

KRYSTYNA KUKUŁCZANKA, JAN SAROSIEK

MERYSTEMATYCZNE KULTURY STORCZYKÓW

Uciążliwą hodowlę i uprawę storczyków, wymagającą metodycznej specyfiki, w ostatnich latach zrewolucjonizowało zastosowanie merystematycznych kultur. Badania merystematycznych kultur storczyków podjęte w różnych ośrodkach naukowych obejmują szeroką problematykę. Spontaniczny rozwój badań w tym zakresie uzasadnia poważny aspekt gospodarczy uprawy i hodowli storczyków.

Punktem wyjścia tej problematyki badawczej była konieczność odwirusowania wartościowych odmian roślin uprawnych rozmnażanych wegetatywnie (Morel i Martin 1955, Holmes 1956, Quak 1957), w tym i storczyków, szczególnie zaś ogrodnich form *Cymbidium* (Morel 1960). Po raz pierwszy wolne od wirusów rośliny *Cymbidium*, z roślin zainfekowanych wirusem mozaiki, Morel (1960) otrzymał w 1956 roku. Opracowując szczegółową technikę hodowli *in vitro* merystematycznych tkanek *Cymbidium* wolnych od wirusów zaobserwował, że wyizolowana tkanka merystematyczna z wierzchołka pędu rozwija się w tkankę morfologicznie podobną do protokormu nasion storczyków. Protokormy storczyków, poprzedzające stadium ukształtowanego kormusu, obserwowali między innymi Curtis i Nichol (1948) w hodowli nasion *in vitro*.

Otrzymane z wyizolowanych merystemów ciała podobne do protokormu Morel (1960, 1964) nazywa po prostu protokormami a amerykańscy i angielscy uczeni określają je terminem „protocorm-like bodies” (Wimber 1963, Sagawa, Shoji i Shoji 1966, Marston i Voraurai 1967). Z biegiem czasu tworzą one najpierw ryzoidy, a następnie pęd i korzeń, lub samorzutnie dzielą się na 2 lub więcej części, albo też tworzą boczne narośla w postaci guzków o strukturze protokormu (Morel 1965a). W kiełkujących nasionach storczyków, szczególnie zaś z rodzaju *Cymbidium*, również sporadycznie występuje zjawisko samorzutnego wytworzenia kilku protokormów, które w następstwie tworzą normalnie rosnące pędy co opisał Bernard (Curtis i Nichol 1948). Otrzymane protokormy z wyizolowanych tkanek merystematycznych Morel (1964, 1965a, b) i Wimber (1963) przecinając na kilka części stwierdzili ich niebywałą zdolność regeneracyjną. Każda z takich części jest bowiem zdolna do powtórnego odtworzenia protokormu. Wielokrotnie powtarzając podział

protokormów, uczeni ci stwierdzili, że potencjał regeneracyjny tkanek nie słabnie. Odkrycie to szybko wykorzystano w produkcji ogrodniczej i dziś już znane firmy ogrodnicze oferują rośliny uzyskane metodą kultur merystematycznych, jako tzw. meryklony (mericlones).

Jak wiadomo formy hodowlane storczyków w przeważającej części są heterozygotyczne i dlatego też potomstwo uzyskane z nasion jest bardzo różnorodne pod względem fenotypu i genotypu. Dlatego też w przypadku roślin z rodzaju *Cymbidium* po 6—10 latach od wysiewu nasion hodowca może wybrać z 1000 roślin tylko 1—3 rośliny spełniające wymagania odnośnie zdrowotności, jakości i wielkości plonu kwiatów (Morel 1960, 1964). Współczynnik rozmnażania wegetatywnego storczyków w tradycyjnej metodzie uprawy jest bardzo mały i pozwala z wyselekcjonowanych roślin np. *Cymbidium* po następnych kilku latach otrzymać tylko 6—12 roślin. Nic też dziwnego, że metoda merystematycznych kultur storczyków, pozwalająca wyprodukować hodowcy w ciągu jednego roku, jak podaje Morel (1964, 1965a), z jednego merystemu około 4 miliony protokormów, będących potencjalnie pełnowartościowymi roślinami, nie tylko zrewolucjonizowała dotychczasową produkcję storczyków w znaczeniu komercyjnym, ale też otworzyła nowe drogi badań w zakresie morfologii, fizjologii i genetyki tej interesującej grupy roślin. Za rzeczywiste można przyjąć dane Reinert i Mohra (1967), według których z jednego merystemu *Cattleya* można uzyskać przeciętnie 25—100 roślin, a maksymalnie około 3000. Podkreślić należy, że rośliny otrzymane na drodze wegetatywnej przez podział protokormów, a więc jako meryklony, kwitną znacznie szybciej niż rośliny otrzymane z nasion. Meryklony *Cymbidium* zakwitają już po 4—6 latach, gdy tymczasem rośliny z siewek kwitną dopiero po 6—10 latach (Morel 1965a). Meryklony *Dendrobium* zakwitają już po 2 latach od momentu wyizolowania merystemu (Sagawa i Shoji 1967).

