

T. DOMINIK

HODOWLA TKANEK ROŚLINNYCH IN VITRO JAKO PODŁOŻE DLA CZYSTYCH KULTUR PASOŻYTÓW BEZWZGLĘDNYCH

Od początku badań fitopatologicznych i mikologicznych uczeni napotykali trudności w powiązaniu cykli rozwojowych pasożytów obligatorycznych.

Pasożyty fakultatywne w XIX wieku również były opisywane w sposób bardzo nieścisły, lecz odkrycia i metody badań P a s t e u r a pchnęły badania tej grupy pasożytów na właściwe tory.

Przez czyste kultury prowadzone w ściśle określonych warunkach, przy stosowaniu wszystkich wymagań aseptyki, udało się skorygować pojęcia systematyczne i zbadać fizjologię wielu organizmów, które dzięki polimorfizmowi opisywane bywały pod różnymi nazwami.

Szczególnie bakteriologia rozwinęła się potężnie w rezultacie zastosowania nowych metod, które pozwoliły na poczynienie masy odkryć pożytecznych dla medycyny i weterynarii. Niemniej zyskała mikrobiologia przemysłowa, która dzięki wprowadzeniu czystych kultur mogła się rozwinąć do dzisiejszego stanu.

Zawsze jednak opierały się wszelkim usiłowaniom ludzkim pasożyty obligatoryczne, nie dając się prowadzić w czystych kulturach. I dzisiaj po wielu uciążliwych badaniach i odkryciach nie potrafimy hodować wszystkich pasożytów.

Metody pasteurowskie cechuje pewna ograniczoność w zastosowaniu. Mianowicie są one możliwe tylko dla prowadzenia kultur saprofitów i pasożytów okolicznościowych, zwanych półpasożytami lub pasożytami fakultatywnymi.

Nie możemy tych metod stosować do hodowli rdzy (*Uredinales*), mączniaków rzekomych (*Peronosporaceae*), mączniaków właściwych (*Erysiphaceae*), wirusów itp.

Pierwszy impuls do hodowli pasożytów obligatorycznych na czystych kulturach tkanek *in vitro* daje C a r r e l, hodując tkanki zwierzęce i porażając je różnymi mikrobami, aby zbadać reakcje tkanek na pasożyty.

Przez analogię próbowano otrzymać czyste kultury tkanek roślinnych *in vitro*.

Początkowo badania te miały na celu po prostu znalezienie sposobu na wyhodowanie czystych kultur tkanek roślinnych.

Pierwsze próby zaczął Haberlandt w 1898 roku. Próbował on hodować miękisz palisadowy liści *Lamium* i innych roślin zielnych, nie uzyskując pozytywnych rezultatów.

Za Haberlandtem poszli Bobilioff — Preissler, Lamprecht i Knudson, również bez powodzenia.

Pierwsze pozytywne rezultaty osiągnęli dopiero Kotte i Robbins, którzy do kultur brali merystemy korzeniowe.

Wyniki badań tych autorów pozwoliły White'owi w 1934 roku na założenie pierwszej nieskończonej kultury korzeni pomidorów w warunkach sztucznych i aseptycznych. Korzenie przeszczepiane z kultury wyjściowej na nowe pożywki rozwijały się, nie mając nad sobą zielonego ulistnionego pędu. Materiały organiczne czępały z pożywki, syntetyzując białko w komórkach bezieleniowych.

Nie wszyscy jednak badacze poszli drogą uitorowaną przez wyżej wymienionych autorów. Wielu starało się iść za myślą Haberlanda i szukało sposobów na otrzymanie dosłownych czystych kultur tkanek roślinnych, a nie organów. Wszystkie badania Borgera (1926), Czechy (1926), Uehli (1928), Schmuckera (1929), Pfeiffera (1931), Craciuna (1931) i Küstera (1931) spełzyły na niczym. Küster nawet uznał zadanie za niemożliwe do rozwiązania.

