



METODYKA

Zastosowanie technik *in vitro* w produkcji elitarnego materiału rozmnożeniowego czosnku (*Allium sativum* L.)

Autorzy: dr W. Kiszczał, prof. dr hab. T. Orlikowska, prof. K. Górecka, dr A. Wojtania,
dr T. Malinowski, dr D. Wójcik, mgr M. Markiewicz, mgr U. Kowalska

Opracowanie wykonane w ramach **zadania 1.5**
„System oceny jakości, zdrowotności, czystości odmianowej i tożsamości genetycznej roślin
ogrodniczych rozmnażanych metodą *in vitro*”

Programu wieloletniego (2015–2020)
pn. „Działania na rzecz poprawy konkurencyjności i innowacyjności sektora ogrodniczego
z uwzględnieniem, jakości i bezpieczeństwa żywności oraz ochrony środowiska naturalnego”,
finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi

Skierniewice 2018

Wprowadzenie

Czosnek pospolity (*Allium sativum* L.) jest rośliną warzywną pochodzącą z Azji Mniejszej. Czosnek został udomowiony i zaczął być uprawiany ok. 5 tysięcy lat temu. Dużą popularność zyskał już w starożytności. Ceniony jest nie tylko ze względu na walory smakowe (Buchwald i in. 2000), lecz również ze względu na wysoką wartość prozdrowotną. Czosnek pospolity jest szeroko akceptowaną rośliną leczniczą, m.in. o działaniu przeciwbakteryjnym, przeciwgrzybiczym, przeciwmiażdżycowym, obniżającą cholesterol, której skuteczność dowiedziono badaniami klinicznymi (Maidment i in. 2002, Mikaili i in. 2013). W ostatnim czasie popyt na czosnek rośnie, zarówno na świecie jak i w Polsce. Tylko w latach 2005-2009 wzrósł on dwukrotnie. Jego uprawa staje się coraz bardziej dochodowa, również w Polsce. Mimo wyższych cen, Polacy chętniej kupują rodzimy czosnek ze względu na intensywniejszy aromat i lepszy smak w porównaniu z czosnkiem chińskim. Utrzymujące się wysokie ceny oraz popyt wpływają na wzrastające zainteresowanie uprawą tej rośliny. Tymczasem produkcja czosnku w Polsce maleje, m.in. z powodu wymagań glebowych, pracochłonnej uprawy i ponoszonych strat.

Czosnek pospolity nie wytwarza nasion. Rozmnażany jest tylko wegetatywnie. Cebulki (zębki podziemne lub powietrzne), czyli w istocie pąki o funkcji spichrzowej, sadi się do gruntu jesienią lub wiosną. Do sadzenia należy wykorzystywać zdrowe zębki pozyskiwane z dużych cebul, a najlepiej kwalifikowany materiał wysadkowy o wysokiej jakości i zdrowotności, o potwierdzonej tożsamości genetycznej. Niestety używany materiał siewny często jest zawirusowany, 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). Już przy współdziałaniu dwóch wirusów może dojść do straty plonu nawet o 78% (Fidan i in. 2009).

Jak do tej pory nie ma skutecznej chemicznej czy biologicznej metody ochrony czosnku przed wirusami. Można jedynie ograniczyć ich rozprzestrzenianie poprzez zwalczanie wektorów oraz dezynfekcję narzędzi. Jediną metodą uzyskiwania roślin wolnych od wirusów jest technika kultury *in vitro* merystemów. Zwykle hodowle merystemów bywają łączone z innymi metodami zwalczania roślinnych wirusów – termoterapią i chemioterapią (Mahmoud et al. 2009). Dlatego też w Instytucie Ogrodnictwa w ramach zadania 1.5 "System oceny jakości, zdrowotności, czystości odmianowej i tożsamości genetycznej roślin ogrodniczych rozmnażanych metodą *in vitro*" Programu wieloletniego: „Działania na rzecz poprawy konkurencyjności i innowacyjności sektora ogrodniczego z uwzględnieniem jakości i bezpieczeństwa żywności oraz ochrony środowiska naturalnego” opracowano technologię wytwarzania metodami *in vitro* wolnego od wirusów materiału nasadzeniowego czosnku uwzględniającą ocenę zdrowotności, tożsamości genetycznej i kondycji fizjologicznej.

