

GRAŻYNA MAŃKOWSKA
ALEKSANDRA LUWAŃSKA
KAROLINA GRYGOROWICZ
KAROLINA WIELGUS

Zakład Biotechnologii, Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu

Inicjacja sterylnych kultur *in vitro* oraz mikropropagacji ślazuwca pensylwańskiego (*Sida hermaphrodita* R.)

Initiation of *in vitro* cultures and micropropagation of sida (*Sida hermaphrodita* R.)

Ślazuwec pensylwański (*Sida hermaphrodita* R.) może być rozmnażany generatywnie, jak również wegetatywnie przez sadzonki z odcinków korzeni, sadzonki zielne otrzymywane z pędów nadziemnych oraz przez podział podziemnej części na mniejsze fragmenty. Problem jednak stanowi niska zdolność kiełkowania nasion spowodowana twardością okrywy. Z tego powodu zdolność wschodów nawet w sprzyjających warunkach nie przekracza 30–40%. Niedoskonałość tradycyjnych metod rozmnażania ślazuwca, wysoka cena dobrych jakościowo nasion, a także wzrost zainteresowania uprawą ślazuwca na cele bioenergetyczne i przemysłowe były przyczyną podjęcia badań nad mikropropagacją tej rośliny w kulturach *in vitro*. Badania wykazały, że współczynnik rozmnażania dla eksplantatów bocznych jak i wierzchołkowych ma wyższą wartość, przy wykorzystaniu pożywki Murashige i Skoog (MS) zawierającą 30 g/l sacharozy oraz 0,01 mg/l BAP (regulator wzrostu) w porównaniu z tą samą pożywką o stężeniu 0,02 mg/l BAP i wynosił odpowiednio: 5,25 oraz 6,05. Zastosowanie powyższej pożywki zapewniło wysoki odsetek (97%) ukorzenionych, gotowych do aklimatyzacji eksplantatów.

Słowa kluczowe: kultury *in vitro*, mikropropagacja, *Sida hermaphrodita*, współczynnik rozmnażania

Sida (*Sida hermaphrodita* R.) can be propagated by both generative and vegetative methods by seedlings obtained from root sections, from above ground shoots and from underground part of the plant fragmented into smaller pieces. The problem in generative propagation is low germination rate of seeds caused by hard shell. This causes germination rate in favourable condition to reach only 30–40%. Imperfection of traditional propagation methods of sida, high price of good quality seeds and growing interest in cultivation of the crop for energy and industrial raw materials caused numerous attempts to propagate the plant by *in vitro* regeneration cultures. The studies on initiation of micro propagation showed that multiplication factor on MS medium, containing 30 g/l sucrose and 0.01 mg/l BAP was 6.05 for apical explants and for lateral explants 5.25 on the same medium. The MS medium provided a high ratio (97%) of rooted explants ready for acclimatization.

Key words: *in vitro* culture, micropropagation, multiplication factor, *Sida hermaphrodita*

WSTĘP

Ślázowiec pensylwański (*Sida hermaphrodita* R.) pochodzi z Ameryki Północnej i nazywany jest również malwą pensylwańską lub sidą. Do uprawy w Polsce został przywieziony ze Związku Radzieckiego. Jest to roślina wieloletnia, polikarpiczna, o corocznie zamierających pędach (Borkowska, Styk, 2003).

W Polsce, ze względu na warunki klimatyczne możliwość uprawy ślázowca określono na 15–20 lat. Obserwacje trwające blisko 50 lat nie wykazały, aby roślina wymarzała w czasie ostrych zim lub wysychała w czasie upalnych i suchych lat. Dzięki głębokiemu systemowi korzeniowemu odporna jest na okresowe susze (Borkowska, Styk, 2003).

Ślázowiec pensylwański posiada szeroką tolerancję w stosunku do gleby i klimatu. Może być uprawiany na wszystkich typach gleb, nawet na piaszczystych V klasy bonitacyjnej, pod warunkiem ich dostatecznego uwilgotnienia, a także na terenach zdegradowanych chemicznie, hałdach pokopalnianych, rekultywowanych wysypiskach komunalnych, gdzie pełni rolę fitoremediacyjną. Przedplon dla ślázowca stanowić mogą wszystkie rośliny uprawne, szczególnie korzystnym jest ziemniak uprawiany na oborniku (Borkowska, Styk, 1997).