Wybór materiału roślinnego

Przedmiotem dotychczasowych badań były przede wszystkim gatunki storczyków o większym znaczeniu gospodarczym, a mianowicie gatunki z rodzaju *Cymbidium* (Morel 1960, 1964, 1965a b, Wimber 1963, Sagawa, Shoji i Shoji 1966, Wilfret 1966), *Cattleya* (Morel 1964, 1965a, Vacherot 1966, Scully 1967, Reinert i Mohr 1967), *Dendrobium* (Sagawa i Shoji 1967), *Lycaste* (Morel 1964, 1965a, Vacherot 1966), *Miltonia*, *Odontoglossum* i *Phaius* (Morel 1964, 1965a), *Zygopetalum* (Vacherot 1966) oraz *Calanthe* i *Odontonia* (Bertsch 1966). Oprócz wymienionych rodzajów o pędach sympodialnych, przedmiotem dotychczasowych badań były również i rodzaje storczyków o pędach monopodialnych, jak np. *Cypripedium*, *Phalaenopsis* czy *Vanda* (Morel 1964, 1965a), jednakże w mniejszym zakresie, bowiem skrawki merystemu tych roślin nie tworzą protokormów. Wspomnieć jednak trzeba, że Scully (1966) u gatunków z rodzaju *Phalaenopsis*, a Sagawa i Sehgal (1967) u roślin z rodzaju *Vanda* uzyskali pełnowartościowe rośliny z uspio-

nych pąków bocznych izolując je z dolnych części pędów kwiatostanowych jako sadzonki oczkowe.

Tkanki merystematyczne do kultur takich storczyków, jak: *Cymbidium*, *Cattleya* czy *Dendrobium* izoluje się z młodych pędów wyrastających u podstawy bezlistnych pseudobulw oddzielonych uprzednio od matecznej rośliny i przetrzymywanych w warunkach umożliwiających wybijanie pędów, lub też z pędów wyrastających z zielonych i ulistnionych pseudobulw. Zdaniem Marston i Voraurai (1967) lepsze wyniki w kulturach dają tkanki merystematyczne izolowane z pędów wyrastających z zielonych pseudobulw. Częściej jednak do tego celu używa się pędów z pseudobulw starszych, wcześniej oddzielonych, bowiem odcinanie pędów osłabia mateczne rośliny.

Z dotychczasowych badań można wnioskować, że długość młodych pędów odpowiednich do izolacji merystematycznych tkanek nie jest tu istotna, bowiem Wimber (1963) oraz Reinert i Mohr (1967) z dobrym skutkiem korzystali z pędów *Cymbidium* 3 cm długich, a Morel (1965 a, b) z pąków ledwie zdolnych do elongacji. Najczęściej jednak używano pędów *Cymbidium* o długości 5—10 cm (Ilsley 1965, Sagawa, Shoji i Shoji 1966, Morel 1964, 1965 a, b, Leffring 1966). W przypadku izolacji merystematycznej tkanki z pędów *Cattleya*, Scully (1967) z dobrym rezultatem używał pędów 1—8 cm długich, Morel (1965 a) 5—10 cm długich, natomiast Reinert i Mohr (1967) używali zaledwie nabrzmiałe pąki również z dobrym rezultatem. Pozostaje więc nadal sprawa otwarta, jaka jest optymalna wielkość pędu różnych gatunków storczyków do izolacji merystematycznej tkanki, bowiem nie było dotychczas porównawczych badań.

Z pędów będących w początkowej fazie elongacji izolowano merystematyczną tkankę tylko z pąka szczytowego, natomiast z pędów silniej wydłużonych izolowano merystem również i z pąków bocznych (Morel 1960, 1964, Ilsley 1965, Sagawa, Shoji i Shoji 1966 oraz Scully 1967). U silniej wydłużonych pędów *Cymbidium* obserwuje się zanik pąka szczytowego (Kukułczanka 1970), wówczas z natury rzeczy pozostaje możliwość izolacji tkanki tylko z pąków bocznych. Według Jaspera (1966) również z powodzeniem można izolować grupy merystematycznych komórek występujących u nasady bulw, tuż pod epidermą.

Technika izolacji

Według Morela (1960, 1964) dobrze rozwijają się takie eksplantaty apikalnych merystemów, które zawierają część prokambium oraz 2—4 primordia liści. W izolacji merystemów apikalnych stosuje się 4 pionowe cięcia i jedno poziome podcinające w obrębie prokambium, co daje wycinek tkanki o kształcie zbliżonym do sześcianu (Morel 1964, Sagawa i Shoji 1967). W przypadku pąków bocznych izolowano cały pąk (Sagawa, Shoji i Shoji 1966, 1967). Ci autorzy izolowali również tkankę z międzywęźli młodych części *Dendrobium* lecz bez powodzenia.

