ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN – POLONIA
VOL. XVI SECTIO EEE 2006

Zakład Anatomii i Cytologii Roślin UMCS w Lublinie[1]
Instytut Agrofizyki PAN im. B. Dobrzańskiego w Lublinie[2]

KRYSTYNA WINIARCZYK[1], ANETA CAŁKA[2]

Badania embriologiczne chrzanu (*Armoracia rusticana* Gaertn.)

Embryology of Horseradish (*Armoracia rusticana* Gaertn.)

Synopsis. Chrzan (*Armoracia rusticana*) rozmnaża się głównie wegetatywnie przez fragmenty korzeni. Pomimo że kwitnie, to nasiona uzyskuje się bardzo rzadko. W celu ustalenia barier uniemożliwiających rozmnażanie generatywne chrzanu, podjęto badania nad biologią kwitnienia i zapłodnienia. W czasie antezy chrzan tworzył przeważnie 1-jądrowe mikrospory. Nie obserwowano woreczków zalążkowych typowych dla *Brassicaceae* zbudowanych z siedmiu komórek (aparatu jajowego, komórki centralnej i trzech antypod). Woreczki zalążkowe były wypełnione licznymi ziarnami skrobi. Nieliczne 2-jądrowe ziarna pyłku mogły kiełkować w łagiewki pyłkowe i doprowadzać do zapłodnienia. Chrzan wiązał owoce (łuszczynki), ale były one głównie wypełnione zdegenerowanymi zalążkami. Ponadto zaobserwowano nieliczne, prawidłowo wykształcone zarodki, ale stopień kiełkowania uzyskanych nasion był bardzo niski.

Słowa kluczowe – key words: chrzan – horseradish, męski i żeński gametofit – male and female gametophyte, zarodek – embryo, nasienie – seed

WSTĘP

Chrzan (*Armoracia rusticana*) pochodzi z zachodniej Azji, ale zadomowiony jest w wielu rejonach świata. Uprawiany jest od ponad 2000 lat, głównie ze względu na swoje właściwości lecznicze oraz cenne walory smakowe. Charakterystyczny smak i zapach chrzan zawdzięcza obecności glikozydu siarkocyjanowego, który jest głównym składnikiem olejku gorczycowego. Korzenie chrzanu zawierają znaczne ilości witaminy C (77 mg%), białka (3,5%), a także witamin z grupy B, prowitaminę A, oraz mikroelementy. Dzięki jego silnym właściwo-

ściom bakteriobójczym, chrzan stosowany jest głównie w przetwórstwie jako środek konserwujący.

Ponieważ chrzan odgrywa ważną rolę w życiu człowieka, prowadzi się wiele badań na tej roślinie. Niemniej jednak znaczna ich większość skupiona jest przede wszystkim na analizach biochemicznych, związanych głównie z właściwościami i działaniem peroksydaz, które wchodzą w skład układów enzymatycznych biorących udział w neutralizowaniu reaktywnych form tlenu (Dąbrowska, 2000). Nieliczne są natomiast prace dotyczące biologii kwitnienia i generatywnego rozmnażania tej rośliny. Chrzan opisywany jest jako gatunek rozmnażany głównie wegetatywnie, a w naszych warunkach, mimo obfitego kwitnienia, nie wydaje nasion i rozmnażany jest wyłącznie wegetatywnie.

Stokes (1955) podjął próby uzyskania nasion na roślinach rosnących w Wisconsin (USA). Po przeprowadzeniu 10 tys. krzyżówek pomiędzy dwoma ekotypami uzyskał tylko 12 żywotnych nasion. Wysnuto wnioski, że trudności w zawiązywaniu nasion u *A. rusticana* spowodowane były:

– aborcją zapłodnionych zarodków na skutek fizjologicznej niezgodności miedzy nimi a bielmem,

– zaburzeniami w rozwoju endospermu,

– obumieraniem nasion w wyniku niezgodności postzygotycznej.

Ponadto autor zwraca uwagę, że wegetatywne rozmnażanie roślin przez dłuższy czas może powodować słabsze kwitnienie i wytwarzanie bezpłodnego pyłku, a tworzące się nasiona są słabej jakości. Linie klonalne roślin chrzanu są bardzo podatne na zakażenia przez patogeny, szczególnie na infekcje wirusowe. Liczni hodowcy zwracają uwagę, że niektóre plantacje chrzanu są prawie w 100% zakażone przez wirusy. Ponadto chrzan ulega chorobom wywoływanym przez grzyby (np.: *Verticillum alboatrum*) oraz atakowany jest przez owady, (np.: bielik krzyżowych, gnatarz rzepakowiec (Orłowski 2000).