Ślázowiec pensylwański może służyć do nasadzeń w pasach przydrożnych, chroniących tereny mieszkalne, pola uprawne czy ogrody przed zanieczyszczeniami komunikacyjnymi. Jako roślina kwitnąca aż do przymrozków jesiennych stanowi również dobry pokarm dla pszczół: jego wydajność miodowa oceniana jest na 110–143 kg/ha (Wróblewska, Kolasa, 1986). W ostatnim dziesięcioleciu ślázowiec pensylwański jako gatunek wieloletni, o dużym potencjale plonowania znalazł się w kręgu zainteresowania agroenergetyki. Na podstawie dotychczasowych badań można jednoznacznie stwierdzić, iż jego biomasa nadaje się do spalania w postaci zrębków oraz jako surowiec do produkcji brykietów i pelet.

Problemem dla szybkiego wzrostu powierzchni upraw ślázowca pensylwańskiego jest jakość materiału siewnego, wynikająca z niskiej siły kiełkowania nasion - duża liczba nasion twardych, wymagających stratyfikacji, a także ograniczona możliwość rozmnażania wegetatywnego roślin poprzez pędy i korzenie. Nasiona zbierane w warunkach Polski mają małą wartość siewną, w okresie zbioru kiełkują bardzo słabo (1–4%), po 1–2 latach zdolność kiełkowania osiąga maksimum na poziomie 45–70%, a potem maleje (Borkowska, 1988; Doliński i in., 2006).

Z powodu słabego kiełkowania świeżych nasion Borkowska i Styk (2006) zalecają na większych plantacjach wysiewanie nasion 1–2 letnich, a na małych stosowanie rozmnażania wegetatywnego. Opracowanie metody mikropropagacji tego gatunku pozwoliłoby na ominięcie tych barier i uzyskanie efektywnego sposobu namnażania ślázowca.

Celem badań była optymalizacja warunków hodowli *in vitro* oraz opracowanie metodyki mikropropagacji dla uzyskania możliwie wysokiego współczynnika rozmnażania i w konsekwencji możliwości produkcji jak największej liczby sadzonek. Namnażanie roślin tym sposobem przyniosłoby jednocześnie obniżenie kosztów i

skrócenie czasu produkcji, a także zapewniłoby jednolitość materiału roślinnego i standaryzację jakościową produkowanych surowców.

MATERIAŁ I METODY

Inicjacja kultur *in vitro* ślazuwca

W celu uzyskania czystych siewek ślazuwca pensylwańskiego nasiona odkażono i przeniesiono na pożywkę Murashige i Skoog (MS) zawierającą 0,04 mg/l kinetyny oraz 1 mg/l kwasu giberelinowego. Zastosowane regulatory wzrostu miały na celu przerwanie stanu spoczynku nasion oraz zainicjowanie procesu kiełkowania. Skala doświadczenia obejmowała 300 nasion, umieszczonych po 5 sztuk w naczyniach hodowlanych. Wyszczepianie nasion przeprowadzone było przy maksymalnym zachowaniu warunków sterylności. Hodowla odbywała się w fitotronie, w temperaturze 24°C przy braku dostępu światła.

Prowadzenie hodowli

Po 7 dniach od wyszczepienia kiełkujące nasiona wystawiono na działanie światła w celu dalszego rozwoju siewek. Po 21 dniach od momentu wyszczepienia nasion ze zdrowych, jakościowo siewek wybranych na podstawie obserwacji wyizolowano eksplantaty wierzchołkowe i boczne. Umieszczono je w naczyniach hodowlanych, na pożywkach o różnych stężeniach i rodzajach cytokinin (tab. 1).

Dokonywano obserwacji rozwoju eksplantatów po upływie 7, 14 oraz 21 dniach. Ocenie podlegała liczba wytwarzanych pąków, obecność i wielkość kalusa, ogólna kondycja eksplantatu, występowanie zakażeń mikrobiologicznych.