Technika izolacji, jak i dalsza hodowla tkanek merystematycznych wymaga

sterylności. Przed przystąpieniem do izolacji, Morel (1960, 1964, 1965a, b) po usunięciu liści ze szczytu pędu *Cymbidium*, mył tę część rośliny wodą z mydłem. Oddzielony pęd Morel zanurza na kilka sekund w 75–96% alkoholu etylowym, a następnie na 20–30 minut w 3–8% roztworze podchlorynu wapnia. Leffring (1966) stosuje do tego celu 30% roztwór podchlorynu wapnia przez 15–20 minut, natomiast Wimber (1963) tylko 2% roztwór przez 10 minut. Sagawa, Shoji i Shoji (1966) do sterylizacji pędów *Cymbidium* stosowali roztwór chlorku bielącego w kolejności, najpierw roztwór 10% przez 15 minut, następnie 5% przez 5–8 minut i 1% przez 3 minuty, przy czym stopniowo usuwali z pędu liście, tak że w roztworze 3% pozostawały już same pączki. Ponadto stosowano takie środki, jak sublimat, podchloryn sodu (Morel 1960, 1964), czy chloramina (Kukułczanka 1970). W następstwie sterylizacji konieczne jest przepłukanie wysterylizowanych pędów sterylną wodą i osuszenie ich sterylną bibułą filtracyjną. Trzeba dodać, że najczęściej technicznych szczegółów sterylnej izolacji podają Sagawa, Shoji i Shoji (1966).

Niewątpliwie istotne znaczenie w izolacji merystemów ma wielkość eksplantatu. Morel (1960, 1964) w celu odwirusowania roślin *Cymbidium* izolował skrawki wierzchołką pędu szerokości 0,1 mm. Według Wilfreta (1966) i u *Cymbidium* zdolność wytwarzania ciał podobnych protokormom nie jest ograniczona tylko do skrawków merystemów z apikalnego stożka, bowiem poprzeczne 2 mm skrawki wyizolowane ze stożka wzrostu w odległości 6–8 mm od jego szczytu mają również dużą zdolność regeneracyjną. Ta niebywała zdolność regeneracyjna wyizolowanych skrawków merystematycznych, w rezultacie której powstają liczne protokormy, zmniejsza się wraz z ich odległością od szczytu stożka wzrostu, a więc eksplantaty wyizolowane z dalszych partii stożka mają mniejszą zdolność wytwarzania protokormów. Jak wykazał Morel (1965a, b) kultury merystematyczne *Cattleya* wymagają skrawków około 5 mm długich i 2–4 mm szerokich. Sagawa, Shoji i Shoji (1966) zalecają izolować skrawki wielkości 2–3 mm³, o bryle zbliżonej do sześciianu. Sagawa i Shoji (1967) izolowali skrawki *Dendrobium* wielkości 2–4 mm³ zarówno z pąków wierzchołkowych, z pąków pachwinowych, jak i z międzywęźli. Większe eksplantaty, a więc wielkości 2–3 mm³, choć znacznie lepiej rosną, nie zawsze dają rośliny wolne od chorób wirusowych tak, jak w przypadku goździków czy ziemniaków (Quak 1957).

Pożywki

W pierwszej fazie badań hodowli *in vitro* merystematycznych tkanek storczyków zastosowano pożywki, jakie stosowano już od wielu lat do kiełkowania nasion storczyków, a przede wszystkim pożywkę Knudsona (1946). Wraz z rozwojem badań ta podstawowa pożywka przechodzi różne modyfikacje, podobnie jak i później zastosowane pożywki Tsuchiya (1954) czy Vacin i Wenta (1946). Skład dotychczas stosowanych pożywek w hodowli merystematycznych tkanek storczyków podano w tabeli.

	Knudson C (1946)	Knudson C w modyfikacji Morela (1965a, b)	Vacin i Went (1949)	Tsuchiya (1954)	Tsuchiya w modyfikacji Wimbera (1963)	Tsuchiya w modyfikacji Leffring (1966)	Tsuchiya w modyfikacji Kukulezanki (1970)	Reinert i Mohr (1967)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	g 0,50	g 1,00*	g 0,50	g 0,50	g 0,50	g 0,50	g 0,50	g 0,40
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,40
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0075	0,0075	0,0075	—	—	—	—	0,0075
NH_4NO_3	—	0,50*	—	—	—	—	—	—
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	1,00	0,50	—	—	—	0,398	0,398	1,00
KNO_3	—	—	0,525	0,525	0,525	—	—	—
KH_2PO_4	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
KH_2PO_4	—	—	—	—	—	0,212	0,212	—
CaHPO_4	—	—	—	0,20	0,20	—	—	—
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	—	—	—	—	—	—	—	—
KCl	—	0,25	0,20	—	—	—	—	0,50
KOH	—	—	—	—	—	0,112	0,112	—
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	—	—	—	—	0,0278	—
$\text{Fe}_4(\text{SO}_4)_3$	—	—	—	—	—	—	—	0,00067
$\text{Na}_2\text{-EDTA}$	—	—	0,028	0,028	0,030	—	0,0373	0,0224
winian żelaza	—	—	—	—	—	—	—	—
histrydyna	—	—	—	—	—	—	—	—
glicyna	—	—	—	0,500	—	—	—	—
tryptone	—	—	—	—	2,00	2,00	—	0,002
peptobak-bacutil	—	—	—	—	—	—	2,00	—
sacharaza	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
agar	17,50	17,50	16,00	15,00	(12,00)	(15,00)	(15,00)	(15,00)
woda destylowana	1000 ml	1000 ml	1000 ml	1000 ml	1000 ml	1000 ml	1000 ml	1000 ml
inne dodatki	—	*1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i bez NH_4NO_3 lub też po 0,5 g tych zw.	—	kw. foliowy witamina B ₁	—	—	—	1000 ml mikroelem. B, Cu, Zn kw. cytrynowy wit. B ₆ i PP IBA, NAA