Rozmnażanie generatywne, tej rośliny byłoby bardzo cenne i wskazane ze względów hodowlanych, ponieważ taki sposób rozmnażania zapewnia dużą zmienność genetyczną. W wyniku doboru naturalnego następuje wzrost liczby genów korzystnych, a spadek liczby niekorzystnych. Dzięki temu populacja staje się lepiej przystosowana do określonych warunków środowiska (Tarkowski 1974).

W celu ustalenia barier uniemożliwiających rozmnażanie generatywne, przeprowadzono badania nad biologią kwitnienia i zapłodnienia chrzanu. Szczególną uwagę zwrócono na prześledzenie poszczególnych etapów rozwoju gametofitu męskiego i żeńskiego.

MARETIAŁ I METODA

Rośliny *Armoracia rusticana* użyte do badań pochodziły ze stanowisk naturalnych w Ogrodzie Botanicznym UMCS w Lublinie. Obserwacje cytologiczne prowadzono na materiale świeżym

oraz utrwalonym do obserwacji w mikroskopie świetlnym i elektronowym transmisyjnym. Preparaty parafinowe barwiono w reakcji PAS oraz zielenią trwałą i safraniną według rutynowych procedur. Do obserwacji w mikroskopie elektronowym transmisyjnym pączki kwiatowe o długości 1-2 mm utrwalono w mieszaninie 2,5% aldehydu glutarowego i 2,5% paraformaldehydu w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 6,9 przez 24 godz. w temperaturze pokojowej. Po dwukrotnym przepłukaniu buforem fosforanowym materiał przeniesiono do 2% roztworu czterotlenku osmu na 24 godz. w ciemności. Następnie odwodniono w szeregu alkoholowym i zatopiono w żywicy LR White, a polimeryzację bloczków przeprowadzono w temp 60^0C. Zatopione pączki kwiatowe krojono na preparaty ultracienkie, barwiono octanem uranylu i odczynnikiem Reynoldsa i obserwowano w mikroskopie elektronowym transmisyjnym Tesla BS 500.

WYNIKI

Kwiaty *Armoracia rusticana* są drobne, małe, białe, zebrane w kwiatostany typu grono. Okwiat jest zróżnicowany na działki kielicha i płatki korony, a pręcikowie składa się z sześciu czterosilnych pręcików. Słupek jest górny, siedzący, zbudowany z dwóch owocolistków.

Ponieważ proces mikrosporogenezy prowadzący do wytworzenia męskich komórek rozrodczych zachodzi w pylniku, dlatego dokładnie prześledzono budowę anatomiczną ściany pylnika, a następnie kolejne etapy podziału mejotycznego w tkance sporogennej. Na przekroju poprzecznym przez główkę pręcika widać komórki ściany pylnika i tkanki sporogennej. Tkanka ta składa się z komórek ściśle do siebie przylegających, posiadających duże jądra. Komórki sporogenne powiększają się i stają się komórkami macierzystymi mikrospor – mikrosporocytami (fot. 1).

Epiderma jest zewnętrzną warstwą ściany pylnika, pod nią znajduje się endotecjum, warstwy przejściowe a następnie tapetum. U chrzanu występuje tapetum sekrecyjne, które zachowuje budowę komórkową aż do wykształcenia ziaren pyłku. Komórki tej warstwy są jedno- lub dwujądrowe i posiadają gęstą cytoplazmę.

Mikrosporocyty wchodzą na drogę mejotyczną, na początku której izolują się od siebie ścianami kalozowymi (fot. 2, 3). Wszystkie etapy mejozy przebiegają w pylniku synchronicznie, a cytokineza jest równoczesna. Podziały mejotyczne komórki macierzystej pyłku prowadzą do powstania tetrady haploidalnych mikrospor, otoczonych wspólną ścianą kalozową. Zewnętrzna ściana jest grubsza niż ściany rozdzielające mikrospory wewnątrz tetrady (fot. 4). Stopniowo hydrolizują grube, kalozowe ściany tetrady mikrospor przy jednoczesnym tworzeniu nowej ściany komórkowej – sporodermy. Ostatecznie kalozowa ściana rozpuszcza się całkowicie, a mikrospory rozłączają się (fot. 5). Na preparatach oglądanych w mikroskopie elektronowym transmisyjnym w sporodermie