Wszyscy ci autorzy popełniali jeden wspólny błąd, mianowicie do kultur usiłowali wprowadzić tkanki definitywnie wykształcone.

Dopiero Gautheret (1934) domyślił się powodu niepowodzeń i do kultury wziął tkanki kambialne. Kładł on kawałki tkanki merystematycznej na wacie przesączonej pożywką Knopa + glukoza lub na pożywce Knopa + glukoza + agar. Udaje mu się tym sposobem uzyskać silny rozwój tkanek roślinnych *in vitro*, lecz rozwój trwa tylko przez 18 miesięcy. Potem tkanki mimo przeszczepień zamierają.

Powód krótkotrwałości kultur zostaje równocześnie odkryty przez White'a, Gauthereta i Nobbécourta w latach 1938/39. Polega on na braku substancji wzrostowych w pożywce. Na 18 miesięcy rozwoju zaś wystarczy akurat zapas wniesiony z kawałkiem tkanki kambialnej.

Po dodaniu do pożywek aneuryny (witaminy B₁), cysteiny i kwasu β -indoloctowego tkanki rozwijają się w pożywkach w nieskończoność.

Pierwsze swe doświadczenia z tkankami merystematycznymi Gautheret rozszerza na tkanki „mięsiste“ z bulw słonecznika, skorzonery (*Scorzonera* sp.), rzodkiewki, marchwi itp.

W tymże czasie White hoduje tkanki rakowate z *Pseudomonas tumefaciens*.

Udanie się kultur tkanek roślinnych *in vitro* zależy w pierwszym rzędzie od odpowiedniego zestawienia medium odżywczego. Poza tym ważna jest sama technika przeszczepiania tkanek z rośliny na pożywkę.

Technika przygotowania pożywek i metody przeszczepiania zostały szczególnie opracowane przez Gauthereta. Są one stosowane przez wszystkich autorów, którzy dotychczas zajmują się hodowlą tkanek *in vitro*. Poszczególni autorzy wprowadzają do nich jedynie małe zmiany lub uzupełnienia, których wymaga różny materiał wyjściowy roślinny.

Pożywki używane do kultur są złożone z rozpuszczonych w wodzie soli mineralnych, przeważnie według starej recepty K n o p a, glukozy, substancji wzrostowych i agaru. Poza tym dodaje się do pożywki ślady mikroelementów.

Dla przypomnienia podam recepty pożywek.

Pożywkę Knopa stosuje się w hodowli tkanek w rozcieńczeniu dwukrotnym. Gotowa do użytku przedstawia się następująco:

Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	0,5 g
KNO ₃	0,125 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,125 g
KH ₂ PO ₄	0,125 g
H ₂ O destil.	1000,0 g

Do przyrządzania pożywek nie można używać zwykłej wody destylowanej, gdyż zawiera ślady miedzi. Tkanki *in vitro* są bardzo czułe na te ilości i pod ich działaniem zamierają.

Dlatego trzeba wodę destylować w aparatach sporządzonych ze szkła i przetrzymywać ją również w szkle. We Francji do tych celów używa się szkła firmy Pyrex.

W wyżej przytoczonej pożywce rozpuszczanie soli musi się odbywać w następującej kolejności: azotan wapnia, azotan potasu i siarczan magnezu rozpuszczamy bez przestrzegania jakiegokolwiek ostrożności, po rozpuszczeniu się tych soli dodajemy fosforan jednopotasowy rozmiądzony i mieszamy silnie roztwór, aby uniknąć strącenia się wapnia i magnezu w postaci fosforanów, gdyby powstało miejscowe silniejsze skoncentrowanie roztworu.

