Izabela Szymborska-Sandhu*, Anna Pawełczak, Mirosław Angielczyk, Katarzyna Bączek, Zenon Węglarz

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Wydział Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu
Katedra Roślin Warzywnych i Leczniczych
Laboratorium Nowych Technologii Wytwarzania Produktów Zielarskich i Oceny ich Jakości
ul.. Nowoursynowska 159, Warszawa
* ✉ izabela_szymborska@sggw.pl

Regeneracja miodownika melisowatego (*Melittis melissophyllum* L.) w kulturach *in vitro*

WSTĘP

Miodownik melisowaty (*Melittis melissophyllum* L., *Lamiaceae*) jest byliną występującą w południowej i centralnej Europie. W Polsce rośnie on w widnych lasach liściastych i mieszanych, głównie we wschodniej części naszego kraju. Populacje tej rośliny są nieliczne i dość rozproszone, dlatego jest to roślina objęta całkowitą ochroną gatunkową. Częścią użytkową miodownika jest kwitnące ziele bogate w związki kumarynowe wykorzystywane głównie do aromatyzowania alkoholi i tytoniu.

Celem niniejszej pracy było opracowanie metody szybkiego uzyskiwania sadzonek miodownika melisowatego z zastosowaniem technik *in vitro*.

MATERIAŁY I METODY

Materiałem do inicjacji kultury *in vitro* były wierzchołki pędów pobierane w maju 2013 roku z matecznych roślin rosnących w ogrodzie botanicznym w Korycinach na Podlasiu (fot. 1). Eksplantaty odkażano w 0,2% roztworze sublimatu przez minutę i 4-krotnie płukano w sterylnej wodzie destylowanej. Następnie umieszczano je w probówkach na pożywce MS/B5 z dodatkiem 2iP (2-izopentyloadenina), BA (6-benzyloadenina) lub kinetyny w ilości 0,1 mg·l^{-1}. Zastosowana pożywka podstawowa MS/B5 zawierała makro- i mikroelementy nieorganiczne według pożywki MS (Murashige i Skoog 1962), a składniki organiczne według B5 (Gamborg i in. 1965). Dodano do niej 30 g·l^{-1} sacharozy i 7 g·l^{-1} agaru. Rozwijające się z eksplantatów rośliny posłużyły do założenia matecznika *in vitro* na pożywce podstawowej bez regulatorów wzrostu. Rośliny z matecznika były źródłem materiału do założenia doświadczenia nad wpływem regulatorów wzrostu na tworzenie się pędów bocznych z eksplantatów wierzchołkowych. W badaniach zastosowano BA w stężeniu: 0,1; 0,5 i 1,0 mg·l^{-1} oraz NAA (kwas 1-naftylooctowy) w stężeniu 0,01mg·l^{-1}. Kultury prowadzono w temperaturze 25°C i w 16 godzinnym fotoperiodzie (PPFD=50 µmol·m^{-2}·s^{-1}). Doświadczenie założono w trzech powtórzeniach. Każdy wariant doświadczenia reprezentowany był przez 30 eksplantatów. Liczbę pędów bocznych uzyskanych z eksplantatu określono po 4 tygodniach.

Do założenia kolejnego doświadczenia dotyczącego efektywności ukorzeniania się mikrosadzonek wykorzystano pędy otrzymane na pożywce zawierającej 1,0 BA mg·l^{-1}. W tym doświadczeniu stosowano pożywkę o zmniejszonym o połowę stężeniu makroelementów nieorganicznych (1/2 MS/B5) z dodatkiem 20 g·l^{-1} sacharozy. Do ukorzeniania zastosowano IBA (kwas indolilomasłowy) w stężeniach: 0,25; 0,5 i 1,0 mg·l^{-1}. Kontrolę stanowiła pożywka bez dodatku IBA. Otrzymane mikrosadzonki miodownika zaadaptowano ex vitro. Do adaptacji wykorzystano podłoże z odkwaszonego torfu wysokiego (pH=5,8) z dodatkiem nawozu wieloskładnikowego MIS4 w ilości 1 kg makroelementów i 135 g mikroelementów na 1 m3. Torf zmieszano z piaskiem i perlitem w stosunku 3:1:1. Mikrosadzonki posadzono w paletkach rozsadowych i umieszczono w pomieszczeniu o temperaturze 25°C, oświetlonym światłem fluorescencyjnym. Sadzonki były przykrywane folią perforowaną i w przeciągu 3 tygodni stopniowo wydłużano czas codziennego wietrzenia. Po 4 tygodniach adaptacji rośliny wystawiono do szklarni. Liczbę roślin zaadaptowanych określono po 6 tygodniach od wysadzenia.

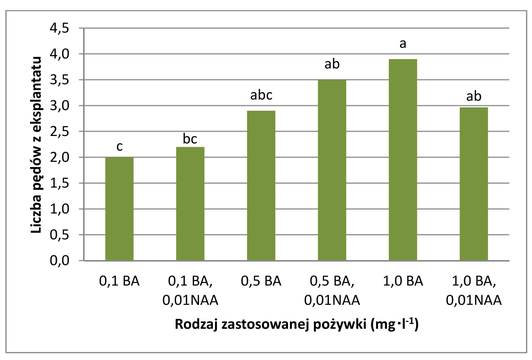
Otrzymane wyniki opracowano statystycznie za pomocą programu Statgraphics Plus 4.1. stosując jednoczynnikową analizą wariancji. Porównanie średnich przeprowadzono przy pomocy testu Tukey'a przy poziomie istotności α=0,05.

