



Indukcja organogenezy *in vitro* u ślazuca pensylwańskiego (*Sida hermaphrodita* Rusby)

Jerzy A. Przyborowski, Stefan Szczukowski, Józef Tworkowski,
Mariusz Stolarski

Katedra Hodowli Roślin i Nasiennictwa, Uniwersytet Warmińsko-
-Mazurski, Olsztyn

In vitro organogenesis induction in *Sida hermaphrodita* Rusby

Summary

Sida hermaphrodita Rusby belongs to the *Malvaceae* family. It is a perennial plant. Biomass obtained from sida plantations may constitute excellent raw material for renewable energy production. *Sida hermaphrodita* Rusby reproduces generatively, but its vegetative reproduction is also possible by root-cuttings, division of the underground part into particular roots, or cuttings obtained from green above-ground shoots. Sida seeds should be sown not earlier than after one year of storage, because immediately after harvest the percentage of germinated seeds is as low as 2%, after twelve months of storage 77.5%, to drop in successive months. Moreover, due to their hardness, sida seeds require special treatment. Therefore, an attempt was made at developing a method for *in vitro* micropropagation of sida plants, as an alternative method of seed material production. Two kinds of explants were used in the experiment, i.e. leaf discs 8 mm in diameter and 3 mm fragments of leaf stalks. The growth regulators were added to the MS medium in combinations, i.e.: IAA + kinetin; IAA + kinetin + BAP; TDZ + 2,4-D; 2ip + 2,4-D. The callus formed was crumbled and transferred to two kinds of medium: MS without growth regulators and MS with kinetin, NAA, GA₃ and 40 g l⁻¹ of sucrose. The most intensive growth of callus was observed on media containing 2ip and 2,4-D, but the highest number of roots and developing shoots was obtained on MS medium without fitohormones.

Adres do korespondencji

Jerzy A. Przyborowski,
Katedra Hodowli Roślin
i Nasiennictwa,
Plac Łódzki 3,
10-724 Olsztyn;
e-mail:
jerzy.przyborowski@uwm.
edu.pl

Key words:

leaf explants, organogenesis, plant growth regulators, *Sida hermaphrodita*.

1. Wprowadzenie

Ślazowiec pensylwański (*Sida hermaphrodita* Rusby) występujący również pod nazwą malwa wirgińska lub sida, należy do rodziny ślazowatych (*Malvaceae*) i jest rośliną wieloletnią, polikarpiczną, o corocznie zamierających pędach. Dzięki zakładaniu pąków przybyszowych na korzeniach u nasady łodygi, roślina odrasta i zwiększa liczbę łodyg. W 3-5 roku wegetacji tworzy przeciętnie 12-15 zielonych łodyg i kilkadziesiąt liści. Łodygi są dobrze ulistnione, o średnicy od 5 do 30 mm. Pod koniec okresu wegetacyjnego roślina osiąga do 360 cm wysokości. Podstawowym sposobem użytkowania sidy jest pozyskiwanie włókna, które zastępuje jutę lub przeznaczone jest na wyroby powroźnicze, tkaniny opatrunkowe, papier. Stosunkowo duża zawartość związków białkowych, tłuszczu i witamin w świeżej masie oraz bardzo wysoka wydajność, dochodząca do 80-120 t z ha, daje możliwość użytkowania tej rośliny na cele pastewne. Kolejną zaletą tej rośliny jest porównywalna z sosną i świerkiem zawartość celulozy, wosków i żywic w łodygach, co daje możliwość wykorzystania sidy w przemyśle celulozowo-papierniczym. Opisane cechy pozwalają na stwierdzenie, że biomasa pozyskiwana z plantacji ślazowca może być też doskonałym surowcem do produkcji energii odnawialnej. Ślazowiec rozmnaża się generatywnie, ale możliwe jest również rozmnażanie wegetatywne przez sadzonki z odcinków korzeni, przez dzielenie systemu korzeniowego na poszczególne korzenie lub przez sadzonki zielne otrzymywane z zielonych pędów nadziemnych. Plantacje mogą być zakładane poprzez wysiew otoczkowanych nasion lub pikowanie sadzonek (1). Nasiona powinny się wysiewać najwcześniej po roku przechowywania, ponieważ odsetek skielkowanych nasion bezpośrednio po zbiorze wynosi zaledwie 2%, po 12 miesiącach przechowywania 77,5%, a po kolejnych miesiącach ponownie spada (2). Ze względu na twardość okrywy, nasiona wymagają ponadto specjalnych zabiegów stratyfikacyjnych. Wzrastające zainteresowanie uprawą sidy, a jednocześnie brak odmian uprawnych i trudności z masową reprodukcją, zdecydowały o konieczności podjęcia metody mikorozmnażania *in vitro* roślin ślazowca i uzyskiwania tą drogą sadzonek. W literaturze brakuje doniesień na temat kultury *in vitro* ślazowca pensylwańskiego. Podjęte badania stanowią zatem pierwszą próbę uzyskania roślin ślazowca pensylwańskiego na drodze organogenezy *in vitro*.

