

ELWIRA LIS

*Instytut Sadownictwa, Samodzielna Pracownia Izotopowa
Skierniewice*

ROZMNAŻANIE STORCZYKÓW METODĄ KULTUR MERYSTEMÓW PĘDOWYCH

Hodowla merystemów pędowych *in vitro* znalazła szereg praktycznych zastosowań w rolnictwie, przede wszystkim jako metoda masowego rozmnażania storczyków oraz otrzymywania roślin wolnych od szkodliwych wirusów. Otrzymano w ten sposób wolne od wirusów goździki i dalie (Morel, Martin, 1955; Kukułczanka, 1969), ziemniaki (Kassanis, 1957; Manzer, 1959; Nielson, 1960), truskawki (Belkengren i Miller, 1962; Miller i Belkengren, 1963; McGrew, 1965; Vine, 1968), agrest (Jones, Vine, 1968, konopie (Vine, Jones, 1969). Morel (1960) spostrzegł, że storczyki z gatunku *Cymbidium* zainfekowane wirusem zostały go pozbawione w kulturach *in vitro* merystemów tych roślin. Mimo że przy tego typu rozmnażaniu wymienionych roślin otrzymuje się z każdego eksplantatu, tj. jednego merystemu — jedną roślinę, to jednak rośliny pozbawione szkodliwych wirusów można i opłaca się potem szerzej rozmnożyć w normalny sposób.

Zastosowanie hodowli merystemów in vitro do masowego rozmnożenia storczyków

Storczyki są jedną z najliczniejszych rodzin, systematycy wyodrębnili około 30 000 gatunków (Tachtadzjan, 1966). Występują one zwłaszcza w okolicach tropikalnych, ale rosną też w strefie umiarkowanej. Około 600 gatunków uprawianych jest w szklarniach jako rośliny ozdobne z uwagi na ich piękne kwiaty. Dla biologów rośliny te są ciekawe ze względu na wielką zmienność form oraz przystosowania związane z szerokim zasięgiem ich występowania.

Nasiona storczyków są drobnutkie i bardzo liczne, często jednak z wielkiej liczby nasion kiełkuje i rozwija się tylko jedno. Zarodek jest słabo rozwinięty, nie zdyferencjowany na organy, w nasieniu nie ma endospermu. W związku z tym do skielkowania nasion wymagana jest obecność określonych grzybów, których strzępki przenikają do zarodka. Istnieją przypuszczenia, że specyficznym związkami dostarczonym przez grzyby-symbionty są witaminy, ich prekursorzy lub pochodne (Arditti,

1967). Znane są również badania nad asymbiotyczną hodowlą nasion storczyków. Bogatą literaturę na temat hodowli storczyków z nasion dostarcza artykuł przeglądowy Arditti (1967).

Storczyki hodowane są roślinami heterozygotycznymi, a więc rozmnażane z nasion nie powtarzają cech odmiany. Z podziału roślin starszych otrzymać można niewielką ilość roślin w ciągu roku. Dlatego do szybkiego rozmnożenia klonów różnych odmian i hybrydów stosowana jest metoda hodowli merystemów pędowych, dająca pewność uzyskania materiału genetycznie wyrównanego.

W kulturach merystemów storczyków wyizolowany wierzchołek wzrostu tworzy strukturę protokormo-podobną odpowiednik protokormu przy embriogenezie (w literaturze anglosaskiej nazywanej „protocorm-like bodies”). Podział protokormu oraz przeniesienie na świeżą pożywkę powoduje wytwarzanie nowych protokormów, przy czym zabieg ten można powtarzać wielokrotnie. W ten sposób z jednego merystemu uzyskać można w ciągu roku tysiąc do miliona nowych roślin. Właściwość tworzenia protokormu z tkanki merystematycznej mają storczyki o wzroście sympodialnym (Morel, 1960). Należą tu storczyki posiadające pseudobulwy oraz wszystkie z pędami osiagającymi dojrzałość w ciągu jednego okresu wegetacji (Hawkes, 1961). Wymagania pokarmowe różnych gatunków i odmian storczyków w warunkach kultur sterylnych są różne.

Dotychczas opracowano metodę rozmnażania przedstawicieli storczyków z gatunku *Cymbidium* (Morel, 1960, 1966; Wimber, 1963, 1965; Wilfret, 1966; Sagawa, Shoji i Shoji, 1966; Johansen, 1967; Kukułczanka, 1970), *Cattleya* (Reinert, Mohr, 1967; Scully jr., 1967; Lindemann 1967) oraz *Dendrobium* (Morel 1966, Sagawa, Shoji, 1967). Znalezienie optymalnych warunków wzrostu merystemów w kulturach sterylnych, optymalnych pożywek, jak również rozszerzenie hodowli na większą ilość gatunków storczyków jest wciąż zagadnieniem aktualnym, którym zajmują się naukowcy w wielu krajach.