Jako dodatek mikroelementów został wypróbowany roztwór według recepty B e r t h e l o t a, a skorygowany przez M o r e l a, który usunął ze składu wapń, a dodał jod. Oto recepta zmodyfikowanego roztworu:

Fe ₂ (SO ₄) ₃ · 9H ₂ O	50,0 g
MnSO ₄ · 7H ₂ O	2,0 „
KJ	0,5 „
NiCl ₂ · 6H ₂ O	0,05 „
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,05 „
5TiO ₂ · SO ₃ · 5H ₂ O	0,2 „
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,1 „
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,05 „
BeSO ₄ · 4H ₂ O	0,1 „
H ₃ BO ₃	0,05 „
H ₂ SO ₄ à 66° Bé	1 ml
H ₂ O destil.	1000,0 ml

Na każde 100 ml roztworu pożywki daje się 1 kroplę wyżej opisanego roztworu.

Do tak sporządzonej pożywki mineralnej dodaje się glukozę w 3 — 5 procentach.

Hormony wzrostowe dodaje się w postaci roztworów. Stężenie tych związków powinno w przybliżeniu być następujące:

uwodniony chlorek cysteiny	10 ⁻⁵
aneuryna	10 ⁻⁶
sól wapniowa kwasu pantotenowego	
inozytol	
biotyna	

(trzy ostatnie związki nie dla wszystkich tkanek są potrzebne. Używa się je w stężeniach 10⁻⁸ — 10⁻⁶).

Poza powyższymi hormonami dodaje się do pożywek heteroauksyny: kwas β-indolooctowy lub kwas α-naftalenoctowy. M o r e l w swych badaniach przekłada kwas α-naftalenoctowy, gdyż jest trwalszy na działanie światła. Heteroauksyny doprowadza się w pożywkę do stężeń 10⁻⁸ — 10⁻⁶.

Aby pożywkę zestalić, dodaje się 1,2 — 1,0% agaru.

Teraz jeszcze trzeba się zapoznać z kolejnością zestawiania pożywki: do roztworu Knopa dodajemy roztwór mikroelementów, potem glukozę, następnie substancje wzrostowe i na końcu agar (dobrze wymoczony i wypłukany w wodzie destylowanej w wyżej opisany sposób). Tak zmieszana całość przygotowujemy. Roztwór otrzymany filtrujemy i rozdzielamy w probówki o 16 cm długości i 3 cm szerokości. Zatykamy watą i sterylizujemy w autoklawie w 110°C przez 20 minut.

Gdy roztwór nie jest alkaliczny, to pożywka znosi takie sterylizowanie bez szkody. Nie należy jednak przekraczać 110°C, gdyż rozłoży się witamina B₁. Inne substancje wzrostowe dodawane do pożywki są termostabilne.

Probówki z pożywką, zatkane korkiem z waty dość twardym, owija się cynfolią w ten sposób, ażeby jak najmniej wody mogło z wnętrza wyparować. Na rozwój tkanek bowiem niekorzystnie działa silniejsza koncentracja związków zawartych w pożywkę.

Gdy już mamy przygotowane pożywki, możemy przystąpić do „szczepienia“ kultur.

Przeniesienie aseptyczne tkanek z organizmów roślinnych do kultury jest najtrudniejszą częścią zadania. Metod generalnych nie ma. Trzeba dostosowywać się każdorazowo do nowego materiału.

M o r e l wypracował następujące metody przeszczepień:

1. Przeszczepianie tkanek z delikatnych łodyg zielnych. Łodygi oczyszczone z liści, łusek, wąsów itp. są cięte na 30 cm kawałki. Odcinki te zanurza się na moment w 96° alkoholu. Kąpiel ta usuwa powłokę woskową z powierzchni łodygi oraz pozwala na łatwe zwilżenie łodygi późniejszymi dezynficiensami oraz zapobiega powstawaniu na powierzchni łodygi pęcherzyków powietrza, gdy zanurzamy ją do płynów. Po kilku sekundach kąpieli w alkoholu, łodygi są bezpośrednio przenoszone do roztworu podchlorynu wapniowego (70 g podchlorynu na litr wody). W tym roztworze pozostają przez pół godziny. Potem wyciąga się je i wyciera sterylizowaną bibułą oraz płucze dwukrotnie w wodzie sterylizowanej. Po tych zabiegach łodyżki wyjęte z wody jeszcze raz płucze się w alkoholu i umieszcza między dwiema bibułami wysterylizowanymi. Pracując pod bibułą, zdziera się skalpelem delikatnie epidermę i jeszcze raz płucze w alkoholu 96°, następnie w wodzie destylowanej i sterylizowanej oraz tnie na kawałeczki do 2 cm długości.

