

Zalecenia oceny stabilności genetycznej roślin czosnku rozmnażanych *in vitro*

Opracowanie: mgr Monika Markiewicz, dr Agnieszka Wojtania, dr Danuta Wójcik

Czosnek pospolity (*Allium sativum* L.)

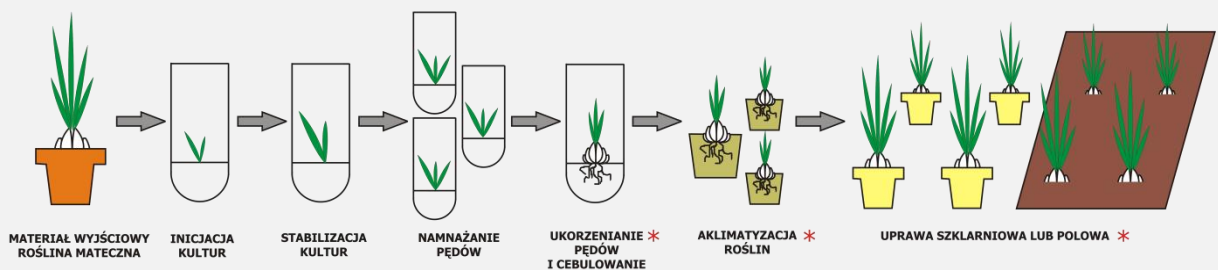
Jest rośliną pochodzącą z Azji Mniejszej, należącą do 20 najważniejszych warzyw na świecie. Największymi producentami są Chiny, Indie, Korea, Egipt oraz Rosja. W Polsce produkuje się ok. 15-20 tys. ton na powierzchni ok. 3 tys. ha. W ostatnim czasie popyt na czosnek rośnie, a uprawa staje się coraz bardziej dochodowa. Jednak w Polsce **produkcja maleje** z powodu wysokich wymagań glebowych, pracochłonnej uprawy a przede wszystkim z powodu chorób wirusowych.

Do zakładania plantacji zaleca się wykorzystywanie materiału o wysokiej zdrowotności i jakości, najlepiej kwalifikowanego. Niestety, używany w produkcji materiał siewny często jest zawirusowany. Skuteczną metodą uwalniania roślin od wirusów jest kultura *in vitro* merystemów.

Rozmnażanie roślin metodą *in vitro* jest techniką powszechnie stosowaną w produkcji ogrodniczej, wykorzystywaną w produkcji elitarnego materiału szkółkarskiego (przedbazowego), a także w produkcji sadzonek do bezpośredniego sadzenia na plantacjach oraz w pracach hodowlanych. Mikrorozmnażanie umożliwia otrzymywanie dużej liczby jednorodnego materiału roślinnego o wysokiej jakości niezależnie od pory roku.

Warunkiem pomyślnego wykorzystania technik *in vitro* w produkcji wysokiej jakości materiału rozmnożeniowego jest utrzymanie **stabilności genetycznej** danego genotypu.

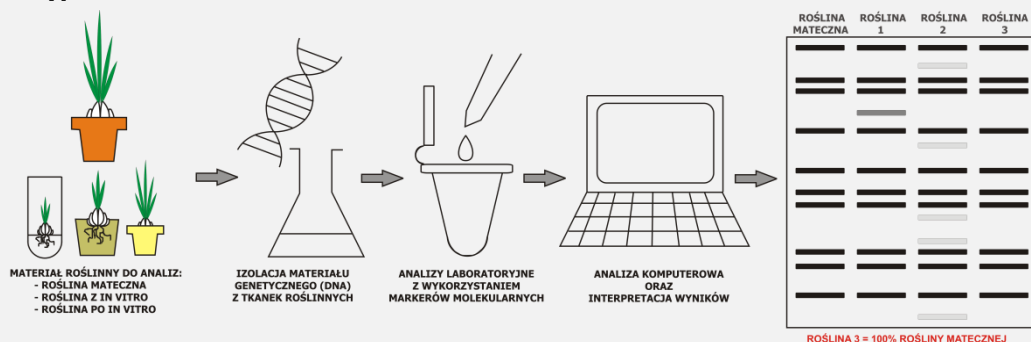
Mikrorozmnażaniu może towarzyszyć zjawisko **zmienności somaklonalnej**, która jest wynikiem zmian trwałych (**zmienność genetyczna** – mutacje, zmiany w ilości lub strukturze chromosomów) lub przejściowych (**zmienność epigenetyczna** – metylacja DNA). Stopień zmienności zależy od systemu regeneracji, warunków kultury i genotypu. Najczęściej występuje zmienność przejściowa, która pojawia się okresowo, a jej morfologiczne objawy w postaci zmian w kształcie i strukturze liści, czy też zwiększona zdolność do tworzenia pędów zanikają po pewnym okresie wzrostu rośliny w warunkach „poza szklarnią”.



Schemat 1. Proces mikrorozmnażania z zaznaczeniem etapów, w których zaleca się wykonywanie oceny stabilności genetycznej materiału roślinnego (*).

Bardzo pomocne w określeniu stabilności genetycznej są **analizy molekularne** oparte na łańcuchowej reakcji polimerazy – PCR (ang. *Polimerase Chain Reaction*). Przy ich zastosowaniu można określić zróżnicowanie pomiędzy odmianami danego gatunku, a posiadając wzorzec (rośliny w bankach genów) określić czystość odmianową. Dużą przydatność w identyfikacji zmienności genetycznej wykazują **markery molekularne** typu AFLP (ang. *Amplified Fragment Length Polymorphism*) i ISSR (ang. *Inter Simple Sequence Repeat*), które cechuje wysoka powtarzalność wyników i łatwość aplikacji. Analiza oparta na markerach DNA pozwala ocenić status genetyczny odmian, niezależnie od stadium rozwojowego rośliny czy rodzaju tkanki, z której pobiera się próby do analiz.