Każda z tych pożywek obejmuje zwykle 5 podstawowych grup substancji, a mianowicie podstawowe sole mineralne, pierwiastki śladowe, substancje wpływające na wzrost i podziały komórkowe (np. auksyny, witaminy, kininy), inne różne substancje niejednolite chemicznie dodatnio wpływające na wzrost (aminokwasy lub ich kompleksy, mleko kokosowe, sok ananasowy, pomidorowy, bananowy), oraz cukry, najczęściej sacharozę. Pożywka Reinert i Mohra (1967) zawiera mikroelementy: bor, cynk, miedź i mangan.

Morel (1960, 1964, 1965a) zestalając pożywkę Knudsona „C” agarem uzyskał dobre rezultaty w hodowli merystematycznych tkanek *Cymbidium*, *Miltonia* i *Phaius*, a niezadawalające w hodowli tkanek *Cattleya*. Znając prace Curtisa (1947) oraz Raghavan i Torreya (1964), którzy wykazali niezbędność azotu amonowego dla rozwoju embrionów *Cattleya*, Morel (1964, 1965a) zmodyfikował pożywkę „Knudson C” zmniejszając w niej ilość azotanu wapnia a dodając azotan amonu lub tylko zwiększając zawartość siarczanu amonu. Pożywkę „Knudson C” modyfikuje również Morel (1964, 1965b) i do hodowli tkanek *Cymbidium*, a mianowicie opierając się na doświadczeniach z merystemami ziemniaków, zwiększa w niej ilość potasu. Pożywkę „Kundson C” z powodzeniem stosowali w hodowli merystematycznych tkanek *Cymbidium* Sagawa, Shoji i Shoji (1966) oraz Wilfret (1966). Safawa i Shoji (1967) stosowali również tę pożywkę w hodowli merystematycznych tkanek *Dendrobium*. Wimber (1963) do hodowli tkanek *Cymbidium* modyfikuje pożywkę Tsuchiya (1954). Modyfikacja ta polega na zastąpieniu histydyny polipeptydem o nazwie „tryptone” oraz na wyłączeniu tiaminy i kwasu foliowego. Dalszą modyfikację pożywki Tsuchiya spotykamy w pracy Leffring (1966), która uzyskała na tej pożywce lepsze rezultaty hodowli tkanek *Cymbidium* niż na pożywce Knudsona. Pożywka Vacin i Wenta (1949) opracowana dla siewek storczyków znalazła zastosowanie i w hodowli merystematycznych tkanek storczyków. W hodowli tkanek *Cymbidium* pożywkę tę stosowali Sagawa, Shoji i Shoji (1966), a w hodowli tkanek *Cattleya* Scully (1967). Scully (1966) tę pożywkę stosował i w hodowli pąkowych sadzonek *Phalaenopsis*, a Sagawa i Seghal (1967) w hodowli pąkowych sadzonek *Vanda*. Najbardziej odbiegającą od pozostałych jest pożywka Reinert i Mohra (1967) zastosowana w hodowli tkanek *Cymbidium* i *Cattleya*.

Dodawanie do pożywek ekstraktów roślinnych, takich jak: mleko kokosowe, sok bananowy, pomidorowy czy ananasowy, które korzystnie wpływają na rozwój storczyków hodowanych z nasion (Griffith i Link 1957, Lawrence i Arditti (1964) w przypadku hodowli tkanek merystematycznych *Cymbidium* (Morel 1965a, b) daje nikłe rezultaty. Podobnie niezadawalające wyniki uzyskali Reinert i Mohr (1967) w pierwszych trzech tygodniach hodowli merystemów *Cattleya* dodając do pożywki mleko kokosowe oraz kinetynę i inozytol. Mleko kokosowe dodane do pożywki w inicjalnych stadiach rozwoju wyizolowanych merystemów *Cattleya* powoduje nawet ich śmierć. Inozytol i kinetyna szkodliwe w inicjalnych stadiach rozwoju eksplantatów merystematycznej tkanki *Cattleya*, dodane do nowej pożywki agarowej po upływie trzech tygodni stają się nieszkodliwe, a w przypadku

