechowywać w takiej ilości. Jeśli regeneracja eksplantatów wynosi od 10% do 30% w ciekłym azocie należy wówczas umieścić dwieście eksplantatów. Dlatego też dwa z dziesięciu wytypowanych obiektów jest przechowywane w liczbie dwustu eksplantatów. Natomiast w przypadku, gdy regeneracja eksplantatów jest niższa niż 10% takiego obiektu nie można uznać za właściwy do długoterminowego przechowywania, a spośród badanych obiektów czosnku dwa nie spełniają standardów wyznaczonych dla Kriobanku Genów.

WNIOSKI

1. Przeżywalność i regeneracja eksplantatów czosnku pospolitego nie tworzącego pędów kwiatostanowych po zastosowaniu metody witrifikacji w przypadku ośmiu z dziesięciu obiektów była wystarczająco wysoka, aby można je było zabezpieczyć w Kriobanku Genów.

2. Zastosowana technika witrifikacji jest przydatna do długoterminowego przechowywania czosnku pospolitego.
3. Efektywność krioprezewacji w dużym stopniu zależy od genotypu czosnku.
4. Przechowywanie zasobów genowych czosnku pospolitego w ciekłym azocie zapewnia ich lepsze zabezpieczenie, zmniejsza ryzyko utraty zmienności genetycznej oraz obniża koszty utrzymania kolekcji polowych.

Literatura

- Engelmann F. 2004. Plant cryopreservation: progress and prospects. *In vitro Cell. Dev. Biol.- Plant*, 40: 427-433.
- Harding K. 2004. Genetic integrity of cryopreserved plant cells: a review. *CryoLetters* 25: 3-22.
- Kami D. 2012. Cryopreservation of plant genetic resources, current frontiers in cryobiology. Igor I. Katkov (ed.), ISBN: 978-53-51-0191-8.
- Kaviani B. 2011. Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. *Australian Journal of Crop Science* 5(6): 778-800.
- Keller J. 2005. Improvement of cryopreservation results in garlic using low temperature preculture and high-quality *in vitro* plantlets. *CryoLetters* 26 (6): 357-366.
- Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Niino T., Sakai A., Yakuwa H., Nojiri K. 1992. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of apple and pear by vitrification. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 28: 261-266.
- Sakai A., Engelmann F. 2007. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification and: a review. *CryoLetters* 28(3): 151-172.
- Olas-Sochacka M., Kotlińska T. 2010. Krioprezewacja zasobów genetycznych czosnku pospolitego (*Allium sativum* L.) tworzącego pędy kwiatostanowe. *Nowości Warzywnicze* 50: 69-74.
- Zhao M-A., Dhital S., Fang Y-J., Khu D-M., Song Y-S., Park E-J., Kang C-W., Lim H-T. 2005. Application of slow-freezing cryopreservation method for the conservation of diverse potato (*Solanum tuberosum* L.) genotypes. *Journal of Plant Biotechnology* 7(3): 183-186.

Marta Olas-Sochacka, Teresa Kotlińska

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

Summary

Cryopreservation by vitrification has been recognized as a practical and efficient method for long-term storage of vegetatively propagated non-bolting garlic accessions. *In vitro* plantlets of ten non-bolting garlic accessions were cold acclimated at 25°C under 16h light/-1°C dark for four weeks. Shoot tips (size 2-3 mm of length and about 1 mm in diameter) were isolated from *in vitro* plantlets and treated with solution A (0,4 M sucrose, 2 M glycerol) for 20 min and PVS3 (50% sucrose w/v, 50% w/v glycerol) for 120 min. After dehydration the shoot tips were directly plunged into liquid nitrogen. Survival was observed two weeks after cryopreservation and regrowth after ten weeks. Regrowth of explants of investigated non-bolting garlic accessions ranged from 2,0 to 40%. This vitrification method was successfully applied to eight from ten non-bolting garlic accessions.