można wyróżnić dwie warstwy – wewnętrzną intynę i zewnętrzną egzynę. Powierzchnia egzyny zwykle ma strukturę skomplikowaną i urzeźbioną w sposób charakterystyczny dla danego gatunku (fot. 6). W czasie powstawania i formowania pyłku zachodzą zmiany w ścianie mikrosporangium. Komórki warstwy pośredniej ulęgają stopniowemu zgniataniu, aż w końcu całkowicie zanikają. W większości pylników ściany komórek tapetum ulegają hydrolizie, a ich zawartość zostaje wykorzystana przez rozwijające się ziarna pyłku (fot. 7). Jednak w niektórych pylnikach obserwuje się duże ilości nie wykorzystanego tapetum. W loculus takich pylników znajduje się dużo martwych ziaren pyłku. Na preparatach barwionych safraniną i zielenią trwałą martwe ziarna pyłku barwią się na czarno (fot. 8). W niektórych ziarnach pyłku obserwuje się objawy degeneracji, wnętrze wypełnia duża wakuola, często pozbawiona tonoplastu, jądro położone jest peryferycznie, a w cytoplazmie jest mało organelli (fot. 9). W pylnikach pobranych z kwiatów w pełni kwitnienia znajdują się jednojądrowe mikrospory. Tylko w nielicznych mikrosporach dochodzi do mitotycznego podziału jądra, w wyniku którego tworzą się dwujądrowe ziarna pyłku, stanowią one jedynie 10%. Następnym etapem badań było prześledzenie procesów poprzedzających powstanie żeńskich komórek rozrodczych. Charakterystyczne jest znaczne opóźnienie rozwoju gametofitów żeńskich w stosunku do męskich. Zjawisko to znane jest jako przedprątność (protandria) i jest jednym z mechanizmów zabezpieczających przed samozapyleniem. Podczas gdy w zalążni na łożysku rozwijają się dopiero primordia zalążków, wokół słupka widoczne są pylniki wypełnione dojrzałym pyłkiem (fot. 10). W miarę ontogenetycznego rozwoju zalążka powstają osłonki i ośrodek, w którym różnicuje się komórka archesporialna. Z niej na skutek kolejnych podziałów mejotycznych rozwija się woreczek zalążkowy. W przypadku *A. rusticana* bardzo często obserwuje się występowanie mnogich woreczków zalążkowych. Przebadano 200 zalążków chrzanu i w żadnym z nich nie zaobserwowano aparatu jajowego, co prawdopodobnie było spowodowane dużym nagromadzeniem materiałów zapasowych. Obecność licznych, nierozpuszczalnych polisacharydów barwiących się w reakcji PAS na czerwono, uniemożliwiało identyfikację prawidłowo wykształconych woreczków zalążkowych z aparatem jajowym i komórką centralną (fot. 11).

Kolejnym etapem prowadzonych obserwacji było sprawdzenie stopnia zapylenia znamion słupków. Po przebadaniu 30 słupków stwierdzono, że w pełni kwitnienia na znamionach *A. rusticana* gromadzi się wyjątkowo mało pyłku. Zdeponowany pyłek osadza się nierównomiernie, tworząc skupiska. Następnie sprawdzono *in vivo* kiełkowanie ziaren pyłku na znamionach i stwierdzono, że w momencie antezy w szyjce słupka widoczne są pojedyncze łagiewki pyłkowe, które docierają do zalążni po około 20 godzinach od zapylenia, kiedy okwiat jest

już zwiędnięty. Nie zaobserwowano żadnego zalążka, przez którego mikropyle wrasta łagiewka pyłkowa. Nie mniej jednak, pod koniec okresu kwitnienia obserwowano tworzące się sporadycznie owoce w formie łuszczynek (fot. 12), wewnątrz których rozwijają się nasiona a w nich zarodki (fot. 13) posiadające dobrze wykształcone liścienie, hipokotyl i korzeń (fot. 14). Tylko niektóre łuszczynki są dobrze wykształcone i nie obkurczone. Większość wykształconych owoców chrzanu z czasem zasycha a wewnątrz znajdują się zdegenerowane zalążki (fot. 15).

Aby sprawdzić zdolność kiełkowania nasion, wiosną następnego roku wyłożono zebrane nasiona w wilgotnych komorach. Ze wszystkich zebranych nasion (150) skiełkowało jedynie 3%.

