

ZWIĘKSZENIE INTENSYWNOŚCI MIKROROZMNAŻANIA CHRZANU (*ARMORACIA RUSTICANA*) *IN VITRO*

INCREASING THE INTENSITY OF HORSERADISH (*ARMORACIA RUSTICANA*) MICROPROPAGATION *IN VITRO*

**Agata Kapuścińska, Maria Burian, Urszula Kowalska,
Waldemar Kiszczak, Danuta Prochaska, Krystyna Górecka**
Instytut Ogrodnictwa w Skierniewicach

WSTĘP I CEL

Chrzan pospolity (*Armoracia rusticana*) jest rośliną wieloletnią, należąca do rodziny kapustowatych. Występuje na obszarach południowo-wschodniej Europy, a także w zachodniej Azji. Obecnie jest uprawiany na coraz większą skalę ze względu na aromatyczny korzeń jadalny. Korzeń chrzanu powszechnie wykorzystuje się jako warzywo przyprawowe, do wyrobu sosów, musztard, ćwikły z chrzaniem oraz jako środek bakteriobójczy i grzybobójczy. Znalazł także zastosowanie w leczeniu niektórych schorzeń, jak np. przewlekłe niestrawności, kamica nerkowa, niedokrwistość. Olejki eteryczne zawarte w chrzanie stosowane są w balsamach łagodzących bóle mięśni, a także objawy przeziębienia.

Chrzan pospolity w naszych warunkach kwitnie obficie, jednak nie zawiązuje nasion, dlatego rozmnaża się go wyłącznie wegetatywnie, przez sadzonki korzeniowe. Taki sposób rozmnażania jest jednak pracochłonny, mało wydajny, a także przyczynia się do przenoszenia chorób wirusowych. Zwykle w uprawie rocznej z jednej rośliny chrzanu uzyskuje się tylko 2-3 sadzonki. Na chrzanie może występować kilka wirusów. Najważniejszy, z ekonomicznego punktu widzenia, jest wirus mozaiki rzepy *Turnip Mosaic Virus* (TuMV). Powoduje on obniżenie plonu chrzanu nawet o 40%. Przy pomocy kultur *in vitro* można otrzymać z roślin zawirusowanych rośliny wolne od tych patogenów. Chcąc wykorzystać kultury *in vitro* do produkcji materiału wolnego od wirusów trzeba dysponować efektywną techniką mikrorozmnażania. Na temat namnażania chrzanu w kulturach tkanek jest mało pozycji w najnowszej literaturze. Araki i in. (1995) opisali metodę namnażania chrzanu z fragmentów liści na pożywce z 2,4-D (kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy i BA (6-benzyloami-nopuryna). Stwierdzili oni różnice w organogenezie na pożywkach o różnych stężeniach tych regulatorów wzrostu oraz w zależności od wieku liści. Najlepsze namnożenie otrzymali z liści młodych, na pożywce zawierającej 0,1 μM 2,4-D i 0,1 μM BA. Shehata i in. (2010)

opisali wpływ karbenicyliny dodawanej do pożywki MS (Murashige and Skoog) na eliminację zakażeń bakteryjnych w kulturach tkanek chrzanu. Nieoczekiwanie stwierdzili też, że wpływa ona na przyspieszenie regeneracji pędów z fragmentów liści.

Celem badań było zbadanie zdolności różnych eksplantatów z chrzanu do regeneracji oraz wpływu pożywek na efektywność tego procesu.