2. Materiał i metodyka

Doświadczenie obejmowało dwa czynniki: kombinacje regulatorów wzrostu (pożywka) i rodzaj eksplantatu. Materiałem roślinnym był klon *Sida hermaphrodita* Rusby otrzymany w wyniku kultury *in vitro* wierzchołka wzrostu jednej rośliny. Eksplantaty pobierano ze sterylnych roślin i były nimi krążki liściowe o średnicy 5 mm oraz fragmenty ogonków liściowych o długości 2 mm. Zastosowano sześć kombinacji regulatorów wzrostu (tab. 1) dodawanych dożywki MS (3) zawierającej ponad-

to 20 g l⁻¹ sacharozy, zestalonej agarem (8 g l⁻¹) i o pH 5,6-5,9. Pożywkę autoklawowano w 121°C przez 20 minut. Na każdą kombinację regulatorów wzrostu wykładano po 2-3 krążki liściowe oraz 5-13 fragmentów ogonków liściowych, w trzech powtórzeniach.

Tabela 1

Rodzaj i koncentracja regulatorów wzrostu (w mg l⁻¹) stosowanych w indukowaniu organogenezy u *Sida hermaphrodita* Rusby

Pożywka	IAA	TDZ	2,4-D	2ip	Kinetyna	BAP
I	0,5	–	–	–	10,0	–
II	0,5	–	–	–	10,0	0,1
III	0,5	–	–	–	5,0	3,0
IV	–	0,5	0,02	–	–	–
V	–	–	0,8	0,6	–	–
VI	–	–	0,8	0,4	–	–

Kulturę prowadzono w temperaturze 23 ± 1°C przez trzy tygodnie w ciemności i tygodnie na świetle, w cyklu dobowym 16 h światła i 8 h ciemności. Po czterech tygodniach oceniono intensywność przyrostu tkanki kalusowej w skali 1-5 (1 – kalus bardzo słaby, 5 – kalus bardzo obfity). Kalus po oddzieleniu od pierwotnego eksplantatu przeniesiono na dwa rodzaje pożywki: R1 i R2 na bazie pożywki MS. Pożywka R1 zawierała 40 g l⁻¹ sacharozy oraz następujące regulatory wzrostu: kinetyna – 0,5 mg l⁻¹, NAA – 0,5 mg l⁻¹, GA₃ – 0,5 mg l⁻¹. Pożywka R2 zawierała 30 g l⁻¹ sacharozy i nie zawierała regulatorów wzrostu. Obie zestalono agarem w ilości 8 g l⁻¹ i autoklawowano w 121°C przez 20 minut.

Kulturę kalusa prowadzono przez kolejnych 5 tygodni na świetle (16 h światła i 8 h ciemności) w temperaturze 23 ± 1°C.

3. Wyniki i dyskusja

Wśród licznych prac dotyczących organogenezy *in vitro* u różnych gatunków roślin dwuliściennych, nie ma jak dotąd, prac dotyczących indukcji tego procesu u *Sida hermaphrodita* Rusby. U innych gatunków do indukcji organogenezy używano różnych kombinacji auksyn i cytokinin (4-6) bądź tylko cytokinin (7-10). Większość badaczy stosuje pożywkę stymulującą rozwój kalusa, a następnie drugą, do indukcji organogenezy. Pożywki indukcyjne zawierają najczęściej cytokiny, takie jak BAP, 2ip, kinetyna, zeatyna czy TDZ (5). Reakcja komórek eksplantatu na zastosowane czynniki wzrostowe (auksyny i cytokiny) i w rezultacie na intensywność powsta-