Inicjacja Kultur

Jest to niezwykle istotny etap, rzutuający na wyniki całego procesu mikrorozmnażania. Kultury nie powinny być inicjowane z materiału przypadkowego, dlatego należy użyć kwalifikowany materiał nasadzeniowy czosnku z udokumentowanym pochodzeniem.

Eksplantatami inicjalnymi do zakładania kultur *in vitro* powinny być mięsiste łuski z merystemem i częścią piętki, wycinane z cebul tzw. „twin scales”. Tak przygotowane eksplantaty po przeniesieniu do laboratorium należy sterylizować przez 2 minuty w 70% etanolu z dodatkiem 1 kropli Tweenu 20, a następnie 3 krotnie płukać dejonizowaną, sterylną wodą. Eksplantaty inicjalne należy wykładać do probówek lub kolbek Erlenmayera na pożywkę B5 (Gamborg 1968) (Tab.1, 2 i 3) zawierającą 30 g·l⁻¹ sacharozy, 10 mg·l⁻¹ kinetyny, 0,1 mg·l⁻¹ NAA, o pH 5,8. Kultury powinny być umieszczone w fitotronie, w temperaturze 23±2°C, na świetle białym o natężeniu napromieniowania 30 μmol m⁻² s⁻¹ i 16-godzinnym fotoperiodzie.

Tabela 1. Składniki mineralne pożywki B₅

Makroelementy	mg / litr pożywki	mikroelementy	mg / l pożywki
(NH ₄) ₂ SO ₄	134	KJ	0,75
KNO ₃	2500	MnSO ₄ x H ₂ O	10
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	150	H ₃ BO ₃	3
CaCl ₂ x 2H ₂ O	150	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	2
MgSO ₄ x 7H ₂ O	250	Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,25
		CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,025
		CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,025
		Na ₂ FeDTA	37,3
		FeSO ₄ x 7H ₂ O	27,8

Tabela 2. Witaminy pożywki B₅

Witaminy	mg / l pożywki
kwask nikotynowy	1,0
hydrochlorek pirydoksyny	1,0
hydrochlorek tiaminy	10,0

Tabela 3. Związki organiczne pożywki B₅

Związki organiczne	mg / l pożywki
Myo-inositol	100

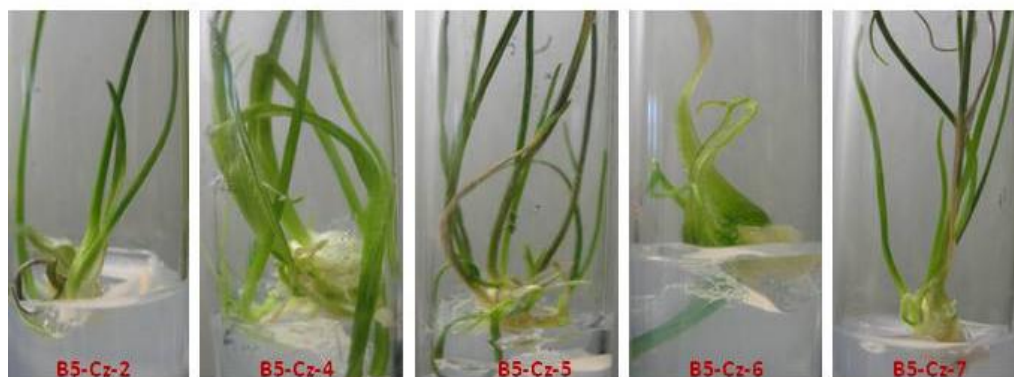
Testy na obecność wirusów

Według danych literaturowych na czosnku zdiagnozowano występowanie 14 wirusów: OYDV (Onion yellow dwarf virus), LYSV (Leek yellow stripe virus), SLV (Shallot latent virus), GCLV (Garlic common latent virus), GarV-X (Garlic virus X), ShV-X (Shallot virus X), GarV-A (Garlic virus A), GarV-B (Garlic virus B), GarV-C (Garlic virus C), GarV-D (Garlic virus D), GarMbMV (Garlic mite-borne mosaic virus), IYSV (Iris yellow spot virus), GYSV (Garlic yellow streak virus), GCLV (Garlic common latent virus).