Fot.1 Kwitnące rośliny mateczne miodownika melisowatego (*Melittis melissophyllum* L.) – źródło eksplantatów do założenia kultury *in vitro*

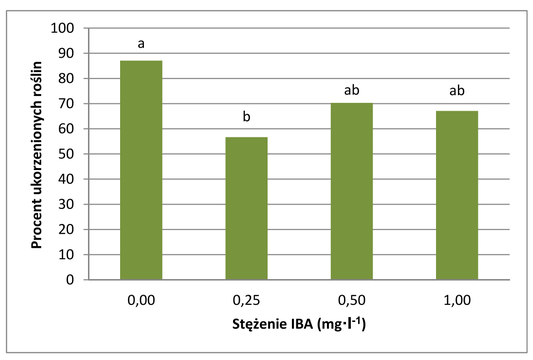
WYNIKI

Na etapie inicjacji kultury nie zaobserwowano różnic dotyczących wpływu różnych cytokinin na rozwój eksplantatów pobieranych z roślin matecznych miodownika. Efektywność odkażania była wysoka i wynosiła około 70%. Na kolejnym etapie badań stwierdzono, że liczba uzyskanych pędów bocznych zależała od zastosowanego stężenia BA, natomiast nie wpłynął na nią dodatek NAA (wyk.1). Miodownik melisowaty wykazał się w warunkach wykonywanych badań dość niskim współczynnikiem rozmnażania, który wynosił od 2,0 na pożywce z dodatkiem 0,1 mg·l^{-1} BA do 3,9 na 1,0 mg·l^{-1} BA (fot. 2). Kolejnym etapem było ukorzenianie uzyskanych pędów na pożywce ½ MS/B5 z dodatkiem IBA. Stwierdzono, że na pożywce kontrolnej ukorzeniło się 87,1% mikrosadzonek (wyk.2). Pożywka z dodatkiem auksyny nie tylko nie wpłynęła korzystnie na ukorzenianie, ale spowodowała zmniejszenie zdolności pędów do regeneracji korzeni (fot. 3 i 4). Najmniej pędów ukorzeniło się na pożywce z dodatkiem 0,25 mg·l^{-1} IBA, na której otrzymano jedynie 56,70% ukorzenionych mikrosadzonek.

Ostatnim etapem badań była adaptacja uzyskanych mikrosadzonek do warunków *ex vitro*. Po 6 tygodniach adaptacji stwierdzono, że rośliny miodownika dobrze dostosowały się do warunków szklarniowych. Niezależnie od zawartości IBA w zastosowanej do ukorzeniania pożywce około 90% roślin pomyślnie przetrwało ten etap rozwoju (tab.1, fot. 5).



Średnie oznaczone tymi samymi literami nie różnią się przy α=0,05
Wykres 1. Liczba pędów bocznych uzyskana z eksplantatu w zależności od stężenia BA i NAA w pożywce



Średnie oznaczone tymi samymi literami nie różnią się przy α=0,05
Wykres 2. Procent ukorzenionych mikrosadzonek w zależności od stężenia IBA w pożywce

Tabela 1. Procentowy udział mikrosadzonek zaadaptowanych do warunków *ex vitro* po 6 tygodniach od wysadzenia)

Zawartość IBA w pożywce (mg·l^{-1})	Rośliny zaadaptowane (%)
0	90,70 (a)
1	88,20 (a)

Fot.2 Pędy wytworzone z eksplantatów wierzchołkowych po 4 tygodniach od wyłożenia na pożywkę MS/B5 z 1,0 mg·l^{-1} BA

Fot.3 Ukorzenione mikrosadzonki po 8 tygodniach od wyłożenia na pożywkę 1/2 MS/B5 bez regulatorów wzrostu

Fot.4 Ukorzenione mikrosadzonki po 8 tygodniach od wyłożenia na pożywkę 1/2 MS/B5 z dodatkiem 1,0 mg·l^{-1} IBA

Fot. 5 Mikrosadzonki zaadaptowane *ex vitro* (po 6 tygodniach od wysadzenia)

PODSUMOWANIE

Badania podjęte w tej pracy są pierwszą próbą rozmnożenia miodownika melisowatego w kulturach *in vitro* w oparciu o wegetatywne eksplantaty inicjalne pobierane z kilkuletnich roślin. Wykazano, że użyta w badaniach cytokinina (BA) w zastosowanym zakresie stężeń pozwala na uzyskanie pędów bocznych miodownika, jednak współczynnik rozmnażania nie jest wysoki. Mikrosadzonki miodownika dość dobrze ukorzeniają się na pożywce bez dodatku auksyn i pomyślnie przechodzą etap adaptacji do warunków *ex vitro*. Konieczne są dalsze badania nad optymalizacją metody mikrorozmnażania tego gatunku.

autor

plakat