Pasaż

Doświadczenie na etapie namnażania obejmowało 3 pasaże. Pierwszy pasaż miał miejsce po 28 dniach prowadzenia hodowli, drugi po 28 dniach od pasażu pierwszego, trzeci natomiast po 28 dniach od drugiego. Pomiędzy pasażami dokonywano 3 obserwacji kontrolujących jakość eksplantatów oraz obliczono współczynnik rozmnażania dla poszczególnych regulatorów wzrostu. Podczas każdego z pasaży dzielono uzyskane wieloroślinki na pojedyncze pędy boczne i wierzchołkowe, które umieszczano na pożywce o identycznym składzie jak pierwotnie zastosowane.

Ukorzenie i aklimatyzacja

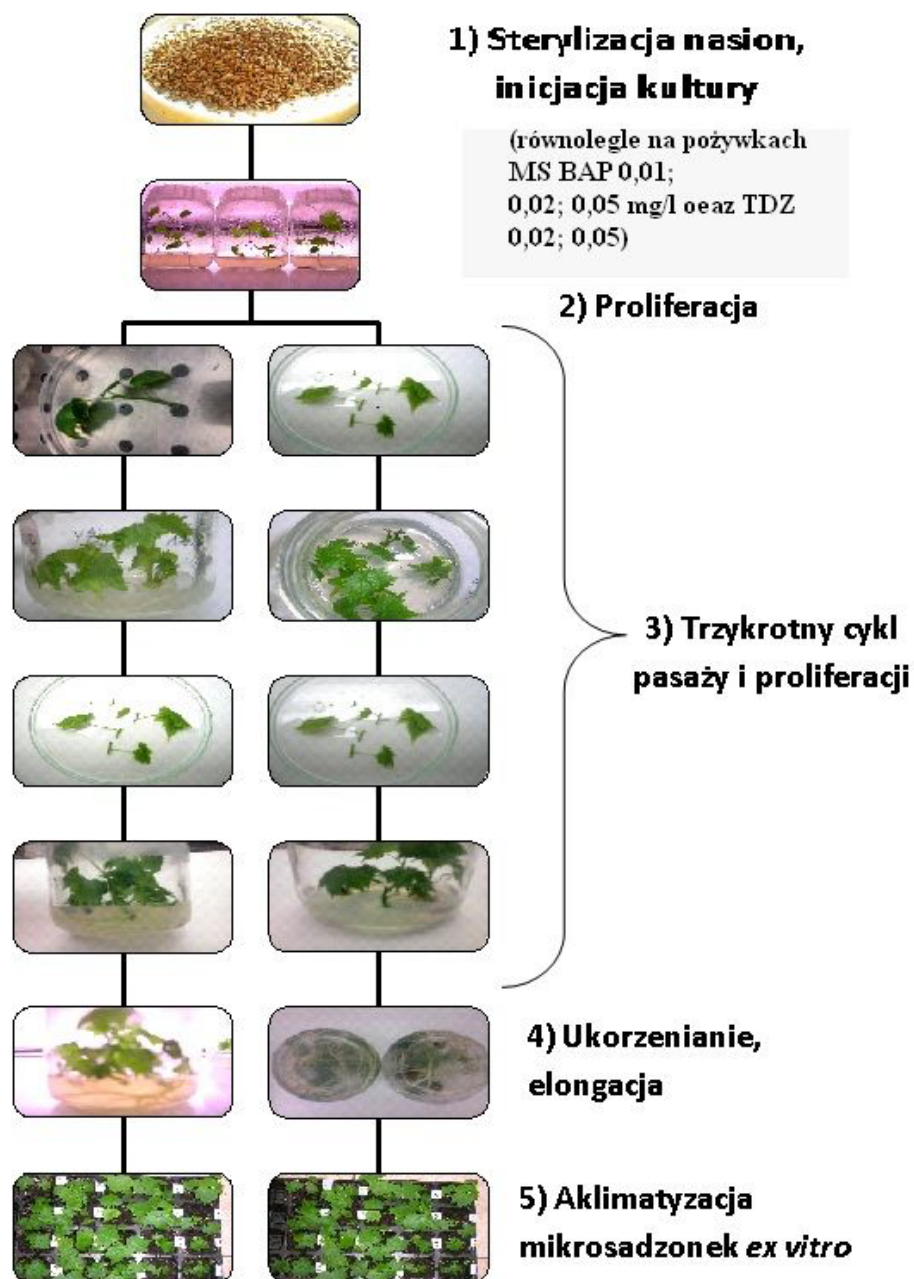
W trakcie hodowli eksplantatów na pożywkach zawierających cytokininy zaobserwowano rozwój korzeni. Z tego powodu zrezygnowano z zastosowania odrębnej pożywki w celu ukorzenia roślin. Rozwój korzeni sprawdzano podczas 3 obserwacji.