DYSKUSJA

Armoracia rusticana wyjątkowo rzadko zawiązuje nasiona i dlatego określana jest często jako roślina męskosterylna (Kaul 1988). Badania anatomiczne pylników wykazały, że ściana pylnika chrzanu jest typowa dla innych przedstawicieli *Brassicaceae*, a wszystkie warstwy są prawidłowo wykształcone. Nie ma żadnych utrudnień w otwieraniu pylnika i uwalnianiu pyłku w czasie kwitnienia. Rośliny chrzanu kwitną obficie, w groniastym kwiatostanie są liczne, prawidłowo wykształcone, drobne kwiatki. Obserwacje mikroskopowe nie wykazały żadnych zaburzeń w przebiegu mejozy w procesie mikrosporogenezy.

Analiza zmian zachodzących w tapetum *A. rusticana* wykazuje, że w niektórych pylnikach komórki tapetum bardzo długo nie ulegają rozpadowi. Gdy w workach pyłkowych znajdują się już dojrzale mikrospory, wewnątrz loculus znajdują się nie zdegenerowane komórki tapetum, z widocznymi ścianami. Badania prowadzone na dojrzewających pylnikach wskazują na działanie różnorodnego systemu proteolitycznego, odpowiedzialnego za naturalną degradację tapetum. Uważa się, że zarówno opóźnienie, jak i przyspieszenie rozpadu tapetum w stosunku do normy rozwojowej danego gatunku może powodować męską sterylność (Wang i wsp., 2001). U niektórych męskosterylnych form *Brassica campestris* dochodzi do wcześniejszej dezintegracji tapetum, co może być bezpośrednią przyczyną zaburzeń w przebiegu mejozy w tkance sporogennej (Owen i Makaroff, 1995, Zuberi i wsp. 1988). Przedwczesna degeneracja tapetum prowadziła do niedożywienia rozwijających się mikrospor, a w końcu do aborcji pyłku u wielu gatunków, np.: *Aloe vera* (Keijzer i Cresti 1987), *Capsicum annum* (Nowak i Betlach 1970), *Phaseolus vulgaris* (Suzuki i wsp. 2001).

Dominującym stadium obserwowanym w pękających pylnikach są mikrospory, w 90% jednojądrowe. Tylko 10% stanowią mikrospory posiadające dwa

jądra komórkowe, podczas gdy typowe dla *Brassicaceae* jest występowanie dwu- i trójjądrowych ziaren pyłku (Zhang i wsp., 2002). Nie zaobserwowano mikrospor o cytoplazmie zróżnicowanej na komórkę generatywną i wegetatywną, co powoduje, że w dojrzałych pylnikach brak prawidłowo wykształconego gametofitu męskiego. W badaniach Stocksa było około 60% funkcjonalnego pyłku. Za główną przyczynę zamierania pyłku autor uważał zaburzenia w przebiegu mejozy. Natomiast analiza stopnia wiązania nasion w liniach klonalnych ze stanu Wisconsin w USA wykazała, że zapłodnienie miało miejsce u 1/3 badanych zalążków.

Z obserwacji prowadzonych w mikroskopie świetlnym, będących przedmiotem badań niniejszej pracy, wynika, że u *A. rusticana* rozwój woreczka zalążkowego przebiega odmiennie niż u pozostałych przedstawicieli *Brassicaceae*. Nie zaobserwowano prawidłowo wykształconego aparatu jajowego, a cały woreczek wypełniony był licznymi ziarnami skrobi. Skrobia była głównie zgromadzona na biegunie mikropylarnym woreczka zalążkowego oraz wokół jądra komórki centralnej. Niektóre woreczki były całkowicie wypełnione skrobią, natomiast znacznie mniej skrobi gromadziło się w osłonkach i komórkach ośrodka. Ponadto, na wielu preparatach zaobserwowano występowanie kilku woreczków zalążkowych, ale tylko w jednym z nich była gromadzona skrobia. Obecność skrobi w żeńskim gametoficie nie była do tej pory opisywana u przedstawicieli *Brassicaeae* i nie wiadomo, jaką rolę może ona spełniać.

Nieliczne łagiewki rosnące w szyjce słupka *A. rusticana* wskazują na bardzo małą ilość funkcjonalnych ziaren pyłku, zdolnego do przeniesienia komórek plemnikowych do woreczka zalążkowego. Z roślin rosnących w naturalnych stanowiskach zebrano 150 nasion. Następnego roku wysiano te nasiona w komorach wilgotnościowych do skiełkowania. Skiełkowało jedynie 3% nasion, pozostałe były obkurczone i martwe.

W literaturze naukowej brak badań embriologicznych *A. rusticana.* Prezentowane wyniki pozawalają wysnuć pewne wnioski na temat możliwości generatywnego rozmnażania chrzanu.