kinetyny można nawet stwierdzić jej stymulujący wpływ. Dodatek mleka kokosowego do pożywki po 3—4 tygodniach rozwoju merystematycznej tkanki *Cattleya* powoduje dobry rozwój kalusu, aczkolwiek pojawiać się mogą i obszary martwej tkanki; natomiast dodatek do pożywki kinetyny i mleka kokosowego powoduje szybszy rozwój tej tkanki. W tych warunkach pożywki, jeśli nie dzielimy kalusowej tkanki do dalszych subkultur, tworzą się z niej liczne protokormy. Reinert i Mohr (1967) zarówno w płynnej pożywce, jak i w pożywce agarowej stwierdzili brunatną pigmentację wokół tkanki wywołaną kinetyną. Stwierdzono, że źródłem tej pigmentacji jest sama tkanka. Nie wszystkie jednak eksplantaty *Cattleya* wykazują taką reakcję na kinetynę. Badania Reinert i Mohra (1967) stanowią wstępny etap realizacji szerzej zaplanowanych badań dotyczących chemicznej regulacji wzrostu izolowanych merystematycznych tkanek storczyków w Eksperymentalnej Stacji Rolniczej Kentucky. Należy więc oczekiwać, że dalsze badania bliżej wyjaśnią szkodliwość pewnych substancji w pierwszej fazie rozwoju eksplantatów i korzystne ich działanie w dalszych fazach rozwoju, jak w przypadku kokosowego mleka i kinetyny. Przyszłe badania nad współdziałaniem auksyn, cytokinin i giberelin niewątpliwie wyjaśnią zagadnienie chemicznej regulacji wzrostu wyizolowanych merystemów *Cattleya* i innych storczyków.

Tak jak w przypadku hodowli siewek storczyków na pożywce dodawano różne substancje wzrostowe (Withner 1957), tak i w hodowli merystematycznych tkanek storczyków zastosowano już te substancje. Morel (1965a, b) dodawał do pożywek IAA i NAA w ilości 1 mg/l, a Scully (1967) NAA również w ilości 1 mg/l. Autorzy ci nie omawiają jednak wyników doświadczeń z zastosowaniem tych substancji. Reinert i Mohr (1967) ponadto dodawali do pożywek IBA oraz witaminy B₁, B₆ i PP.

Badania hodowli merystematycznych tkanek storczyków są dotychczas we wstępnej fazie, toteż zagadnienie składu pożywek wymaga bardziej szczegółowych opracowań. Poważnym mankamentem dotychczasowych badań w tym zakresie jest brak ilościowych opracowań wyników doświadczeń ze zróżnicowaniem pożywek. Konieczne są dalsze badania nad wpływem dodatkowych substancji w pożywce na wzrost i rozwój izolatów merystematycznych tkanek nie tylko poszczególnych gatunków storczyków, ale i odmian i klonów. Badania winny zmierzać do zindywidualizowania pożywek w stosunku do poszczególnych gatunków storczyków i ich odmian. Pożywki stosowane w hodowli *in vitro* będące empirycznymi zestawami różnych składników są układami metabolicznie statycznymi i według Hoffmanowej (1968) nie mogą zastąpić w pełni określonych organów lub tkanek roślinnych dostarczających substancji odżywczych w określonej sekwencji i w sposób dynamiczny. Należy więc oczekiwać, że dalsze badania nad zastosowaniem bardziej zindywidualizowanych pożywek w hodowli *in vitro* merystematycznych tkanek różnych gatunków i odmian storczyków zbliżą warunki sztucznego odżywiania do naturalnego, dynamicznego ich układu jakim jest cała roślina.

Odczyn (pH). Aczkolwiek autorzy nie precyzują optymalnego odczynu pożywek,

można przypuszczać, że i pH jest również istotnym czynnikiem powodzenia kultur merystematycznych storczyków. Określenie optymalnego pH pożywki do kultury określonego gatunku storczyka wymaga ilościowych porównawczych badań. Wimber (1965) uzyskał dobry rezultat w hodowli tkanek *Cymbidium* przy pH pożywki 5, 6, a Scully (1967) w hodowli tkanek *Cattleya* przy pH pożywki 5, 0-5, 2. Reinert i Mohr (1967) zarówno w hodowli tkanek merystematycznych *Cymbidium*, jak i *Cattleya*, niezależnie od składu pożywki, stosują pH 5,0. Według Jaspera (1966) odczyn pożywek dla kultur tkankowych storczyków winien być w granicy pH 4, 8—5, 5. Z przytoczonych danych widać, że odczyn pożywek stosowanych w kulturach merystematycznych tkanek storczyków jest podobny do odczynu pożywek stosowanych do kiełkowania nasion tych roślin (Nicolai 1939, Sander 1956). Prawdopodobnie kultury tkankowe storczyków gruntowych, jak np. *Cymbidium*, w odróżnieniu od gatunków epifitycznych, wymagają nieco wyższego pH. W Ogrodzie Botanicznym Uniwersytetu we Wrocławiu i w Doświadczalnej Stacji Kwaciarskiej w Aalsmeer (Holandia) w hodowli tkanek *Cymbidium* stosuje się pH 5,7—6,0.

W hodowli storczyków z nasion wraz z rozwojem siewek zmienia się odczyn pożywki. Również z biegiem czasu zmienia się odczyn pożywek w kulturach tkankowych. Według Knudsona (1951) odczyn agarowej pożywki siewek storczyków o pH 5,16 po 33 miesiącach wzrostu siewek wynosi pH 3,0. W Ogrodzie Botanicznym we Wrocławiu obserwowano obniżenie pH płynnej pożywki w kulturze tkankowej *Cymbidium* z 5,7 do 4,0 po upływie 10 tygodni.