W kulturach zaobserwowano, że rozwija się tylko strona korzeniowa odcinków, a ponieważ bezpośredni kontakt z pożywką przeszkadza w rozwoju,

więc odcinki umieszcza się na pożywce lub w pożywce tak, aby strona korzeniowa odcinków znalazła się u góry.

Przy stosowaniu tej metody Morel uzyskiwał do 90% kultur czystych.

2. Przeszczepianie kambium z roślin drzewiastych. Do pracowni przywozi się świeżo ucięte w terenie odcinki 1 metrowe pni lub grubszych gałęzi. Całe odcinki nim zostaną wniesione do pokoju przeszczepień są dokładnie myte alkoholem. Po wniesieniu do komory przeszczepień ścina się specjalnym nożem o dwu uchwytych, zwanym popolicie strugiem, brązową korowinę aż do żywej kory. Znow zmywa się alkoholem i zdejmuje łyko aż do miazgi (kambium), która zawsze przylega do młodego drewna. Miazgę nacina się sterylnym skalpelem w kwadraty o boku 1 — 2 cm i zdiera je skalpelem lub wysterylizowaną pincetą. Kwadraty zdarłte lokuje się natychmiast na pożywce.

Stosując tę metodę Morel uzyskiwał do 60% czystych kultur.

3. Przeszczepianie drobnych korzonków. Jest trudniejsze, gdyż powierzchnia korzeni jest znacznie silniej pokryta mikroorganizmami, a poza tym bardzo często grzyby lub bakterie znajdują się wewnątrz tkanek korowych.

Korzenie brane do przeszczepień tkanek najpierw delikatnie oskrobuje się z powierzchniowych tkanek, potem zanurza się na około 10 minut do roztworu podchlorynu wapniowego (70 g na litr wody). Po wyjęciu z tej kąpieli oskrobuje się tkanki zabite przez podchloryn razem z grzybami i bakteriami. Znow zanurza się korzenie do podchlorynu wapniowego na 10 minut i płucze się następnie w wodzie sterylizowanej. Wreszcie tnie się korzenie na 1—2 cm długie odcinki i przenosi na pożywkę w podobny sposób, jak to było opisane przy przeszczepianiu łądygi.

Przy tych zabiegach Morel uzyskuje zaledwie do 50% czystych kultur.

4. Przeszczepianie tkanek z raka powodowanego przez *Pseudomonas tumefaciens*. Ponieważ bakterie powodujące raka są rozlokowane blisko powierzchni, więc łatwo się ich pozbyć. Trzeba używać jednak do przeszczepień młode wyrośla, które jeszcze nie popekały, aby uniknąć wewnętrznych zanieczyszczeń różnymi mikroorganizmami. Najlepszy czas zbioru rakowatych wyrosli jest około 2 miesiące po inokulacji rośliny szczepem *Ps. tumefaciens*. Dezynfekcja wyrosli odbywa się identycznie, jak to było opisane dla materiału korzeniowego.

Dla uzupełnienia metod trzeba tu przytoczyć jeszcze sposób pozyskiwania kultur czystych korzeni różnych roślin, czego Morel w swych pracach nie stosował, a sposób ten może przydać się przy badaniach chorób korzeni lub przy badaniach mikotrofizmu.