WNIOSKI

Zjawiska które mogą znacznie utrudniać, a nawet uniemożliwiać generatywne rozmnażanie *Armoracia rusticana*:

1. W czasie antezy brak dojrzałego, funkcjonalnego gametofitu męskiego, najczęściej występują 1-jądrowe mikrospory natomiast w zalążkach znajdują się mnogie woreczki zalążkowe, wypełnione licznymi ziarnami skrobi.

2. Bardzo słabe jest opylenie znamion, a jedynie nieliczne ziarna pyłku kiełkują w łagiewki pyłkowe.

3. Większość zawiązanych owoców jest wypełniona zdegenerowanymi zalążkami. W nielicznych rozwijają się prawidłowo wykształcone zarodki, które często ulegają aborcji na skutek niezgodności postzygotycznej.

4. Uzyskane nasiona chrzanu kiełkują bardzo słabo.

PIŚMIENNICTWO

Dąbrowska B., 2000. Polowa uprawa warzyw. Red. Orłowski, rozdz. Chrzan. Brasika, Szczecin.

Kaul M. L. H., 1988. Male sterility in higher plants. Springer Verlag. Berlin.

Keijzer R. B., Cresti M., 1987. A comparison of anther tissue development in male sterile *Aloe vera* and male fertile *Aloe ciliaris* . Ann. Bot. 59:533-542.

Novak T., Betlach J., 1970. Development and karyology of the tapetal layer and anther in sweet pepper (*Capsicum annum* L.) Biol. Plant 12:275-280.

Owen H. A., Makaroff C. A. 1995. Ultrastructure of microsporogenesis in *Arabidopsis thaliana*. Ecotype Wassilewskija *(Brassicaceae*). Protoplasma 185: 7-21.

Skąpski H., Dąbrowska B., 1994. Uprawa warzyw w polu. SGGW, Warszawa

Stokes G. W., 1955. Seed development and failure in horseradish. J. Heredity, 46, 1: 15-21.

Suzuki K., Tsukaguchi T., Egawa Y., 2001. Ultrastructural study on degeneration of tapetum in anther of snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under heat stress. Sex. Plant Reperd. 13:293-299.

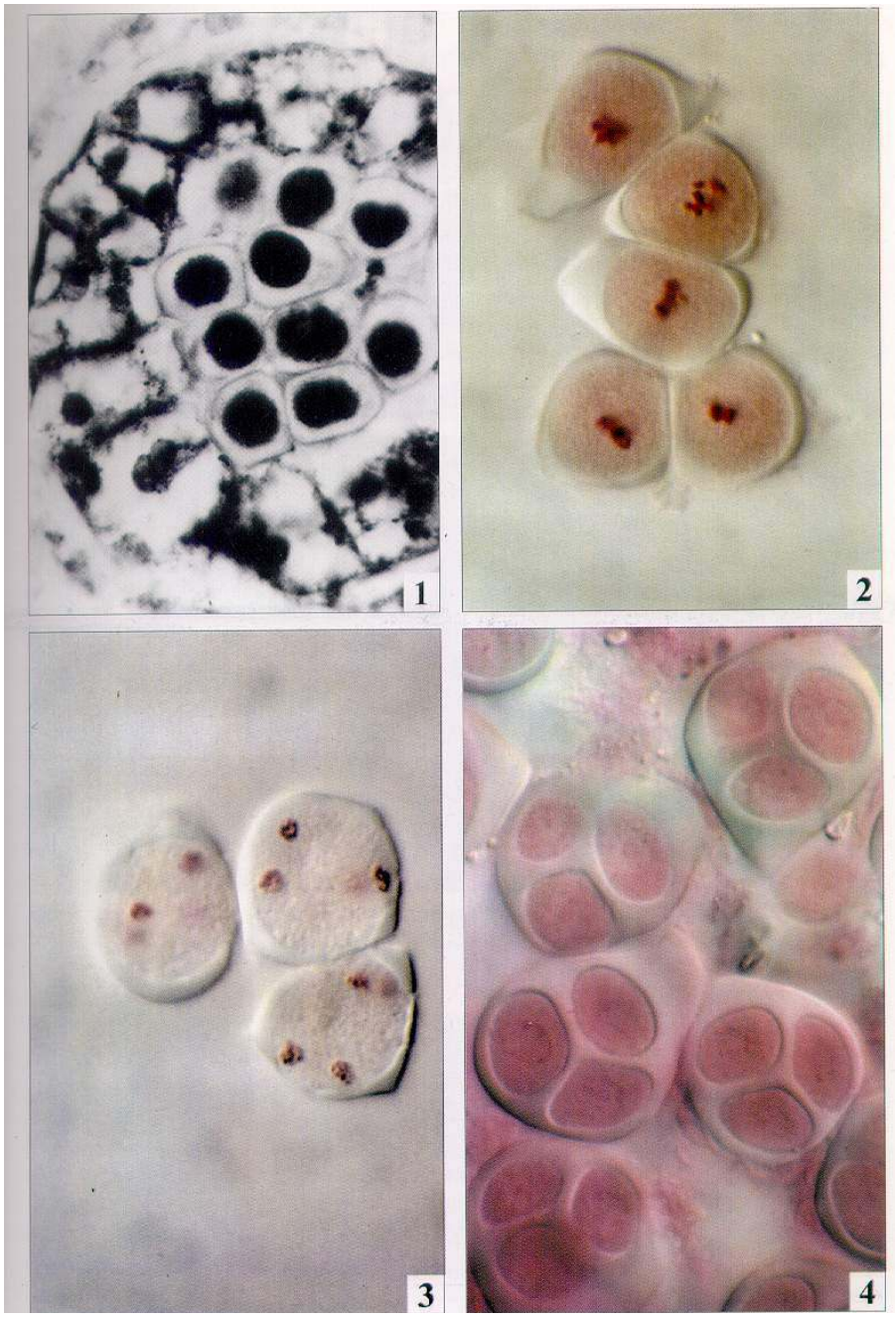
Wang M., Maraschin S. F., Berecki G., Bruin W., Duijn B., Korthout H. 2001. Cell suicide in plants by proteinase activity and PCD in developing anther of barley. Procceding of X International Conference on Plant Embryology Nitra (Słowacja). 121.