wania tkanki kalusowej jest na ogół bardzo zróżnicowana. W sposób zróżnicowany reagowały również komórki eksplantatów sidy. W tabeli 2 zestawiono wyniki obserwacji po 4 tygodniach kultury na pożywkach indukcyjnych. Zarówno z krążków liściowych jak i fragmentów ogonków liściowych otrzymano kalus, różniący się intensywnością wzrostu, barwą i strukturą. Spośród eksplantatów bardziej efektywne okazały się krążki liściowe, z których tkanka kalusowa rozwijała się intensywniej niż z ogonków liściowych. Bardzo intensywne przyrosty kalusa zaobserwowano na pożywce zawierającej TDZ i 2,4-D (IV). Kalus ten był jednak bardzo kruchy i intensywnie zielony (fot. 1). Z pozostałych kombinacji najintensywniejsze przyrosty kalusa stwierdzono na pożywce V i VI (obie zawierające 2,4-D i 2ip). Miał on barwę żółtą lub jasnożółtą i strukturę gładką (fot. 2). Po przełożeniu na pożywkę R1 obserwowano rozwój korzeni z kalusa pochodzącego z wszystkich kombinacji pożywek indukcyjnych (fot. 4), z wyjątkiem pożywki zawierającej TDZ+2,4-D. W stosunkowo licznych pracach opisywano pozytywny wpływ TDZ na indukcję organogenezy u różnych roślin (5,7,10-12). Wydajność tego procesu była różna w zależności od gatunku rośliny i rodzaju eksplantatu. Jednak w przypadku sidy, po przeniesieniu zarówno na pożywkę R1, jak i R2, kalus intensywnie namnażał się, a przy tym stawał się bardziej kruchy z obfitym białym nalotem i nie regenerował.

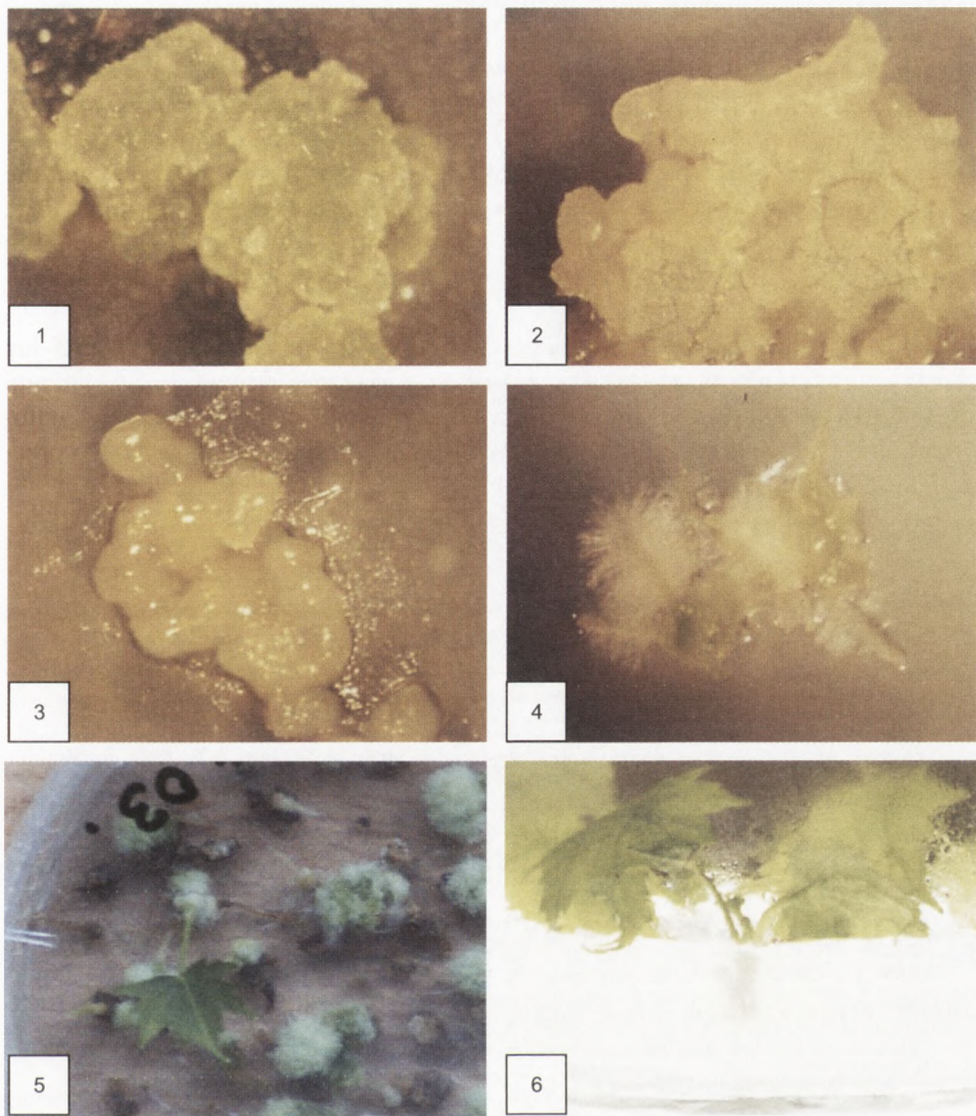
Tabela 2

Wyniki kultury *in vitro* eksplantatów *Sida hermaphrodita* Rusby w zależności od rodzaju i koncentracji regulatorów wzrostu