Pożywki stałe i płynne. Pierwsze kultury merystematyczne storczyków, w których zaobserwowano samorzutne dzielenie się protokormów, miały pożywki stałe (Morel 1960). Płynne pożywki do hodowli merystematycznych storczyków wprowadził Wimber (1963). Uczony ten zaobserwował, że protokormy *Cymbidium* rozwijające się z wyizolowanych merystemów na płynnej pożywce nie tworzą pędów, lecz coraz to większą masę protokormów. W dalszych badaniach Wimber (1965) stwierdził, że wzrost masy protokormów był dwukrotnie większy w pożywce płynnej wstrząsanej na aparacie rotacyjnym niż w pożywce stałej lecz stabilnej. Badania Leffring (1966) wykazały, że w płynnej pożywce w aparacie rotacyjnym z tkanki merystematycznej szybciej wykształcają się protokormy, aniżeli na pożywce stałej. Zdaniem Morela (1964, 1965a) izolowane merystemy *Cymbidium* do czasu wytworzenia protokormów korzystniej jest hodować na pożywkach stałych, natomiast merystemy *Cattleya* na pożywce płynnej. Za korzystniejszym stosowaniem płynnych pożywek w hodowli merystemów *Cattleya* przemawiają również prace Scully (1967). Reinert i Mohr (1967) już w parę dni po wyizolowaniu merystemów *Cattleya* przenosili je z płynnej pożywki na pożywkę stałą. Natomiast Sagawa i Shoji (1967) hodując merystemy *Dendrobium* wyizolowane z wierzchołkowych i pachwinowych pąków otrzymali pozytywne wyniki zarówno na pożywce stałej, jak i w pożywce płynnej.

Tkanki wielu odmian storczyków mogą zbrunatnieć na powierzchni cięcia przez

oksydację związków fenolowych. Aby uniknąć toksyczności produktów tej oksydacji Morel (1964, 1965a) zaleca 2—3-krotne przeniesienia tkanek do świeżych pożywek w odstępach niewielu dni. Z tych względów korzystniejsze są więc w pierwszych dniach hodowli pożywki płynne.

Do wstrząsania płynnych kultur stosuje się aparaty rotacyjne o pionowym ustawieniu (Morel 1965a, b, Wilfret 1966, Reinert i Mohr 1967), o ustawieniu poziomym (Sagawa, Shoji i Shoji 1966) oraz ustawione pod kątem 30—45° (Leffring 1966). Stosowane aparaty rotacyjne mają różną szybkość obrotów. Wilfret (1966) stosował aparat o 1/5 obrotu na minutę, Morel 1965a, b) oraz Sagawa, Shoji i Shoji (1966) stosowali aparat o 1—2 obrotach na minutę, natomiast Scully (1967) i Wimber (1965) aparat o 160 lub 200 obrotach na minutę. Podana szybkość obrotów jest względna, bowiem cytowani autorzy nie podają średnicy stosowanych aparatów rotacyjnych.

Na uwagę zasługują hipotezy Wimbera (1963) i Scully (1967) na temat korzystniejszego działania pożywek wstrząsanych na rozwijające się merystemy storczyków. Według Wimbera (1963) stałe wstrząsanie kultury ogranicza biegunowość rozwijających się tkanek, tymże samym hamuje rozwój pędu. Według Scully (1967) wstrząsanie kultury zwiększa maksymalnie liczbę centrów wzrostu merystematycznej tkanki przez zahamowanie biegunowości, a ponadto rozprawdza w pożywce specyficzny inhibitor powstający przyrannie i w wyniku sterylizacji, oraz zwiększając aerację warunkuje pełną aktywność oddychania, sprzyja syntezie białek i pobieraniu soli, zwiększa powierzchnię kontaktu tkanki z pożywką.

Światło i temperatura

W dotychczasowych badaniach nie rozważano specjalnie światła, a więc czynnika, który musi mieć istotne znaczenie dla rozwoju tkanek, w których tworzą się chloroplasty. Dotychczas stosowano różną intensywność oświetlenia. Wimber (1963) uzyskiwał dobre wyniki hodowli tkanek storczyków już przy natężeniu światła wielkości 100 świec stopowych, a Sagawa i Shoji (1967) przy natężeniu światła od 100 do 170 świec stopowych. Reinert i Mohr (1967) stosowali natężenie światła wielkości 200 świec stopowych, a Jasper (1966) 1800 do 2000 świec stopowych. Dotychczas stosowano również różny czasokres oświetlenia w ciągu doby. I tak, Morel (1960) stosował 12-godzinne oświetlenie w ciągu doby, Ilsley (1965, 1966) 16-godzinne, natomiast ciągłe oświetlenie kultur stosowali Wimber (1963), Sagawa, Shoji i Shoji (1966) oraz Leffring (1966). Niewątpliwie konieczne są w tym względzie badania porównawcze określające optimum natężenia światła i właściwy czasokres dla poszczególnych gatunków storczyków w tkankowej hodowli. Konieczne jest również poznanie wymagań świetlnych rozwijających się eksplantatów w różnych stadiach wzrostu.