Zhang Ch., Guinel F. C., Moffat P. A., 2002. A comparative ultrastructural study of pollen developmnet in *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia and male-sterile mutant apt1-3. Protoplasma 219:59-71.

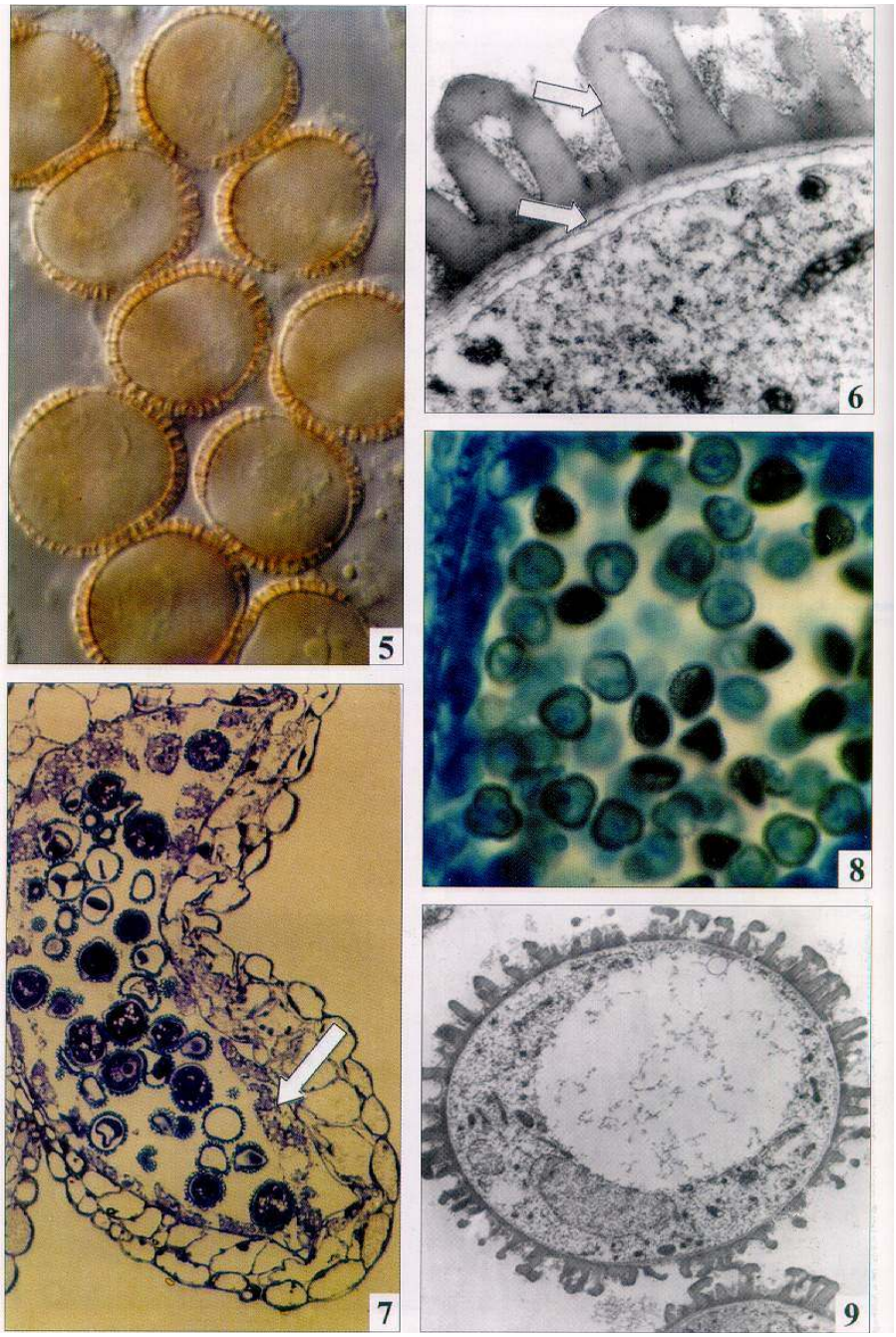
Zuberi S., Ahmad A., Zuberi M. I., 1988. Male sterility in rapseed *Brassica campestris* L. I Development of male fertile and genic male sterile anthers. Phytomorphology 38 (2,3): 219-221.