W 1968 r. przebywałam w USA na rocznym stażu naukowym na Wydziale Ogrodniczym Uniwersytetu Kentucky (Department of Horticulture, Agricultural Experimental Station, University of Kentucky, Lexington), gdzie zapoznałam się z badaniami nad rozmnażaniem storczyków w kulturach merystemów, prowadzonymi tam przez prof. dra H. C. Mohra i dra L. P. Stoltza. Opracowaną tam metodę prowadzenia kultur merystemów storczyków z gatunku *Cattleya* opisuję w tym artykule.

Rozmnażanie storczyków z gatunku Cattleya

Z dojrzałych roślin *Cattleya* rosnących w szklarni pobiera się pędy wegetatywne wraz z kłęczami, czyści je z liści i myje wodą bieżącą. Odcińki pędów i kłęczów zawierające pączki boczne sterylizuje się w 0,5%

roztworze chloru przez 10 minut, następnie w 70% etanolu przez 5 minut i wreszcie w roztworze pochlorynu wapnia (80 g/l) przez 20 minut. Merystemy wycina się w sterylnej kamerze. Najpierw z nabrzmiących pąków usuwa się liście okrywające i uwalnia merystem nacinając pęd lub kłącze 1 mm poniżej pąka.

Objętość wyizolowanego stożka wzrostu wynosi zwykle 1—3 mm³. Każdą wyciętą tkankę merystematyczną umieszcza się w 20 ml syntetycznej pożywki płynnej w 125 ml kolbkach erlenmeyera. Skład pożywki przedstawia tabela 1.

Tabela 1
Skład pożywki płynnej stosowanej do
wzrostu eksplantatów merystemów
Cattleya

Składnik	Stężenie w mg l
(NH ₄) ₂ SO ₄	400,0
(CaNO ₃) ₂ ·4H ₂ O	1000,0
KCl	500,0
KH ₂ PO ₄	250,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	400,0
MnSO ₄ ·H ₂ O	7,5
H ₃ BO ₃	0,03
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,03
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,001
Fe ₂ (SO ₄) ₃	10,67
EDTA	22,4
Kwas cytrynowy	150,1
Tiamina-HCl	0,1
Kwas nikotynowy	0,5
Pirydoksyna-HCl	0,5
Glicyna	2,0
IBA (kwas indolomasłowy)	1,75
NAA (kwas naftalenocto- wy)	1,75
Sacharoza	20000,0

Kwasowość pożywki powinna być w granicach pH 4,7—4,9. Kolbki z kulturami umieszcza się na kole obracającym w płaszczyźnie pionowej z szybkością 1 obrót na minutę. Stosuje się 16-godzinne oświetlenie (na dobę) lampami fluorescencyjnymi (o zimnym białym świetle) o intensywności około 2200 lux. Temperaturę pomieszczenia należy utrzymać w zakresie 24—28°C. Eksplantaty przenosi się na świeżą pożywkę co dwa tygodnie. Opisana procedura zgodna jest w zasadzie z przedstawioną w pracy Reinerta i Mohra (1967).

Po jednym do dwóch miesięcy, zależnie od wzrostu eksplantatów, tnie się je na połowy, co powoduje wzrost kalusa barwy zielonej i tworzenie protokormów (protocorm-like bodies). Cięcie protokormów powtarza się przy każdorazowej zmianie pożywki, uzyskując wytwarzanie szeregu nowych protokormów (zwykle 2 do 5) lub dodatkowe tworzenie kalusa, z którego później również formują się protokormy. Pozostawienie nieciętych protokormów prowadzi do wytwarzania liści, rzadziej korzeni.

Jeżeli kultury protokormów prowadzone są przez kilka miesięcy na pożywce o składzie podanym w tabeli 1, to następuje osłabienie wzrostu. Przeniesienie kultur na pożywkę Wimbera (1963), z dodatkiem peptonu w ilości 2 g/l, daje poprawę wzrostu, tj. intensywniejszy wzrost protokormów i kalusa. Skład pożywki Wimbera przedstawiony jest w tabeli 2.