Dotychczas stosowano w kulturach merystematycznych storczyków temperaturę w granicy 22—30°C. Dla hodowli tkanek *Cymbidium* Morel (1964), Wimber (1963)

i Wilfret (1966) zalecają stałą temperaturę 22°C, natomiast Leffring (1966) 23°C. Według Sagawa i Shoji (1967) kultura tkanek *Dendrobium* wymaga temperatury 27°C. Reinert i Mohr (1967) utrzymują kultury tkanek *Cymbidium* i *Cattleya* w temperaturze 24—28°C. Według Ilsleya (1965) optymalna temperatura dla kultur tkankowych storczyków leży w granicy 26,6 do 29,4°C, temperatura 30,2°C jest już górną granicą krytyczną. Według Jaspera (1966) temperatura 24—28°C zapewnia najkorzystniejszy wzrost merystematycznych tkanek storczyków. Niewątpliwie optimum temperatury zależy od natężenia światła, od czasokresu oświetlenia w ciągu doby, jak również i od wymagań poszczególnych gatunków storczyków, czy nawet i odmian hodowlanych.

Subkultury

Czasokres od momentu izolacji merystemu do wytworzenia protokormu jest bardzo różny u różnych gatunków, odmian i klonów i niewątpliwie zależy od ich żywotności. Małe bardzo wycinki merystemów, bez primordiów liściowych, rosną wolno i znacznie później wytwarzają protokormy. Wyizolowane małe skrawki tkanki *Cymbidium* tworzą protokormy w ciągu 3—4 miesięcy (Morel 1960, 1965a, b), natomiast większe już po upływie miesiąca. Sagawa, Shoji i Shoji (1966) uzyskiwali protokormy *Cymbidium* z merystemów o wielkości 2—3 mm w ciągu 4—6 tygodni.

Wykształcone już protokormy stanowią właściwy materiał dla subkultur. Duża zdolność regeneracyjna protokormów sprzyja dużej dowolności sposobów cięcia ich na mniejsze części, a więc możliwe są cięcia w płaszczyznach poziomych, pionowych, cięcia całkowite lub też tylko nacięcia. Morel (1964, 1965a) przecinał protokormy *Cymbidium* na 4—6 części w płaszczyźnie pionowej, natomiast Sagawa, Shoji i Shoji (1966) na 3—4 części. Scully (1967) przecinał protokormy *Cattleya* zarówno w płaszczyźnie poziomej, jak i pionowej. W Ogrodzie Botanicznym we Wrocławiu otrzymano dobre rezultaty już przez samo nacinanie protokormów *Cymbidium* (Kukułczanka 1970). Stadium protokormu u *Cattleya* trwa bardzo krótko w odróżnieniu od stadium protokormu *Cymbidium*, dlatego też często stosuje się ścięcie wierzchołka protokormu zapewniające wzrost większej masy tkanki potrzebnej do subkultur.

Bezpośrednio po podzieleniu protokormów lub ich częściowemu nacięciu przenosimy te tkanki do świeżej pożywki. W przypadku stałej pożywki wskazane jest przeniesienie pociętych protokormów na pożywkę miejscem nacięcia. W subkulturach korzystniejsze są pożywki płynne (Wimber 1965, Leffring 1966). Teoretycznie nie ma ograniczenia liczby podziałów protokormów, a w następstwie uzyskania subkultur. Subkultury można uzyskać każdorazowo po upływie 2—8 tygodni od momentu podziału protokormów (Morel 1964, 1965a). Trzeba jednak zaznaczyć, że *Cattleya* wymaga częstszego podziału rosnącej tkanki, a więc częściej uzyskujemy kolejne subkultury tej rośliny.

W przeciwieństwie do pierwszego podziału protokormu wytworzonego bezpośrednio z wyizolowanego merystemu, merystematyczne tkanki będące już w subkulturach można dzielić na wiele części i uzyskać większą liczbę protokormów. Wimber (1963) aglomerat merystematycznej tkanki *Cymbidium* w subkulturze dzielił na 20 a nawet i więcej części.

Liczba tworzących się protokormów w subkulturach zależy od gatunku i odmiany hodowlanej, a nawet i od klonu, na co zwraca uwagę Morel (1964). Istotne znaczenie w tym przypadku mają i warunki hodowli, a więc skład pożywki, jej odczyn, temperatura i światło (Jasper 1965).

Protokormy uzyskane w subkulturach, po przeniesieniu na pożywkę stałą, wytwarzają małe rośliny, już nawet w ciągu miesiąca. Po upływie dalszych 3—4 miesięcy rośliny te można przenieść na ściółkę właściwą w uprawie storczyków.