MATERIAŁY I METODY

Korzenie chrzanu przechowywane w temperaturze +4°C, dokładnie opłukano pod bieżącą wodą i poddano jednemu z dwóch sposobów odkażania. Pierwszy z nich polegał na 30-minutowym moczeniu korzeni w 0,5% roztworze chloraminy T, drugi natomiast na 15-minutowym moczeniu w 0,3% roztworze miedzianu WG. Po tym czasie korzenie przysypano piaskiem z dodatkiem torfu. Po 7 dniach z korzeni pobrano pąki wierzchołkowe. Pąki odkażono dwoma sposobami. Pierwszy obejmował 24-godzinne płukanie pąków pod bieżącą wodą, a następnie traktowanie ich 80% alkoholem etylowym przez 6 minut i 10% roztworem chloraminy T przez 10 minut. Drugi sposób to płukanie pąków przez 24 godziny pod bieżącą wodą, 2-godzinna inkubacja w temperaturze 30°C, a następnie 2-godzinna w temperaturze 40°C. Po inkubacji pąki wyjałowiono 80% alkoholem etylowym przez 6 minut i 10% roztworem chloraminy T. Po każdym z wyżej wymienionych sposobów pąki dziesięciokrotnie przepłukano sterylną wodą destylowaną. Ze sterylnych pąków wypreparowano merystemy, które następnie wyłożono na pożywkę MS z dodatkiem 30 g·L⁻¹ sacharozy, 0,2 mg·L⁻¹ BA i 0,5 mg·L⁻¹ putrescyny. Po około 6 tygodniach otrzymane eksplantaty przełożono na pożywkę MS z 1 mg·L⁻¹ NAA (kwas α-naftylo-1-octowy), 0,2 mg·L⁻¹ BA i 0,5 mg·L⁻¹ putrescyny. Po kolejnych 6 tygodniach, podczas pasażu uzyskano następujące kategorie eksplantatów: rozety ukorzenione, rozety bez korzeni, zaczątki rozet, czyli rozwijające się rozety wielkości około 0,5 cm, a także fragmenty kalusa. Jako eksplantat wyjściowy do kolejnego pasażu wybrano rozetę, liść i fragment liścia. Materiał ten przełożono na 8 pożywek. Były to pożywki na bazie MS z dodatkiem 30 g·L⁻¹ sacharozy oraz z różną zawartością roślinnych hormonów wzrostu, zawierające:

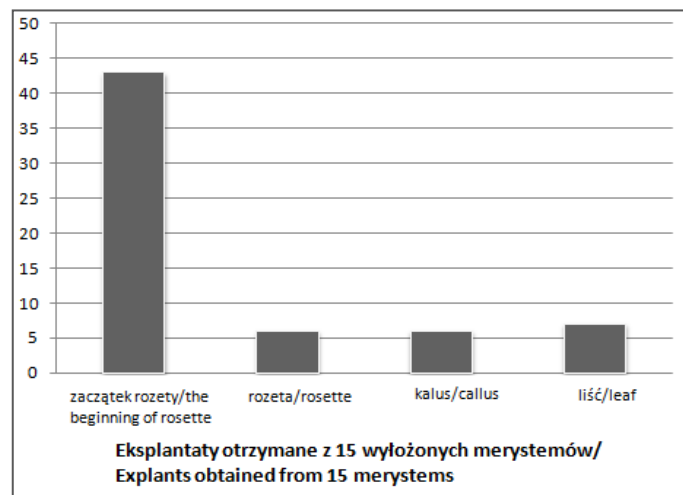
1. 2 mg·L⁻¹ TDZ (tidiazuron) i 1 mg·L⁻¹ NAA 5 mg·L⁻¹ TDZ i 1 mg·L⁻¹ NAA,
2. 10 mg·L⁻¹ TDZ i 1 mg·L⁻¹ NAA,
3. 20 mg·L⁻¹ 2iP (2-izopentyloadenina) i 0,01 mg·L⁻¹ IAA (kwas indolilo-3-octowy),
4. 30 mg·L⁻¹ 2iP i 0,01 mg·L⁻¹ IAA,

5. $40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2iP i $0,01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA,
6. $0,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Kin (kinetyna) i $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA,
7. $0,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA (6-benzylaminopuryna), $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA i $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ putrescyna.