Wykorzystanie markerów molekularnych daje możliwość wykrywania zmian na poziomie genomu, które nie muszą ujawniać się w fenotypie.



Schemat 2. Ocena stabilności genetycznej materiału roślinnego z wykorzystaniem markerów molekularnych.

Zalecenia oceny stabilności genetycznej roślin czosnku rozmnażanych *in vitro*

W ramach działań prowadzonych w Zadaniu 1.5 Programu Wieloletniego Instytutu Ogrodnictwa (IO) w latach 2015-2020 opracowano metodykę oceny stabilności genetycznej roślin czosnku rozmnażanych w kulturach *in vitro*.

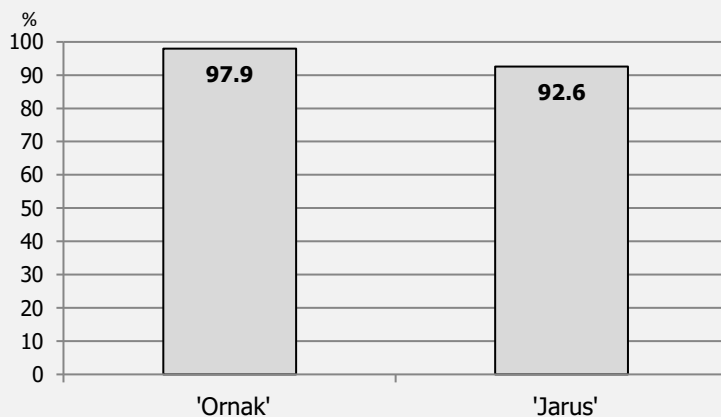
W badaniach zastosowano dwie metody:

- 1) oparta na reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR), a mianowicie amplifikacji fragmentów DNA położonych pomiędzy dwoma mikrosatelitarnymi, powtórzonymi regionami, zorientowanymi w przeciwnych kierunkach – **markery ISSR**;
- 2) oparta na połączeniu kilku reakcji enzymatycznych pozwalająca na identyfikację polimorfizmu długości amplifikowanych fragmentów DNA – **markery AFLP**.

Do oceny stabilności genetycznej roślin uzyskanych na drodze mikrorozmnażania wybrano tego typu markery ze względu na powtarzalność wyników i łatwość aplikacji. Do przeprowadzenia analiz wystarczająca jest **niewielka ilość materiału roślinnego** (ok. 0,1g na próbę). Zaprojektowanie takich starterów nie wymaga wiedzy o sekwencji DNA rośliny badanej, a zastosowanie dwóch rodzajów markerów, amplifikujących różne regiony genomu daje większe szanse na identyfikację zmian genetycznych u badanych roślin.

Rodzaj markera	Nazwa markera
ISSR	822
	823
	825
	853
	855
AFLP	Pst-TC/Mse-TC
	Pst-AA/Mse-AC
	Pst-CC/Mse-CC
	Pst-CC/Mse-GG
	Pst-TT/Mse-CC

Tabela 1. Molekularne markery wykorzystane do oceny stabilności genetycznej roślin czosnku.



Wykres 1. Ocena stabilności genetycznej roślin czosnku pochodzących z kultur *in vitro* w porównaniu z roślinami matecznymi (wyniki uśrednione dla dwóch typów markerów).

Analiza za pomocą markerów molekularnych u odmiany 'Ornak' wysoką stabilność genetyczną roślin rozmnożonych *in vitro*, wynoszącą **97,9%** w porównaniu z roślinami matecznymi. W przypadku mikrorozmnażanych roślin odmiany 'Jarus' średni stopień stabilności genetycznej wynosił **92,6%**. Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że odmiana 'Ornak' charakteryzuje się wyższą stabilnością genetyczną niż odmiana 'Jarus'.

Skuteczna metoda wykrywania zmienności jest cennym narzędziem, pozwalającym na zapewnienie wysokiej jakości roślin rozmnożonych *in vitro*. Zastosowane w metodyce markery umożliwiają utworzenie profili DNA i wykorzystania ich do identyfikacji odmian względem wzorcowych odmian znajdujących się w kolekcjach IO lub względem odmiany dostarczonej przez producenta.

Dodatkowe materiały:

Bednarek P. T., Chwedorzewska K. J. (2001) *Markery molekularne, ich charakterystyka genetyczna oraz wybrane zastosowania w analizie genetycznej roślin*. Biotechnologia 1(52): 3-34

Sztuba-Solińska J. (2005) *Systemy markerów molekularnych i ich zastosowanie w hodowli roślin*. Kosmos 54, 2-3: 227-239

Kiszczak W., Orlikowska T., Górecka K., Wojtania A., Malinowski T., Wójcik D., Markiewicz M., Kowalska U. (2018) *Metodyka - zastosowanie technik in vitro w produkcji elitarnego materiału rozmnożeniowego czosnku (Allium sativum L.)*

<http://www.inhort.pl/pw/pw-realizacja/pw-zalecenia-metodyki/pw-zalecenia-metodyki-rosliny-warzywne>

Olas-Sochacka M. (2016) *Czosnek pospolity (Allium sativum L.) – ulotka*.

<http://www.inhort.pl/pw-zg/pw-zg-publicacje/pw-zg-publicacje-rosliny-warzywne>