5. Do celu możemy dojść dwiema drogami. Albo wysiewamy nasiona zdezynfekowane przez zanurzenie w roztworze podchlorynu wapniowego, słabym roztworze sublimatu (1 — 5 promille) lub w 1% roztworze formaldehydu i wypłukane w kilku wodach sterylizowanych na agar lub bibułę w wysterylizowanych szalkach Petriego, a po wykiełkowaniu odcinamy, stosując przepisy aseptyki, końce korzonków, już pozbawionych mikroorganizmów, i przenosimy je na pożywkę; albo bierzemy korzenie od roślin normalnie rosnących w glebie i sterylizujemy je wyżej opisanymi metodami. Łatwiejszy jest sposób sterylnego wysiewu nasion.

Po uzyskaniu rozwoju tkanek *in vitro* w kulturach czystych wyjściowych, powinno się przystąpić do przeszczepiania czystych kultur na nowe pożywki.

Gdy na proliferacjach kalusów pojawiają się takie organy, jak liście, łodyżki lub korzenie, to do przeszczepień nie należy ich używać.

Przeszczepianie odbywa się w ten sposób, że odcinamy kawałek tkanki (nie mniejszy niż 5 mm średnicy), z miejsca najintensywniej proliferującego i przenosimy aseptycznie na nową pożywkę.

Początkowo tkanki *in vitro* rozwijają się bardzo nieregularnie, opornie i powoli, dopiero po pewnej ilości pasazy (przeszczepień) na nowe pożywki „przystosowują” się do nowego trybu życia i mogą już bez zaburzeń żyć w probówkach w nieskończone pokolenia.

Powyżej opisane zabiegi prowadzą do uzyskania kultur, które mogą być użyte do hodowli grzybów pasożytniczych lub wirusów jako pożywka.

Warto przy sposobności przytoczyć opis techniki badań anatomicznych stosowanych przez Morela.

Do utrwalenia tkanek używa on „picroformol” według recepty Bouina:

nasyconego roztworu wodnego kwasu pikrynowego	30 ml
formaliny 40%	10 „
lodowatego kwasu octowego	2 „

W tym utrwalaczu tkanki pozostają 2 doby. Po tym czasie przeniesione są do alkoholu 90° bez poprzedniego płukania. Trzeba jedynie zmienić kilka razy alkohol.

Dalsza technika sporządzania preparatów jest dość dowolna. Można stosować metodę parafinową lub kroić skrawki ręcznie brzytwą. Metoda parafinowa jest korzystna, gdy tkanki są jednolite, natomiast, gdy wykształcone są elementy drewna, wtedy jest korzystniej robić skrawki ręcznie, gdyż brzytwa mikrotomowa wyrywa je, niszcząc właściwy obraz.

Po zapoznaniu z techniką kultur, słów kilka należy się ciekawszym zjawiskom z fizjologii tkanek *in vitro*.

Oprócz przystosowania się tkanek do nowego sposobu życia, co już jest ciekawym objawem fizjologicznym, najbardziej interesująco przedstawia się reakcja ich na różne stężenia heteroauksyn.

Gdy w pożywce znajduje się kwas indolo- lub naftalenoctowy w stężeniu 10^{-8} , to tkanki wcale nie reagują na jego obecność.

W stężeniach trochę większych rozwój kalusów jest przyspieszony. Optimum rozwojowe zachodzi przy stężeniu 10^{-7} .

Stężenie heteroauksyn równe 10^{-6} zaczyna już powodować objawy zatrucia tkanek w postaci początków dezorganizacji. Jest to więc maksymalne stężenie heteroauksyn.

Stężenie heteroauksyn równe 10^{-5} powoduje zupełną dezorganizację tkanek, które zamieniają się na skupienia luźno leżących przejrzystych komórek. Działanie to jest silniejsze przy stosowaniu kwasu β -indoloctowego, niż gdy się stosuje kwas α -naftalenoctowy.

Bez heteroauksyn normalne tkanki roślinne nie mogą się rozwijać *in vitro*. Pod tym względem inaczej zachowują się tkanki przeszczepione z wyrosli rakowatych, powodowanych przez *Pseudomonas tumefaciens*. Tkanki te mogą się

rozwijać w pożywkach nie zawierających heteroauksyn, nie wykazując zahamowania we wzroście.