Pożywki zestalono agarem ($6,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), pH pożywek doprowadzono do 5,8. Po 5 tygodniach, kiedy zaobserwowano liczne namnożenie, przeprowadzono kolejny pasaż, w którym zarówno eksplantaty wyjściowe jak i zastosowane pożywki były takie same jak w pasażu poprzednim.

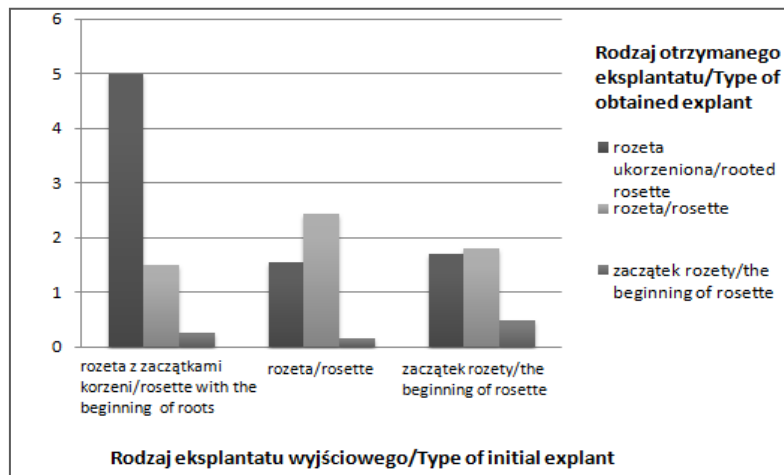
WYNIKI

Bardziej skuteczny okazał się pierwszy sposób odkażania chrzanu, czyli wstępne odkażanie korzeni poprzez moczenie ich w 0,5% roztworze chloraminy T, a następnie wyjaławianie pąków wierzchołkowych w 80% alkoholu etylowym przez 6 min. i 10% roztworze chloraminy T przez 15 minut. Z 15 merystemów wyłożonych na pożywkę MS z dodatkiem $0,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA i $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ putrescyny otrzymano regenerację różnych struktur (rys.1), które stanowiły materiał wyjściowy do kolejnego pasażu. Wyodrębnione kategorie eksplantatów: rozeta, zaczątek rozety, rozeta z zaczątkami korzeni wyłożono na pożywkę MS z dodatkiem $0,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA, $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA i $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ putrescyny. Na podstawie przeprowadzonych obserwacji stwierdzono, że na badanej pożywce najwięcej kompletnych roślin rozwinęło się z rozety z zaczątkami korzeni (rys. 2).



Rys. 1. Rodzaj i liczba struktur otrzymanych z 15 wyłożonych merystemów na pożywkę MS + $0,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA + $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ putrescyny

Fig. 1. Type and number of structures obtained from 15 meristems on medium MS supplemented with MS + $0,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA + $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ putrescin



Rys. 2. Rodzaj i liczba eksplantatów otrzymanych z różnych eksplantatów wyjściowych na pożywce MS z dodatkiem $0,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA, $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA i $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ putrescyny.

Fig. 2. Type and number of explants obtained from different initial explants on MS medium supplemented with $0,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA, $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA and $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ putrescine.