SUMMARY

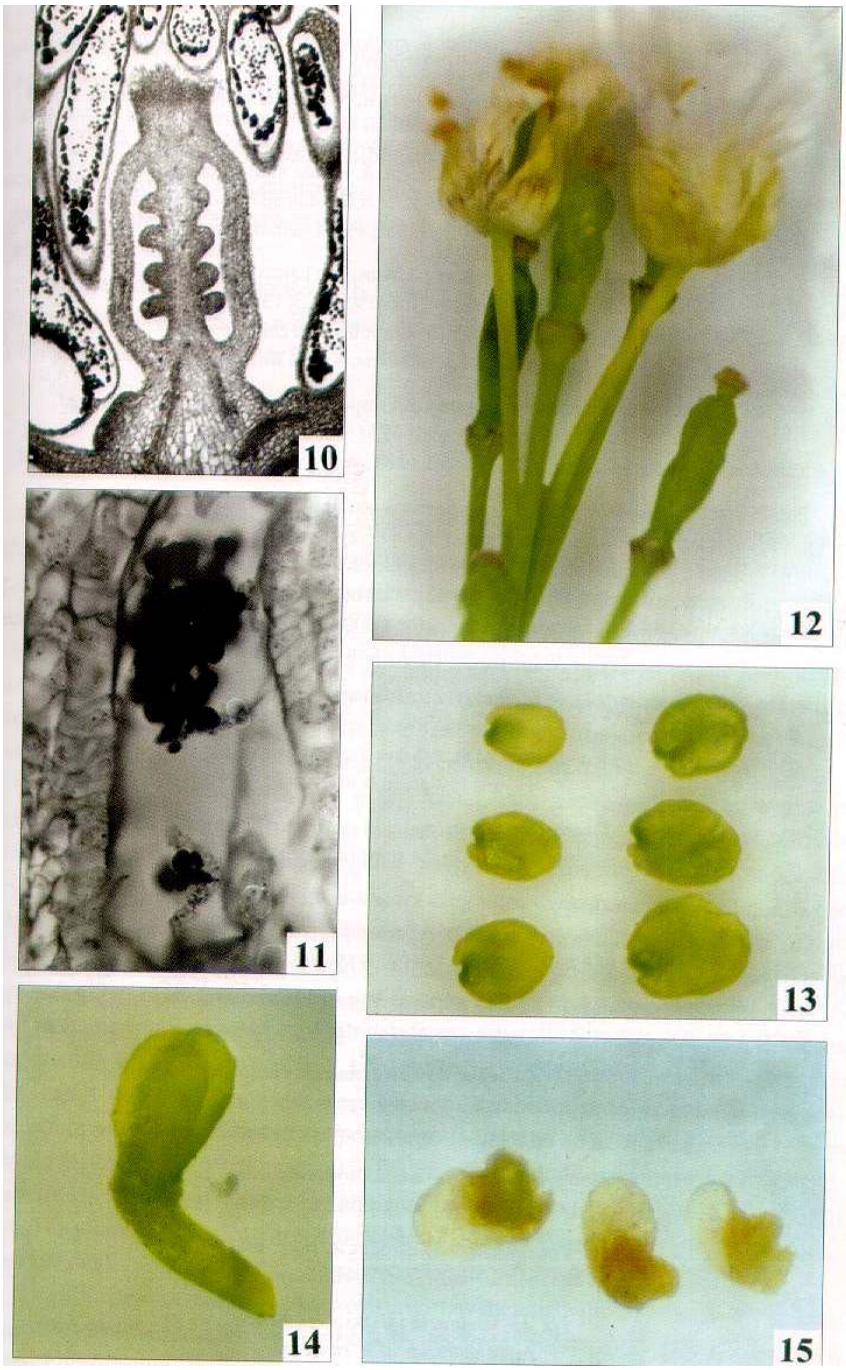
Horseradish (*Armoracia rusticana*) is propagated by root cuttings. And although it flowers, seeds are rarely formed. In order to determine barriers that make sexual reproduction impossible studies on the flowering and fertilization were under taken. During anthesis stage horseradish produced one-nucellus microspores. The mature embryo sac, typical of *Brassicaceae,* built of seven cells (egg apparatus, central cell and three-celled antipodes) was not observed. Embryo sacs were filled with a lot of starch grains. Very few double-cell pollen grains were able to germinate into pollen tube and achieve fertilization. Horseradish formed fruits but they were generally filled with degenerated ovules. Moreover, some properly formed embryos were noticed but the level of seedling was extremely low (3%).