Reagują dopiero na stężenie 10⁻⁷, wykazując objawy degeneracyjne.

Z powyższego wynika, że tkanki wyrosły rakowatych fizjologicznie są różne od tkanek normalnych rośliny, na której powstały.

Gdy tkanki normalne przez pewien czas są hodowane w pożywkach z heteroauksynami, to również tracą na nie wrażliwość i mogą się bujnie rozwijać na pożywkach bez heteroauksyn.

Można by przypuścić, że tryb życia *in vitro* zamienia tkanki normalne na tkanki analogiczne do rakowatych.

Rzuca to pewne światło na mechanizm powstawania tkanek rakowatych oraz na możliwości zwalczania tych tkanek w drodze zwiększenia w nich zawartości heteroauksyn, aby wywołać dezorganizację i wykruszenie się. Końcowym stadium takiej dezorganizacji jest szybka śmierć komórek. Najtrudniejszym szkopułem jest w tym przypadku zlokalizowanie rozchodzenia się heteroauksyn. A może wystarczą takie stężenia tych hormonów, które nie niszczą tkanek zdrowych, zniszczą tkanki rakowate? Brak badań w tym zakresie.

Umiejętność hodowania tkanek *in vitro* w czystych kulturach dała impuls do zajęcia się kulturami czystymi pasożytów obligatorycznych, które dotychczas nie udawały się, nikomu.

Pierwsze hodowle pasożytów prowadzi W h i t e (1934), hodując wirusa mozaiki tytoniowej, a potem *Pseudomonas tumefaciens* na tkankach tumorowatych (nowotworowych) (1945); przeszczepia on bakterie razem z tkankami wyrosły.

Jednakże właściwe hodowle pasożytów obligatorycznych z myślą o badaniu pasożytów zapoczątkowuje M o r e l (1948).

Udaje mu się hodować *Plasmopara viticola* na tkankach winorośli, *Uncinula necator* na tymże żywicielu oraz wirus mozaiki tytoniowej, wirus X i wirus Y na odpowiednich żywicielach.

Kwestia uzyskania czystych kultur pasożytów obligatorycznych nastęrcza duże trudności, gdyż nie można uzyskać ich oczyszczenia ani przez przeprowadzenie przez żelatynę, ani przez rozcieńczanie, gdyż w sztucznych pożywkach nie rozwijają się w ogóle.

M o r e l w następujący sposób otrzymuje czyste kultury *Plasmopara viticola*: zbiera liście winorośli, na których widoczne są oleiste plamy, jako pierwsze objawy zakażenia mączniakiem rzekomym. Zanurza je gwałtownie do alkoholu 95⁰, a potem bezpośrednio do roztworu podchlorynu wapniowego (70 g na litr wody) na 10 minut. Następnie liście wypłukane w wodzie sterylizowanej wkłada do sterylnych szalek Petriego na zwilżoną bibułę. Po jakimś czasie na takich liściach trzymany w temperaturze 20⁰C, plamy oleiste pokrywają się gęstym nalotem trzonek konidialnych z konidiami. Z tych kultur można już łatwo zebrać sporangia i aseptycznie przenieść na kolonie tkanek *in vitro*, na których przedtem trzeba położyć kropelkę wody sterylizowanej.

M o r e l o w i udało się również uzyskiwać sporangia *Plasmopara* z liści, które już miały na sobie trzonki konidialne. Przy sterylizacji wyżej opisanym sposobem uległy zniszczeniu trzonki konidialne, lecz pozostawała żywa grzybnia, która regenerowała „murawkę“ trzonek.

W podobny sposób udaje się uzyskiwać „murawki“ czyste owocowań *Plasmopara* z młodych, porażonych pędów winorośli.

Sama infekcja tkanek *in vitro* odbywała się w różny sposób. Albo wkładano do wody sterylizowanej sporangia, które po półtorej godzinie wypuszczały zoospory i kroplę takiej wody układano na kolonii tkanek, albo najpierw kładziono kroplę wody sterylizowanej na kolonii tkanek i potem wpuszczano do niej kilka sporangiów.