Testom na obecność wirusów powinny być poddane rośliny mateczne i zainicjowane kultury pędów. Zdrowotność roślin ocenia się metodą DAS-ELISA z wykorzystaniem zestawu przeciwciał poliklonalnych i/lub techniką RT-PCR z użyciem specyficznych starterów. Porażone rośliny powinny być usuwane, a w przypadku braku zdrowego materiału powinny być poddane termo- lub chemioterapii. Termoterapia odbywa się przez umieszczenie kultur pędów rosnących na pożywce B5 zawierającej $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ kinetyny i $0,1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ NAA na 14 dni w komorze wzrostowej w temperaturze $+40^{\circ}\text{C}$. W przypadku chemioterapii *in vitro* do pożywek dodaje się substancje, które hamują syntezę lub uszkadzają wirusowe RNA. W przeprowadzonych doświadczeniach stosowano rybawirynę w stężeniu $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Selekcję roślin potencjalnie uwolnionych od wirusów należy prowadzić na podstawie wielokrotnie powtarzanych testów RT-PCR i odrzucaniu linii kultur *in vitro*, jeśli choć jeden test wskazał na obecność wirusa. Powyższe zabiegi pozwoliły na uzyskanie roślin czosnku wolnych od wirusów. Doświadczenia wykazały, że część materiału roślinnego uległa odwirusowaniu w trakcie trwania kultur bez dodatkowych zabiegów.

Namnażanie pędów

Wolny od wirusów materiał roślinny wykłada się na pożywkę stymulującą tworzenie pędów, w celu uzyskania pożądanej ilości wysokiej jakości materiału rozmnożeniowego. Namnażanie pędów prowadzi się na pożywce B5 zawierającej $30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ sacharozy, $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ BAP, 0,1% PPM, zestalonej agar (Plant Agar Sigma; $5,1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$), o pH 5,8. Substancja PPM (Plant Preservative Mixture) dodawana jest do pożywki celem zapobiegania i eliminacji zanieczyszczeń mikrobiologicznych pojawiających w trakcie kolejnych pasażów. Kultury umieszcza się w fitotronie, w temperaturze $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, na świetle białym o natężeniu napromieniowania $30 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ i 16-godzinnym fotoperiodzie.



Rośliny czosnku odmiany 'Jarus' na etapie regeneracji (fot. U. Kowalska)

Ukorzenianie pędów i cebulowanie

Nieukorzenione pędy uzyskane na drodze regeneracji w kulturach *in vitro* celem wywołania procesu ryzogenezy należy wyłożyć na pożywkę B₅ zawierającą 10 mg·l⁻¹ kinetyny i 0,1 mg·l⁻¹ NAA. Po 4 tygodniach uzyskamy ukorzenione pędy. Przetrzywanie dłuższe na pożywkę spowoduje wytwarzanie się cebulek. Pierwsze cebulki w zależności od genotypu możemy uzyskać po 6 tygodniach od wyłożenia pędów na pożywkę ukorzeniającą.

Aklimatyzacja

Ukorzenione pędy należy poddać procesowi aklimatyzacji w warunkach *ex vitro*. Rośliny uzyskane w kulturach tkanek mają nieprawidłowo wykształcone wiązki przewodzące, cienką kutikulę, nieuregulowane procesy transpiracji, stąd cechują się dużą wrażliwością na zasychanie. Po wyjęciu ze szkła mikrosadzonki moczy się w 0,2% wodnym roztworze CAPTAN 80 WG, a następnie sadi się w multiplatach, w autoklawowanym przez 20 min w temp 121°C podłożu o składzie: torf i piasek, zmieszany w stosunku 1:3, wzbogacone Polifoską (2,2 g·l⁻¹). Multiplaty należy umieścić w warunkach wysokiej wilgotności, np. w plastikowych zamkniętych pojemnikach z przezroczystym przykryciem, w fitotronie, w temperaturze w zakresie od 18-24°C i 16 h fotoperiodzie. Po 2-3 tygodniach należy rozpocząć stopniowe wentylowanie pojemników. Aklimatyzację roślin prowadzi się przez 5-8 tygodni.



Rośliny czosnku podczas aklimatyzacji



Zaaklimatyzowane rośliny czosnku w szklarni (fot. W. KiszczaK)

Ocena tożsamości genetycznej roślin czosnku w kultur *in vitro*

Ocena tożsamości genetycznej przeprowadzamy w sytuacji, gdy zachodzi konieczność potwierdzenia tożsamości odmianowej. W przypadku rozmnażania *in vitro* oceniana jest także stabilność genetyczna uzyskanego tą drogą materiału roślinnego.