Z uzyskanych mikrosadzonek wybrano po 20 sztuk i przenoszono do autoklawowanej ziemi w celu aklimatyzacji. Przeprowadzono dwie obserwacje w 14 dniowych odstępach czasu, mających na celu ocenę jakości roślin *ex vitro*.

Warunki prowadzenia hodowli

Kultury *in vitro* ślazuwca prowadzono w fitotronie. Temperatura w pomieszczeniu wynosiła od 24 do 26°C, wilgotność powietrza w naczyniach hodowlanych kształtowała się na poziomie 70%, a natężenie światła oscylowało wokół 40–60 $\mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$. Pozwalało to

na prowadzenie powtarzalnych doświadczeń w maksymalnie optymalnych warunkach dla rozwoju eksplantatów. Schemat doświadczenia obrazuje rysunek 1.



Rys. 1. Schemat doświadczenia mikropropagacji ślazuca
Fig. 1. Scheme of *Sida* micropropagation

WYNIKI I DYSKUSJA

W ramach pracy prowadzono doświadczenia nad inicjacją kultur *Sida hermaphrodita* R. oraz nad opracowaniem efektywnej metody mikropropagacji tego gatunku. Dążono przy tym do osiągnięcia wysokiego współczynnika rozmnażania. W tym celu zastosowano pożywkę MS, w której modyfikowano rodzaj regulatorów wzrostu oraz ich stężenie.

Tabela 1

Rodzaje i stężenia zastosowanych regulatorów wzrostu Types and concentrations of growth regulators	
Regulator wzrostu Growth regulator	Stężenie (mg/l) Concentration (mg/l)
BAP	0,01
	0,02
	0,05
TDZ	0,02
	0,05

Ze względu na stosunkowo niski procent uzyskanych siewek, którego przyczyną jest obecność dużej ilości nasion twardych (Borkowska, 1988; Doliński i in., 2006), charakterystycznych dla tego gatunku, inicjacja kultury *in vitro* ślazuca była przeprowadzona w dwóch powtórzeniach (tab. 2). Inne badania, w których wykorzystywano skaningowy mikroskop elektronowy wykazały, że o kiełkowaniu twardych nasion niektórych roślin może decydować struktura komórkowa blokująca rejon chalazy. Pełni ona rolę korka (kapsla), który zamyka dla wody dostęp do hilum (Das, Saha, 1999; Daws i in., 2006).

Tabela 2

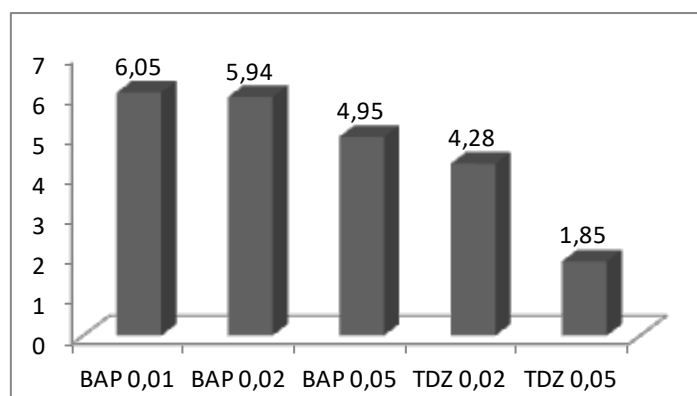
Efektywność sterylizacji i zdolność kiełkowania nasion ślazuca The efficiency of sterilization and germination capacity of <i>Sida hermaphrodita</i> seeds				
Powtórzenie 1 — Replication 1				
dzień day	liczba nasion no. of seeds	nasiona sterylne skiełkowane germinated sterile seeds (%)	nasiona sterylne nieskiełkowane non-germinated sterile seeds (%)	nasiona zakażone infected seeds (%)
7	300	33,3	64,7	2
10	288	42	55,3	2,7
21	288	49,7	45,6	2,7
Powtórzenie 2 — Replication 2				
7	300	39,3	60	0,7
10	291	39,3	59	1,7
21	274	49,6	48,7	1,7