Instytut Botaniki i Biochemii Uniwersytetu we Wrocławiu

LITERATURA

- Bertsch W., 1967. *A new frontier: orchid propagation by meristem tissue culture*. Am. Orchid. Soc. Bull. 36: 32—37.
- Curtis J. T., 1947. *Studies on the nitrogen nutrition of Orchid's embryos*. I Complex nitrogen sources. Plant Physiol. 35: 454—462.
- Curtis J. T. and Nichol A. M., 1948. *Culture of proliferating orchid embryos in vitro*. Bull. Torrey Bot. Cl. 75: 358—373.
- Griffith E. and Link C. B., 1957. *Germination and growth responses of Cattleya seeds as influenced by the use of certain organic materials in nutrient media*. Am. Orchid Soc. Bull. 26: 184—192.
- Hoffmannowa A., 1968. *O niektórych zagadnieniach hodowli organów kwiatowych in vitro*. Kosmos A, 17, z. 4: 347—353.
- Holmes F. O., 1956. *Elimination of aspermy virus from the Nightingale chrysanthemum*. Phytopathology, 46: 599—600.
- Ilsley P., 1965. *Meristem tissue propagation techniques and potentials*. Orchid Rev., 73: 371—376.
- Ilsley P., 1966. *Meristem tissue propagation techniques and potentials*. Orchid Rev. 74: 69—70.
- Jasper B. S., 1966. *A method for meristem tissue culture*. Am. Orchid Soc. Bull. 35: 10—11.
- Knudson L., 1946. *A new nutrient solution for the germination of orchid seed*. Am. Orchid Soc. Bull. 15: 214—217.
- Knudson L., 1951. *Nutrient solutions for orchids*. Bot. Gaz. 112: 528—532.
- Kukułczanka K., 1970. *Meryklony storczyków*. Ogrodnictwo z. 1.
- Lawrence D. and Arditti J., 1964. *A new medium for the germination seeds*. Am. Orchid Soc. Bull. 33: 766—768.
- Leffring L., 1966. *Vegetatieve vermeerdering bij Cymbidium door middel van meristeem-cultuur*. Proefstation voor de Bloemisterij in Nederland te Aalsmeer, Jaarverstag: 63—65.
- Marston M. E. and Voraurai P., 1967. *Multiplication of orchid clones by shoot meristem culture*. Univ. of Nottingham. Dep. of Horticulture, Miscellaneous Publ. 17: 1—9.
- Morel G. M., 1960. *Producing virus-free Cymbidiums*. Am. Orchid. Soc. Bull., 29: 495—497.
- Morel G. M., 1964. *Tissue culture: a new means of clonal propagation of orchids*. Am. Orchid. Soc. Bull., 33: 473—478.
- Morel G. M., 1965a. *Eine neue Methode erbgleicher Vermehrung: Die Kultur von Triebspitzen-Meristemen*. Die Orchidee 16 (3): 165—176.

- Morel G. M., 1965b. *Clonal propagation of orchids by meristem culture*. Cymbidium Soc. News, 26 (7): 3—11.
- Morel G. M. and Martin C., 1955. *Geurison des plantes atteintes de maladies a virus; par culture de meristemes apicaux*. Report of XIV Intern. Hort. Congress, Netherlands, 303—310.
- Nicolai W., 1939. *Orchideen und ihre Kultur im Zimmer und Gewächshaus*. Berlin. Gartenbau Verlag, s. 42.
- Quak F., 1957. *Meristeeencultuur gecombineeroll met warmtebehandeling, voor het verkrijgen van virusvrije anjers*. Tijdschr. Pl. Ziekt. 63: 13—14.
- Raghavan V. and Torrey G., 1964. *Inorganic nitrogen nutrition of the orchid Cattleya*. Am. Journ. Bot. 51: 264—274.
- Reinert R. A. and Mohr H. C., 1967. *Propagation of Cattleya by tissue culture of lateral bud meristems*. Proceedings of the American Soc. 91: 664—671.
- Sagawa Y., Shoji T. and Shoji T., 1966. *Clonal propagation of Cymbidiums through shoot meristem culture*. Am. Orchid Soc. Bull., 35: 118—122.
- Sagawa Y. and Shoji T., 1967. *Clonal propagation of Dendrobiums through shoot meristem culture*. Am. Orchid Soc. Bull. 36: 856—859.
- Sagawa Y. and Sehgal Om. P., 1967. Bulletin of the Pacific Orchid Soc. 25: 2—3.
- Sander D., 1956. *Orchids and their cultivation*. London, Blandford Press: 74.
- Scully R. M. Jr., 1966. *Stem propagation of Phalaenopsis*. Am. Orchid. Soc. Bull. 35: 40—42.
- Scully R. M. Jr., 1967. *Aspects of meristem culture in the Cattleya Alliance*. Am. Orchid. Soc. Bull., 36: 103—108.
- Tsuchiya J., 1954. *Germination orchid seeds from premature pods*. Na Pua Ohika o Hawaii Nei, 4: 11—16.
- Vacherot M., 1966. *Meristem tissue culture propagation of orchids*. Proceedings of the Fifth World Orchid Conference, 23—26.
- Vacin E. and Went F., 1949. *Some pH changes in nutrient solutions*. Bot. Gaz. 110: 605—613.
- Whitner C., 1957. *The orchids (Orchid Physiology)*, New York, The Ronald Press Comp.: 315—360.
- Wilfret G. J., 1966. *Formation of protocorm-like bodies on excised Cymbidium shoot tips*. Am. Orchid Soc. Bull., 35: 827—837.
- Wimber D. E., 1963. *Clonal multiplication of Cymbidiums through tissue culture of the shoot meristem*. Am. Orchid Soc. Bull. 32: 105—107.
- Wimber D. E., 1965. *Additional observations on clonal multiplication of Cymbidiums through culture of shoot meristem*. Cymbidium Soc. News, 20 (4): 7—10.