Eksplantat	Obserwacje	Pożywka*					
		I	II	III	IV	V	VI
krążki liściowe	liczba eksplantatów ogółem	4	7	10	9	9	9
	liczba eksplantatów z kalusem	4	7	10	9	9	9
	intensywność przyrostu kalusa**	2	1	2	5	3	5
	barwa i struktura kalusa	kremowy kruchy	kremowy kruchy	jasnozielony kruchy	zielony kruchy	żółty gładki	jasnożółty gładki
ogonki liściowe	liczba eksplantatów ogółem	14	25	23	22	36	32
	liczba eksplantatów z kalusem	8	10	13	17	31	30
	intensywność przyrostu kalusa**	2	1	1	3	1	2
	barwa i struktura kalusa	jasnozielony kruchy	zielony kruchy	zielonobrunatny kruchy	zielony kruchy	biały gładki	biały gładki

* rodzaj i koncentrację regulatorów wzrostu podano w tabeli 1.

** w skali 1-5.



Fot. 1. Kalus *Sida hermaphrodita* rozwijający się na pożywce IV (TDZ + 2,4-D).

Fot. 2. Kalus *Sida hermaphrodita* rozwijający się na pożywce VI (2,4-D + 2ip).

Fot. 3. Embriogeniczny kalus *Sida hermaphrodita* uzyskany na pożywce VI po przeniesieniu na pożywkę R1.

Fot. 4. Rizogenezis na pożywce R1 po przeniesieniu kalusa *Sida hermaphrodita* z pożywki VI.

Fot. 5. Pędy *Sida hermaphrodita* rozwijające się na pożywce R2 po przeniesieniu z pożywki VI.

Fot. 6. Rośliny *Sida hermaphrodita* w słoiku po przeniesieniu z pożywki R2.

Kalus z pożywek V i VI regenerował liczne korzenie. Obserwowano również struktury zarodkopodobne (fot. 3). Korzenie regenerujące z kalusa pochodzącego z pożywki I i II były mniej liczne, ale wyraźnie dłuższe. Zastosowana przez nas pożywka R1 zawierała cytokininę, auksynę i giberelinę oraz miała zwiększoną zawartość sacharozy. Skład ten powodował konwersję powstających z kalusa struktur embrioidalnych (fot. 3). Na pożywce R1 nie stwierdzono jednak regeneracji pędów.

Przeniesienie kalusa na pożywkę R2 (MS bez regulatorów wzrostu) zgodnie z oczekiwaniami stymulowało zaindukowaną na pierwszej pożywce morfogenezę. Świadczy o tym duża liczba regenerujących korzeni i nielicznych pędów (fot. 5 i 6) z kalusa pochodzącego z pożywki V i VI, a także mniej intensywna ryzogeneza kalusa powstałego na pożywkach I, II i III.

Kalus z fragmentów ogonków liściowych rozwijał się mniej intensywnie niż z krążków liściowych. W porównaniu z kalusem z krążków liściowych, z wyjątkiem pożywki IV, charakteryzował się inną barwą (pożywki I-III zielony i V-VI biały), natomiast pod względem struktury był taki sam jak kalus z krążków liściowych. Po przeniesieniu na pożywki R1 i R2 rzadziej obserwowano na nim organogenezę.

Literatura

1. Styk B., Styk W., (1994), Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio E, 49.
2. Borkowska H., Styk B., (1997), *Ślaziowiec pensylwański (Sida hermaphrodita Rusby) – uprawa i wykorzystanie*, Wyd. AR Lublin, 10-15.
3. Murashige T., Skoog F., (1962), *Physiol Plant.*, 15, 473-497.
4. Nawracała J., Konieczny G., Ulman S., (1997), *Zeszyty Nauk. AR Kraków*, 318, 50, 153-156.
5. Hazra S. K., Sudripta Das, Das A. K., (2002), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 70, 235-240.
6. Vanegas P. E., Cruz-Hernandez A., Valverde M. E., Paredes-Lopez O., (2002), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 69, 279-283.
7. Gabryszewska E., Marasek A., (1997), *Zeszyty Nauk. AR Kraków*, 318, 50, 177-182.
8. Kaneda Y., Tabei Y., Nishimura K., Akihama T., Kitamura, (1997), *Plant Cell Rep.*, 17, 8-12.
9. Yang J., Hu Z., Guo G. Q., Zheng G. C., (2001), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 66(1), 35-39.
10. Pelah D., Kaushik R. A., Mizrahi Y., Sitrit Y., (2002), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 71, 81-84.
11. Magioli C., Rocha A. P. M., de Oliviera D. E., Mansur E., (1998), *Plant Cell Rep.*, 17, 661-663.
12. Li W., Gao H-H., Lu R., Guo G-Q., Zheng G-Ch., (2002), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 71, 259-262.