Wykonanie oceny tożsamości genetycznej roślin matecznych przebiega w następujących etapach:

- 1/ Pobranie materiału roślinnego
- 2/ Izolacja DNA
- 3/ Analiza ISSR
- 4/ Analiza AFLP

W pierwszym etapie, spośród testowanych starterów wytypowane te, które w najwyższym stopniu różnicowały badane odmiany (Tab. 4). Przy ich zastosowaniu wykazano, iż badane odmiany są tożsame genetycznie.

Tabela 4. Startery ISSR i AFLP wytypowane do analiz tożsamości genetycznych roślin czosnku.

<i>Startery ISSR</i>	<i>Startery AFLP</i>
822	Pst-TC/Mse-TC
823	Pst-AA/Mse-AC
825	Pst-CC/Mse-CC
853	Pst-CC/Mse-GG
855	Pst-TT/Mse-CC

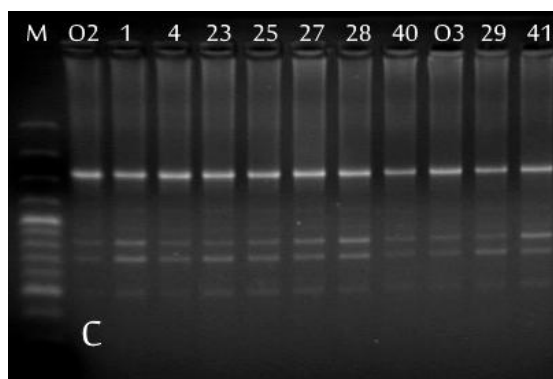
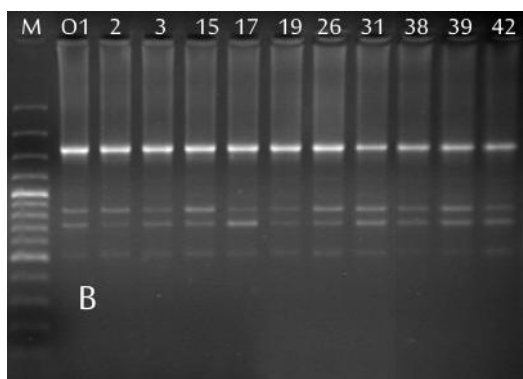
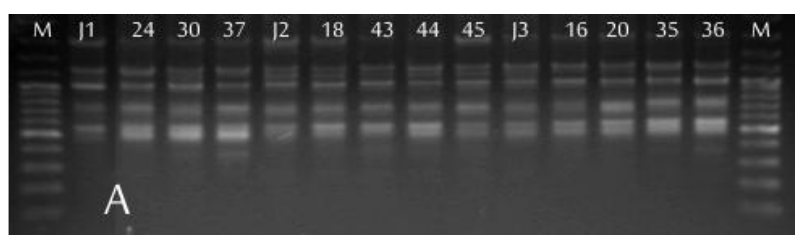
Analiza ISSR

Do badań techniką ISSR wytypowano 5 starterów: 822, 823, 825, 853 i 855. Do przeprowadzenia PCR ze starterami ISSR użyto 20-40 ng wyizolowanego DNA z roślin czosnku. Reakcję prowadzono w 40 µl mieszaniny składającej się z 1 x DreamTaq Green Buffer (Thermo Fisher Scientific), 1,5 µl dNTPs (10 mM) (Promega), 3 µl startera (10 µM) i 2 U DreamTaq Green Polymerase (Thermo Fisher Scientific) w termocyklerze T100 Thermal Cycler (Bio-Rad). Oceniano liczbę, wielkość i zróżnicowanie produktów ISSR-PCR w roślinach matecznych oraz klonach z kultur *in vitro* czosnku.

Wszystkie testowane startery ISSR generowały produkty amplifikacji w reakcji PCR. Wielkość uzyskanych produktów wynosiła od 3000 pz do 200 pz. Analiza ISSR-PCR wykazała polimorfizm pomiędzy roślinami matecznymi i pochodzącymi z kultur *in vitro* czosnku wynoszący 7,1% w przypadku odmiany 'Ornak' i 11,1% dla odmiany 'Jarus'. Szczegółową analizę markerów ISSR przedstawiono w tabeli 5. Zaprezentowano przykładowe rozdziały elektroforetyczne produktów ISSR-PCR uzyskanych w reakcji z DNA roślin czosnku.