Dla zapoczątkowania hodowli kultur *in vitro* wybrano zdrowe jakościowo siewki jako rośliny mateczne. Wykorzystano zarówno eksplantaty boczne jak i wierzchołkowe, przenosząc je na pożywki o różnym stężeniu regulatorów wzrostu BAP i TDZ w odstępach czterotygodniowych. Wyniki uzyskane podczas pasaży przedstawia tabela 3.

Efektywność namnażania eksplantatów na poszczególnych pożywkach
Efficiency of propagation of explants on different media

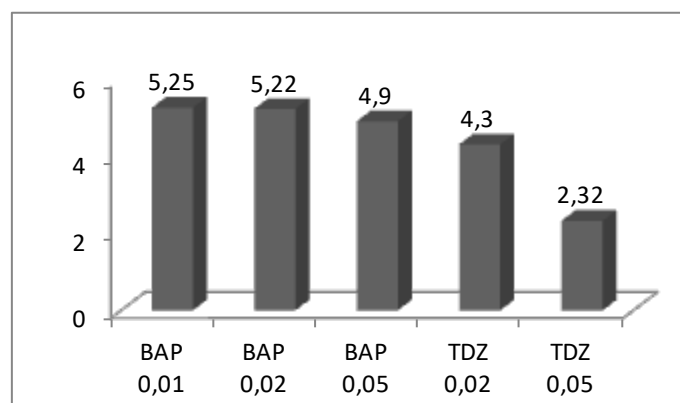
Regulator wzrostu Growth regulator (mg/l)	Stężenie Concentration (mg/l)	Explantat Type of explant	Explantaty wytwarzające pąki Explants producing buds (%)	Eksplantaty zamierające Dying explants (%)	Współczynnik rozmnażania Multiplication factor	Ukorzenione eksplantaty Rooted explants (%)
BAP	0,01	boczny side	100	0	5,25	97
		wierzchołkowy top	100	0	6,05	93
	0,02	boczny side	100	0	5,22	94
		wierzchołkowy top	100	0	5,94	93
	0,05	boczny side	97	3	4,90	93
		wierzchołkowy top	93	7	4,95	93
TDZ	0,02	boczny side	93	7	4,30	90,6
		wierzchołkowy top	90	9	4,28	66,6
	0,05	boczny side	90	10	2,32	8
		wierzchołkowy top	66	14	1,85	13

Na podstawie obserwacji sformułowano wnioski dotyczące wzrostu, rozwoju i efektywności namnażania się eksplantatów ślazuwca na określonych pożywkach. Dla zobrazowania różnic w wielkości współczynnika rozmnażania pomiędzy poszczególnymi pożywkami sporządzono rysunki 2 i 3.



Rys. 2. Zależność wielkości współczynnika rozmnażania od zastosowanej pożywki hodowlanej dla pąków wierzchołkowych

Fig. 2. Effect of medium used for apical buds *in vitro* cultivation on multiplication factor



Rys. 3. Zależność współczynnika rozmnażania od zastosowanej pożywki hodowlanej dla pąków bocznych

Fig. 3. Effect of medium used for lateral buds *in vitro* cultivation on multiplication factor value