Przenoszenie sporangiów odbywało się za pomocą ostro złamanej pipetki pasteurowskiej. Na liściu z „murawką“ trzonków konidialnych kładziono kroplę wody sterylizowanej, a potem pipetką strącano do niej sporangia. Wreszcie wciągano w pipetkę troszkę wody ze sporangiami.

Infekcja tkanek winorośli *in vitro* udawała się zawsze. Sporangiofory pojawiały się najpierw w miejscu, gdzie była położona kropla wody, a potem stopniowo na całej kolonii tkanek.

Rozwój *Plasmopara* przebiegał szybciej na tkankach znajdujących się od niedawna na kulturze sztucznej niż na tkankach hodowanych od dawna.

Cechy morfologiczne *Plasmopara* w takiej kulturze odbiegają trochę od jej cech ze środowiska naturalnego. Ponieważ powierzchnia tkanek *in vitro* nie jest pokryta epidermą, a powietrze otaczającego środowiska jest przesycone parą wodną, więc grzybnia wysyła na zewnątrz tkanek strzępki nierozgałęzione, dochodzące do 500 mikronów długości. Poza tym sporangiofory są rozwinięte silniej. Na młodych kalusach dorastają 1 000 mikronów, na starych tylko do 250 mikronów i są mniej rozgałęzione.

Przeszczepianie z takich kultur sztucznych na nowe kalusy można wykonywać w ten sposób, że wycina się kawałeczki starej tkanki pokrytej sporangioforami i przenosi je do kropli wody sterylizowanej, ułożonej na nowym kalusie. Metoda ta jest prostsza i pewniejsza od poprzednio opisanej metody wstępnej.

Przy każdym innym pasożycie trzeba zmieniać szczegóły w metodach jego przenoszenia na kultury tkanek, lecz to są rzeczy drugorzędne, które muszą być dostosowane do biologii rozwoju pasożyta.

Wspomnę tu jeszcze, że próby uzyskania hodowli rdzy (*Uredinales*), prowadzone przez Morela utartym już szlakiem, nie powiodły się.

Nic w tym dziwnego, gdyż z praktyki fitopatologicznej jest wiadome, że rdze nie atakują roślin osłabionych, nienormalnie rozwiniętych, lekko etiolowanych itp. Zatem nie mogły się rozwinąć na tkankach kalusowych *in vitro*, których nawet w naturze nigdy nie atakują.

Przy hodowli wirusów można postępować różnie. Albo wyszczepiać już tkanki zawirusowane, albo szczepić wirusy na gotowe kultury tkanek *in vitro*. Sposób pierwszy jest pewniejszy. Kultury wirusów dobrze się udawały zarówno White'owi jak i Morelowi.

Opisane badania i osiągnięcia Morela są drogowskazem dla fitopatologów, którzy by chcieli zająć się fizjologią pasożytów roślinnych obligatorycznych, dotychczas niedostępną w warunkach sztucznych, gdzie można zjawiska wiązać ściśle z fizyko-chemią.

Metody zapoczątkowane przez Morela muszą być jednak udoskonalone i dostosowane do potrzeb różnych pasożytów, co wymaga licznych prób i doświadczeń.

Na zakończenie muszę jeszcze wrócić do zagadnienia ogólnego hodowli tkanek *in vitro*, aby podać do wiadomości zainteresowanych hodowlą, że dotychczas hodowano tylko niewiele gatunków spośród dwuliściennych. Morel zaś opublikował w 1950 roku pozytywne wyniki z hodowlą roślin jednoliściennych i paprotników.

Byłoby ładnym osiągnięciem, gdyby się powiodło hodowanie czystych kultur tkanek roślin nagozalążkowych, szczególnie zaś sosny pospolitej, gdyż wtedy wiele doświadczeń uprościłoby się i wymagałoby mniejszych kosztów.