W kolejnym etapie, sprawdzono stopień namnożenia, wybranych w poprzednim doświadczeniu, eksplantatów wyjściowych na różnych pożywkach regeneracyjnych. Jako materiał wyjściowy została użyta rozeta, liść, fragment liścia. Najwięcej kompletnych roślin otrzymano na pożywce MS z dodatkiem $0,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA, $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA i $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ putrescyny. Korzystnym wynikiem w procesie mikrorozmnażania jest również uzyskanie dużego namnożenia w postaci zaczątków rozet. Materiał taki, w kolejnych pasażach, po przełożeniu na odpowiednią pożywkę, pozwala na uzyskanie większej liczby roślin w przeciwieństwie do przypadku, w którym otrzymujemy pojedynczą rozetę. Pożywkami, na których obserwowano taki rodzaj namnożenia są pożywki MS z dodatkiem 2iP w stężeniu 30 i $40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ w połączeniu z $0,01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA (tab. 1). Wykładając na badane pożywki liść i fragment liścia, jako eksplantaty wyjściowe, najintensywniejszy proces organogenezy zanotowano na pożywce MS z dodatkiem $0,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA, $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA i $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ putrescyny oraz na pożywce MS z dodatkiem tidiazuronu w stężeniu $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ w połączeniu z $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA. Najwięcej prawidłowo wykształconych roślin, a także pojedynczych nieukorzenionych rozet uzyskano na pożywce wzbogaconej putrescyną. Natomiast na pożywce z dodatkiem tidiazuronu otrzymano największą liczbę zaczątków rozet, niezależnie od

użytego eksplantatu wyjściowego (tab.2). Na pożywkach z 2iP, wyłożone liście i fragmenty liści obumarły.

Tabela 1. Regeneracja chrzanu uzyskana z rozet na różnych pożywkach
Table 1. Regeneration response of horseradish rosette on different media

Pożywka MS z dodatkiem 30 g·L ⁻¹ sacharozy Medium MS with 30 g·L ⁻¹ sucrose	Rodzaj i liczba otrzymanych eksplantatów na 1 probówkę; type and number of explants obtained on a test tube			
	Rozeta ukorzeniona; Rooted rosette	Rozeta; Rosette	Zaczątek rozety z zaczątkami korzeni; The beginning of the rosette with the beginning of roots	Zaczątek rozety; The beginning of rosette
1	0,2	7,1	1,0	13,0
2	0,0	6,0	2,1	1,7
3	0,0	8,5	5,1	6,8
4	0,33	7,7	1,77	8,1
5	0,3	5,8	1,6	22,0
6	0,2	7,1	1,0	13,0
7	1,3	0,0	0,0	0,0
8	2,6	2,9	0,4	3,7

Pożywka/medium 1 : 2 mg·L⁻¹ TDZ, 1 mg·L⁻¹ NAA

Pożywka/medium 2 : 5 mg·L⁻¹ TDZ, 1 mg·L⁻¹ NAA

Pożywka/medium 3 : 10 mg·L⁻¹ TDZ, mg·L⁻¹ 1 NAA

Pożywka/medium 4 : 20 mg·L⁻¹ 2iP, 0,01 mg·L⁻¹ IAA

Pożywka/medium 5 : 30 mg·L⁻¹ 2iP, 0,01 mg·L⁻¹ IAA

Pożywka/medium 6 : 40 mg·L⁻¹ 2iP, 0,01 mg·L⁻¹ IAA

Pożywka/medium 7 : 0,2 mg·L⁻¹ Kin, 1 mg·L⁻¹ IAA

Pożywka/medium 8 : 0,2 mg·L⁻¹ BA, 1 mg·L⁻¹ NAA, 0,5 mg·L⁻¹ putrescyny.

Tabela 2. Regeneracja chrzanu uzyskana z liści chrzanu na pożywkach zawierających różne cytokininy i auksyny

Table 2. Regeneration response of horseradish leaf explants on media supplemented with different cytokinins and auxins

Pożywka MS z dodatkiem 30 g·L ⁻¹ sacharozy Medium MS with 30 g·L ⁻¹ sucrose	Eksplantat wyjściowy; Initial explant	Rodzaj i liczba otrzymanych eksplantatów na 1 probówkę; Type and number of explants obtained on a test tube			
		Rozeta ukorzeniona; Rooted rosette	Rozeta; Rosette	Zaczątek rozety; The beginning of rosette	Rozeta zdeformowana; Deformed rosette
1	Cały liść; Entire leaf	0,0	0,5	1,0	2,0
2		0,0	0,8	5,0	3,0
3		0,0	0,3	1,7	1,3
4		0,5	1,0	0,5	0,5
5		1,5	4,2	0,8	0,0
1	Fragment liścia; Leaf fragment	0,0	0,5	0,75	1,0
2		0,0	1,5	4,2	1,2
3		0,0	1,5	2,0	1,0
4		0,2	0,7	1,0	1,6
5		2,6	3,0	1,0	0,0