Nieliczne publikacje naukowe przedstawiają badania nad hodowlą ślazuca pensylwańskiego w kulturach *in vitro*. W swoich badaniach Sivanesan i in. otrzymali współczynnik rozmnażania 20 dla *Sida cordifolia* L. przy użyciu pożywki MS z 0,5 mg/l BAP, 1,0 mg/l NAA, 1,0 mg/l siarczanu adeniny i 10% mleka kokosowego (Sivanesan, Byoung, 2007). Haynes i Graves (2004) opracowali metodę ukorzeniania mikrosadzonek z zastosowaniem pożywki zawierającą regulator wzrostu IBA, uzyskując w ten sposób 83% ukorzenionych roślin. Natomiast obserwacje wykazały, że współczynnik rozmnażania dla eksplantatów bocznych i wierzchołkowych był wyższy na pożywce MS, w której użyto 30 g/l sacharozy oraz regulatora wzrostu BAP w stężeniu 0,01 mg/l i wynosił odpowiednio: 5,25 oraz 6,05. Zastosowanie tej właśnie pożywki zapewniło wysoki odsetek (97% i 93%) ukorzenionych, gotowych do aklimatyzacji eksplantatów, bez konieczności stosowania dodatkowej pożywki inicjującej ukorzenianie. Podobne wartości współczynnika rozmnażania (5,22 i 5,94) uzyskano stosując pożywkę MS zawierającą BAP w stężeniu 0,02 mg/l, jednak ilość eksplantatów ukorzenionych była niższa (94 i 93%). Przypuszcza się, że niskie współczynniki rozmnażania były wynikiem mało zróżnicowanego składu pożywek.

Regulator wzrostu TDZ wykazał mniejszą efektywność w stosunku do regulatora wzrostu BAP. Na pożywkach zawierających TDZ otrzymano znacznie niższy współczynnik rozmnażania 4,28 i 4,30 dla stężenia 0,02 mg/l oraz 1,85 i 2,32 dla stężenia 0,05 mg/l i bardzo niski procent roślin ukorzenionych.

W następnym etapie mikrosadzonki ślazuca aklimatyzowano w ziemi ze 100% wydajnością. Dokonano dwukrotnych pomiarów wysokości roślin i liczby liści mikrosadzonek ślazuca, pochodzących z eksplantatów wierzchołkowych i bocznych hodowanych wcześniej na pożywkach o różnym stężeniu BAP (0,01 i 0,02 mg/l). Wysokość roślin kształtowała się odpowiednio: dla eksplantatów wierzchołkowych 4,1 cm, dla bocznych 4,5 cm, natomiast liczba liści dla eksplantatów wierzchołkowych wynosiła 7,78, dla bocznych 6,99 (BAP 0,01 mg/l). Wysokość roślin wynosiła 4,25 cm dla

eksplantatów wierzchołkowych, dla bocznych 3,84 cm, natomiast liczba liści dla eksplantatów wierzchołkowych wynosiła 7,94, dla bocznych 7,88 (BAP 0,02 mg/l). Analizując wyniki, które przedstawia tabela 4 można stwierdzić, że sadzonki szybko i równomiernie rozwijały się, osiągając porównywalną wysokość jak i liczbę liści zarówno dla eksplantatów bocznych jaki i wierzchołkowych.

Tabela 4

Efektywność aklimatyzacji mikrosadzonek ślazuca pensylwańskiego
Efficiency of acclimatization of multiplied explants of *Sida hermaphrodita*

Regulator wzrostu Growth regulator (mg/l)	Nr obserwacji Observation No.	Rodzaj eksplantatu Type of explant	Wysokość rośliny Plant height (cm)	Liczba liści No. of leaves (pieces.)	Rośliny rosnące Growing plants (%)
BAP 0,01 mg/l	1	wierzchołkowy top	3,93	6,2	100
		boczny side	3,99	6,14	100
	2	wierzchołkowy top	4,26	7,78	100
		boczny side	5,02	8,0	100
BAP 0,02 mg/l	1	wierzchołkowy top	3,96	7,74	100
		boczny side	3,68	6,9	100
	2	wierzchołkowy top	4,54	8,14	100
		boczny side	3,99	7,88	99,6

Krótkie komunikaty w czasopismach rolniczych i naukowych informują o stosowaniu mikrorozmnażania tego gatunku na cele komercyjne, jednak szczegółowa metodyka nie jest dostępna. Mikrorozmnażanie pozwala na szybsze uzyskanie większego materiału hodowlanego u gatunków wytwarzających nasiona o niskim współczynniku rozmnażania vegetatywnego (bulwy, cebule) (Malepszy, 2005).