Krystyna Winiarczyk, Aneta Całka



Krystyna Winiarczyk, Aneta Całka



Krystyna Winiarczyk, Aneta Całka

Fot. 1. Przekrój poprzeczny ściany pylnika A. *rusticana*, w loculus komórki macierzyste mikrospor. x 1100
Cross section of *A. rusticana* anther wall, with microspore mother cells in the loculus. x1100

Fot. 2-4. Mikrosporogeneza w KMM, preparaty barwione acetokarminem. x 2500
(fot. 2. I metafaza, fot. 3. II telofaza, fot. 4. tetrada mikrospor). x 2500
Microsporogenesis in microspore mother cells, stained by acetocarmine
(Fot. 2. I metaphase, Fot. 3. II telophase, Fot. 4. tetrad stage). x 2500

Fot. 5. Mikrospory uwolnione po hydrolizie kalozowych ścian.
Mikroskop świetlny Nomarskiego. x 1300
Microspores released after dissolution of the callosic walls.
Light microscope of Nomarsky x 1300

Fot. 6. Ultrastrukturalna budowa ściany mikrospory z widoczną warstwą egzyny i intyny (strzałki) TEM x 15000
Electron micrographs of microspore wall with two layers: exine and intine (arrows). x 15000

Fot. 7. Przekrój podłużny pylnika *A. rusticana* w stadium antezy; wewnątrz pylnika żywe i martwe mikrospory oraz resztki niewykorzystanego tapetum (strzałka).
Preparat półcienki barwiony błękitem toluidyny x 350
Longitudinal cross section through an anther of *A. rusticana* at anthesis stage;
there are alive and dead microspores and some unused tapetum inside the anther (arrow).
Semi-thin section stained by toluidine blue. x 350

Fot. 8. Fragment pylnika *A. rusticana* w stadium antezy. Preparat barwiony safraniną i zielenią trwałą. x 400
A fragment of *A. rusticana* anther of at anthesis stage. Cross section stained by safranin and fast green. x 400

Fot. 9. Degenerująca mikrospora *A. rusticana*. TEM x 5200
A. rusticana microspore in the stage of degeneration. x 5200

Fot. 10. Przekrój podłużny 4 mm pączka kwiatowego; preparat parafinowy barwiony w reakcji PAS. x 150
Longitudinal section of 4 mm flower bud; parafine section stained by PAS reaction. x 150

Fot. 11. Woreczek zalążkowy *A. rusticana* wypełniony licznymi ziarnami skrobi; reakcja PAS. x 750
Embryo sac of *A. rusticana* filled with a number of starch grains inside; PAS reaction. x 150

Fot. 12. Koniec okresu kwitnienia *A. rusticana*:
widoczne prawidłowo wykształcone owoce (łuszczynki)
The end of flowering period of *A. rusticana*, correctly developed fruits (finch)

Fot. 13. Prawidłowo wykształcone zalążki wypreparowane z kilku owoców
Properly developed ovules received from a few fruits

Fot. 14. Dojrzały zarodek *A. rusticana*
Mature embryo of *A. rusticana*

Fot. 15. Obumarłe zalążki *A. rusticana*
Aborted ovules of *A. rusticana*