Tabela 5. Analiza markerów ISSR w roślinach czosnku odmiany ‘Ornak’ i Jarus’ pochodzących z kultur *in vitro* oraz roślin macierzystych.

odmiana	starter	wielkość produktów amplifikacji	liczba produktów amplifikacji		polimorfizm [%]	
			ogółem	polimorficzne		
‘Ornak’	822	3000 - 400	7	1	14,3	7,1
	823	3000 - 300	6	0	0	
	825	1600 - 300	6	0	0	
	853	1600 - 300	4	0	0	
	855	2500 - 300	5	1	20	
‘Jarus’	822	3000 - 200	4	1	25	11,1
	823	3000 - 400	8	2	25	
	825	1300 - 300	5	0	0	
	853	3000 - 500	5	1	20	
	855	1500 - 300	7	0	0	



Elektroforetyczny rozdział produktów amplifikacji ISSR-PCR z DNA roślin czosnku odmiany ‘Jarus’ z zastosowaniem startera 823 (A) i czosnku odmiany ‘Ornak’ z zastosowaniem startera 853 (B i C). J1, J2, J3, O1, O2, O3 – reakcja z DNA roślin macierzystych odmiany ‘Jarus’ i ‘Ornak’, M - wzorzec masowy 100 bp DNA Ladder (Fermentas).

Analiza AFLP

Analizę AFLP tożsamości genetycznej klonów *in vitro* czosnku prowadzono według Zabeau and Vos (1993). Do analizy użyto 50 ng wyizolowanego DNA z klonów *in vitro* oraz roślin macierzystych czosnku odmian ‘Jarus’ i ‘Ornak’. Poziom polimorfizmu w analizowanych odmianach czosnku wyliczony na podstawie analizy markerów AFLP był zbliżony do wyniku analizy markerów ISSR i wynosił 7,8% dla odmiany ‘Ornak’ i 10,2% dla odmiany ‘Jarus’.

Nie wszystkie użyte w analizie AFLP pary starterów generowały produkty polimorficzne. W reakcji różnicowej amplifikacji z niektórymi parami starterów uzyskano bardzo dużą liczbę amplifikowanych fragmentów DNA, co spowodowało trudność w analizie uzyskanych wyników. Szczegółową analizę markerów AFLP przedstawiono w tabeli 6.

Tabela 6. Analiza markerów AFLP w roślinach czosnku odmiany ‘Ornak’ i ‘Jarus’ pochodzących z kultur *in vitro* oraz roślin macierzystych.

odmiana	pary starterów AFLP	liczba produktów amplifikacji		polimorfizm [%]	
		ogółem	polimorficzne		
‘Ornak’	Pst-TC/Mse-TC	13	0	0	7,8
	Pst-AA/Mse-AC	78	6	7,7	
	Pst-CC/Mse-CC	65	2	3,1	
	Pst-CC/Mse-GG	73	10	13,7	
	Pst-TT/Mse-CC	105	8	7,6	
‘Jarus’	Pst-TC/Mse-TC	22	0	0	10,2
	Pst-AA/Mse-AC	86	6	7,0	
	Pst-CC/Mse-CC	67	11	16,4	
	Pst-CC/Mse-GG	54	10	18,5	
	Pst-TT/Mse-CC	94	6	6,38	

Literatura

- Buchwald W., Dedio I., Szczygielewska D. 2000. Rośliny zielarskie w apteczce domowej i kuchni. Wiadomości Zielarskie, s.14-15.
- Fidan H, Baloğlu S, Koç G, Birişik N. 2009. New virus diseases for Turkey detected in onion and garlic: onion yellow dwarf virus and shallot latent virus. Turkey's National 3rd Plant Protection Congress, July 2009, Van, Turkey. p. 131.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell. Res.* 50: 148-151.
- Klukáčková J., Navrátil M., Duchoslav M. J. 2007. *J. Plant Dis. Protect.* 114/3:97–100
- Mahmoud S. Y. M., Hosseney M. H., Abdel-Ghaffar M. H., 2009. Evaluation of some therapies to eliminate potato Y potyvirus from potato plants. – *Int. J. Virol.* 5(2): 64-76;
- Maidment D., Dembny Z., Watts D. 2001. The antibacterial activity of 12 *Allium* against *Escherichia coli*. *Nut. Food Sci.* 4/5: 238–241.
- Mikaili P, Maadirad S, Moloudizargari M, Aghajanshakeri S, Sarahroodi S. 2013. Therapeutic Uses and Pharmacological Properties of Garlic, Shallot, and Their Biologically Active Compounds. *Iran J. Bas. Med. Sci.* 16(10):1031-1048.
- Zabeau M., Vos P. 1993. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application 92402629.7, Publication number 0 534 858 A1.