Pożywka/medium 1 : 2 mg·L⁻¹ TDZ, 1 mg·L⁻¹ NAA

Pożywka/medium 2 : 5 mg·L⁻¹ TDZ, 1 mg·L⁻¹ NAA

Pożywka/medium 3 : 10 mg·L⁻¹ TDZ, 1 mg·L⁻¹ NAA

Pożywka/medium 4 : 0,2 mg·L⁻¹ Kin, 1 mg·L⁻¹ IAA

Pożywka/medium 5 : 0,2 mg·L⁻¹ BA, 1 mg·L⁻¹ NAA, 0,5 mg·L⁻¹ putrescyny

DYSKUSJA

Stymulowanie wzrostu tkanek do tworzenia korzeni i pędów zależy od względnej proporcji auksyn do cytokinin w pożywce hodowlanej (Liu et al. 2006). W naszych doświadczeniach na pożywce MS zawierającej 0,2 mg·L⁻¹ kinetyny i 1 mg·L⁻¹ IAA otrzymaliśmy z rozety w pełni ukształtowaną roślinę. Także w przypadku liści i ich fragmentów na tej pożywce powstawały kompletne rośliny, ale z mniejszą częstotliwością. Kompletne wykształcone rośliny z eksplantatu jaki stanowi pojedyncza rozeta otrzymano w większej ilości na pożywce dodatkiem 0,2 mg·L⁻¹ BA, 1 mg·L⁻¹ NAA i 0,5 mg·L⁻¹ putrescyny. Pożywka ta okazała się być również najlepszą w przypadku otrzymania prawidłowych rozet rozwiniętych z liści i fragmentów liści. Najintensywniejsze namnożenie rozet i

ich zączków, gdy eksplantatem wyjściowym była rozeta otrzymano na pożywce MS z dodatkiem 20 lub 30 mg·L⁻¹ 2iP i 1 mg·L⁻¹ NAA. W przypadku mikrorozmnażania *Tylophora indica* największą liczbę rozet z wykorzystaniem fragmentów pędu uzyskano na pożywce MS z dodatkiem 2,5 μM BA i 0,5 μM NAA (Faisal et al. 2007). Synergiczny efekt NAA w połączeniu z BA na zwiększenie multiplikacji pędów obserwowano również u gatunku *Rhodiola*, a także u innych gatunków roślin (Kantia et al. 2002, Dimitrov et al. 2003). Kombinacja dwóch hormonów 10-15 μM BA i 1-1,5 μM NAA okazała się również najlepsza dla regeneracji pędów w przypadku *Rhodiola rosea* (Yin et al. 2004). Także w naszych doświadczeniach stwierdziliśmy korzystny wpływ połączenia NAA i BA na organogenezę z liści lub ich fragmentów. W ciągu 6 tygodni z liścia lub jego fragmentu otrzymaliśmy w pełni ukształtowane rośliny, rozety i ich zączki. Podobnie Lin i in. (2006) obserwowali powstawanie prawidłowych rozet na eksplantatach liściowych *Rhodiola fastigiata* na pożywce MS z dodatkiem 13,32 μM BA i 0,5 μM NAA. Arakii i in. (1995) stosowali do pobudzenia organogenezy z liści chrzanu 2,4-D w połączeniu z BA. W naszych badaniach nad mikrorozmnażaniem warzyw unikano stosowania 2,4-D ze względu na jego właściwości mutagenne. Obiecujące wyniki, jeśli chodzi o wywołanie bezpośredniej organogenezy z liści i fragmentów liści, uzyskano również na pożywce z dodatkiem 5 mg·L⁻¹ tidiazuronu.