Tabela 2
Skład pożywki Wimbera (1963)

Składnik	Stężenie w mg/l
KNO ₃	525
KH ₂ PO ₄	250
CaHPO ₄ ·2H ₂ O	200
(NH ₄) ₂ SO ₄	500
MgSO ₄	250
Szczawian żelazowy	30
Pepton	2000
Sacharoza	20000

Aby otrzymać rośliny odpowiednie do wysadzenia w szklarni, protokormy wytwarzające liście przenosi się z pożywki płynnej na pożywkę stałą (0,6% agaru) o składzie jak w tabeli 1. Na stałej pożywce występuje wzrost liści i korzeni oraz całych roślin. Lepsze efekty wzrostu roślin uzyskuje się po zmodyfikowaniu składu substancji wzrostowych pożywki przez usunięcie NAA, zmniejszenie ilości IBA do 1 mg/l oraz dodanie kinetyny 1 mg/l i inozytolu 1 mg/l. O ile w pierwszym okresie wzrostu eksplantaty wymagają obecności w pożywce substancji wzrostowych typu auksyn (kwas naftalenoctowy, kwas indolomasłowy), to w późniejszym okresie wzrostu nie są one niezbędne, natomiast szybkie mnożenie protokormów i ich wzrost uzyskuje się na pożywce o wysokiej zawartości związków azotowych i aminokwasów.

Umieszczenie wyizolowanych merystemów *Cattleya* na pożywce agarowej o podobnym składzie jak pożywka płynna powoduje początkowo zmianę ich koloru na ciemnobrązową i później zamieranie. Natomiast już po 3 tygodniach wzrostu w pożywce płynnej eksplantaty mogą być prze-

niesione na pożywkę stałą, agarową. Początkowo występuje w tych warunkach spowolnienie wzrostu, obserwuje się też brązowienie tkanek kontaktujących z pożywką oraz dyfuzję do agaru substancji o barwie brązowej (związków fenolowych), jednak po 2 tygodniach następuje wznowienie wzrostu (Reinter, Mohr, 1967).

Szybszy wzrost protokormów na mieszanej pożywce płynnej wytłumaczyć można dostępnością składników pokarmowych omywających tkankę oraz rozcieńczeniem substancji toksycznych wydalanych do pożywki, jak również lepszymi warunkami przewietrzania. Ten ostatni czynnik jest szczególnie ważny przy większej masie tkanki w kolbkach, dlatego wskazane jest używanie korków z waty. Przy ograniczonej wymianie powietrza spowodowanej np. użyciem nakrętek ebonitowych, następuje zamieranie tkanek.

Ogólnie czas wyhodowania rośliny z merystemu storczyka obejmuje okres hodowli na mieszanej pożywce płynnej, trwający od 1 do 2 miesięcy i hodowli na pożywce stałej, wynoszący zwykle od 1 do 4 miesięcy. Uformowane w tych warunkach rośliny gotowe są do wysadzenia w szklarni. Chcąc uzyskać wielką ilość roślin, przedłużyć należy okres hodowli na pożywce płynnej, tj. okres mnożenia protokormów *Cattleya*.

Warto zwrócić uwagę, iż różni autorzy stosują dosyć różne receptury pożywek w kulturach *Cattleya*. I tak np. według Reinerta i Mohra (1967) mleko kokosowe dodane do pożywki płynnej o składzie jak w tabeli 1 powodowało zamieranie kultur *Cattleya*. W badaniach innych autorów (Scully, 1967; Lindemann, 1967) mleko kokosowe działało jako stymulator wzrostu.

Lindemann (1967), dobierając odpowiednio niskie stężenie kwasu gibberelinowego (GA) i średnie NAA, uzyskał stymulację wzrostu kalusa i opóźnienie rozwoju pędów w kulturach (*Cattleya*).

Rozwój eksplantatów rozpoczyna się dopiero po pewnym czasie od umieszczenia w pożywce płynnej, np. dla pączków z jednego pędu wegetatywnego *Cattleya* czas ten wahał się od 45 do 83 dni (Scully, 1967). Wymaganie płynnej pożywki mieszanej do zapoczątkowania wzrostu merystemów jest właściwe roślinom z gatunku *Cattleya*, gdyż merystemy *Cymbidium* i *Dendrobium* mogą być hodowane również na pożywce agarowej (Sagawa i Shoji, 1967). Być może odgrywa tu rolę endogenny inhibitor, właściwy gatunkowi *Cattleya*, który ulega wymyciu w kulturach płynnych.

Cięcie protokormów może decydować o wydajności ich rozmnożenia. Sagawa i Shoji (1967) podają, że u *Dendrobium* cięcie protokormów, które jeszcze nie wytworzyły liści, pozwala uzyskać więcej nowych protokormów. Istotny również wydaje się być sposób cięcia. Wspomniani wyżej autorzy tnąc poprzecznie protokormy *Dendrobium*

otrzymali większą produkcję (10—20) nowych protokormów w porównaniu z ciętymi wzdłuż osi wzrostu. Kukułczanka (1970) zaobserwowała, że protokorm *Cymbidium* nacinany 1-2-krotnie tworzy około 20 nowych protokormów.