Roślinne kultury tkankowe stwarzają możliwość produkcji dużej liczby sadzonek w czasie o wiele krótszym niż ma to miejsce w warunkach *ex vitro*. Zastosowanie szybkiego, rozmnażania ślazuca stwarza możliwość uzyskiwania w krótkim czasie jednolitego pod względem genetycznym wolnego od patogenów materiału roślinnego do produkcji wystandaryzowanych jakościowo opatrzonych certyfikatem substancji, a także sadzonek na cele agroenergetyczne. Z tego względu kontynuacja prac nad hodowlą *Sida hermaphrodita* w kulturach *in vitro* jest konieczna i zasadna.

PODSUMOWANIE

Badania własne pozwoliły na opracowanie wstępnej metodyki inicjacji sterylnych kultur *in vitro* ślazuca pensylwańskiego na podłożu MS zawierającym 0,04 mg/l GA3 (regulator wzrostu) oraz 1mg/l KIN (regulator wzrostu).

Ocena wpływu różnych rodzajów i stężeń roślinnych regulatorów wzrostu wykazała najlepszą jakość i wzrost eksplantatów na podłożu MS zawierającym BAP w stężeniu 0,01mg/l, dla której uzyskano stosunkowo niski współczynnik rozmnażania. Otrzymano wysoki procent ukorzenionych eksplantatów (99,8%), które następnie poddano aklimatyzacji w ziemi z bardzo wysoką wydajnością. Natomiast regulator wzrostu TDZ zastosowany w pożywkach miał niekorzystny wpływ na jakość i rozwój eksplantatów bocznych i wierzchołkowych.

Wskazane jest podjęcie dalszych badań na ulepszenie metody mikropropagacji ślazuwca poprzez założenie doświadczeń polowych.

LITERATURA

- Borkowska-Królik H. 1988. Wpływ czasu przechowywania na kiełkowanie nasion sidy (*Sida hermaphrodita* Rusby). Ann. UMCS. s. E. XLIII, 6: 45 — 49.
- Borkowska H., Styk B. 1997. Ślazuwec pensylwański (*Sida hermaphrodita* Rusby). Uprawa i wykorzystanie. Wyd. AR: 5 — 51.
- Borkowska H., Styk B. 2003. Polish Journal of Environmental Studies Vol. 12, (1): 51.
- Borkowska B. 2005. Fizjologiczna ocena roślin z kultur *in vitro*. Biotechnologia 2: 133 — 138.
- Das B., Saha P. K. 1999. Effect of dormancy breaking treatments on test a ultra structures and water uptake patterns of *Albiza procera* seed. Seed Sci. Technol., 27: 615 — 625.
- Daws M. I., Orr D., Burslem D. F. R. P., Mullins C. E. 2006. Effect of high temperature on chalazal plug removal and germination in *Apeibea tibourbou* Aubl. Seed Sci. Technol. 34: 221 — 225.
- Doliński R., Kociuba W., Kramek A. 2006. Wpływ krótkiego działania gorącej wody, chemicznej skaryfikacji i kwasu giberelinowego na kiełkowanie nasion ślazuwca pensylwańskiego (*Sida hermaphrodita* Rusby). Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. z. 517: 139 — 147.
- Haynes C. L., Graves W. R. 2004. *Kosteletzkyia virginica* can be rooted from leafy or leafless stem cuttings, Journal of Environmental Horticulture, Vol. 22 (4): 173 — 175.
- Malepszy. 2005. Biotechnologia Roślin. Warszawa, Wydawnictwo Naukowe PWN: 292 — 295.
- Sivanesan J., Byoung R J. 2007. Direct shoot regeneration from nodal explants of *Sida cordifolia* Linn. In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant, Vol. 43 (5): 436 — 441.
- Wróblewska A., Kolasa Z. 1986. Pożytek pszczeli z sidy. Pszczelarstwo (10): 3 — 4.