Literatura

- Araki H., Yuliadi E., Ogasawara T., Harada T., Yakuwa T. 1995. Plantlet regeneration by *in vitro* culture of leaf explants of horseradish (*Armoracia rusticana* L.). J. Japan. Soc. Hort. Sci. 64 (3): 563-569.
- Dimitrov B., Tasheva K., Zagorska N., Evstatieva L. 2003. *In vitro* cultivation of *Rhodiola rosea* L. Genet. Breed. 32: 3-6.
- Faisal M., Ahmad N., Anis. 2007. An efficient micropropagation system for *Tylophora indica*: an endangered, medicinally important plant. Plant Biotechnol. Rep. 1: 155-161.
- Kantia A., Kothari S.L. 2002. High efficiency adventitious shoot bud formation and plant regeneration from leaf explants of *Dianthus chinensis* L. Sci. Hortic. 96: 205-212.
- Liu H., Xu Y., Liu Y., Liu Ch. 2006. Plant regeneration from leaf explants of *Rhodiola fastigiata*. In vitro Cell. Dev. Biol. Plant 42: 345-347.
- Shehata A.M., Wannarat W., Skirvin R.M., Norton M.A. 2010. The dual role of carbenicillin in shoot regeneration and somatic embryogenesis of horseradish (*Armoracia rusticana*) *in vitro*. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 102: 397-402

Yin W.B., Li W., Du G.S., Huang Q.N. 2004. Studies on tissue culture of Tibetan *Rhodiola rosea*. Acta Bot. Boreal. Occident. Sin. 24: 1506-1510.

Agata Kapuścińska, Maria Burian, Urszula Kowalska, Waldemar Kiszczak,
Danuta Prochaska, Krystyna Górecka

INCREASING THE INTENSITY OF HORSERADISH (*Armoracia rusticana*) MICROPROPAGATION *IN VITRO*

Summary

The aim of this study was to investigate the ability of different explants for regeneration, as well as to investigate the effect of media composition on the efficiency of this process. Eight regeneration media and five categories of initial explants: rosette, the beginning of rosette, rosette with the beginnings of roots, leaf and leaf fragment were examined. Tested media were based on MS medium supplemented with 30 g·L⁻¹ sucrose, enriched with growth hormones-cytokinin and auxine: kinetin (0,2 mg·L⁻¹) and 2iP (20,30,40 mg·L⁻¹) in combination with IAA (0,01 mg·L⁻¹ and 1 mg·L⁻¹), thidiazuron (2,5,10 mg·L⁻¹) in combination with 1 mg·L⁻¹ NAA mg·L⁻¹, and BA (0,2 mg·L⁻¹), NAA (1 mg·L⁻¹), putrescin (0,5 mg·L⁻¹). Putting rosette as initial explants, the highest number of complete single plants were obtained on a medium supplemented with 0,2 mg·L⁻¹ BA, 1 mg·L⁻¹ NAA and 0.5 mg·L⁻¹ putrescin. While, the highest multiplication (in form of the beginnings of rosettes) from the same initial explant was obtained on medium supplemented with 2iP (20, 30 mg·L⁻¹) in combination with 0,01 mg·L⁻¹ IAA. The most intense process of organogenesis from leaves and fragments of leaves were recorded on MS medium supplemented with 0.2 mg·L⁻¹ BA, 1 mg·L⁻¹ NAA and 0.5 mg·L⁻¹ putrescin and also on medium with the addition of thidiazuron at concentration 5 mg·L⁻¹ in combination with 0.01 mg·L⁻¹ NAA. The most complete plants and single unrooted rosettes were obtained on medium with putrescin. However, the largest number of the beginning of rosettes was received on the medium supplemented with thidiazuron. Placing the leaves and their fragments on medium with 2iP resulted in death of explants.