Podsumowanie

Merystemy storczyków hodowane w kulturach sterylnych wytwarzają protokormy, które można dzielić prawie w nieskończoność. Z każdego protokormu otrzymuje się w kulturach *in vitro* całą roślinę odpowiednią do wysadzenia w szklarni. Wydajność tej metody rozmnażania jest bardzo wysoka. O ile przez podział roślin *Cattleya* uzyskać można w ciągu roku 10—15 roślin, to w kulturach merystemów aż 3 tysiące roślin. Johansen podaje, że z pojedynczego merystemu *Cymbidium* można otrzymać tą metodą 2—4 miliony roślin (1967).

Wymagania pokarmowe kultur merystemów storczyków nie różnią się zasadniczo od wymagań tkanek innych roślin hodowanych *in vitro*.

Opanowanie i posługiwanie się metodą kultur merystemów storczyków w Polsce umożliwi rozpowszechnienie uprawy tych roślin cenniejszych dla ich walorów dekoracyjnych. Badania na ten temat prowadzone są w Ogrodzie Botanicznym we Wrocławiu od dwóch lat (Kukułczanka 1970).

LITERATURA

1. Arditti J.: 1967. Niacin biosynthesis of germinating *Laeliocattleya* orchid embryos and young seedlings. *Amer. J. Bot.* 54, 3, 291-8.
2. Arditti J.: 1967. Factors affecting the germination of orchid seeds. *Bot. rev.* 33, 1, 1—97.
3. Belkengren R. O., P. W. Miller: 1962. Culture of apical meristems of *Fragaria vesca*, strawberry plants as a method of excluding latent A virus. *Plant Disease Report.* 46, 119—121.
4. Hawkes A. D.: 1961. *Orchids, their botany and culture.* New York, 1961.
5. Johansen M. B.: 1967. Meristem forming of orkideer. *Horticultura.* 10, 163—7.
6. Jones O. P., Vine S. J.: 1968. The culture of goosberry shoot tips for eliminating virus. *J. hort. Sci.* 43, 289—92.
7. Kassanis B.: 1957. The use of tissue cultures to produce virusfree clones from infected potato varieties. *Ann. Applied Biol.* 45, 422—7.
8. Kukułczanka K.: 1969 Sadzonki goździków wolne od wirusów. *Owoce, warzywa, kwiaty.* 7, 12—14.
9. Kukułczanka K.: 1970. Rozmnażanie storczyków z tkanek merystematycznych. *Ogrodnictwo.* 1, 18—22.
10. Lindemann E. G. P.: 1967. Growth requirements for meristem culture of *Cattleya*. *Diss. Abstr. Sect. B.* 28, 2284—5.
11. Manzer F. E.: 1959. Potato meristem culture and virus X. *Amer. Potato Jour.* 36, 191—5.

12. Mc Grew J. R.: 1965. Eradication of latent C virus in the suwannee variety of strawberry by heat plus excised runner-tip culture. *Phytopatology*. 55, 480—1.
13. Miller P. W., Belkengren' R. O.: 1963. Elimination of yellow edge crinkle and veinbanding viruses and certain other virus C complex from strawberry by excision and culturing of apical meristems, *Plant Dis. Repts.* 47, 298—300.
14. Morel G. M., Martin C.: 1955. Guerison des plantes atteintes de maladies a virus, par culture de meristem apicaux. Report of XIV Intern. Hort. Cong., Netherlands. s. 303—310.
15. Morel G. M.: 1960. Producing Virus-free *Cymbidiums*. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 29,7, 495—7.
16. Morel G. M.: 1965. Eine neue Methode erbgleicher Vermehrung: Die Kultur von Triebspitzen-Meristemen, *Die Orchidee*. 16,3. 165—176.
17. Morel G. M.: 1966. Clonal propagation of orchids by Meristem culture. *Cymbidium Soc. News*. 20,7. 3—11.
18. Nielson L. W.: 1960. Elimination of internal cork virus by culturing apical meristems of infected sweet potatoes. *Phytopath.* 59, 840—841.
19. Reinert R. A., Mohr H. C.: 1967. Propagation of *Cattleya* by tissue culture of lateral bud meristems. *Proceedinf of the Amer. Soc. Hort. Sci.* 91, 664—671.
20. Sagawa Y., Shoji T.: 1966. Clonal propagation of *Cymbidiums* through shoot meristem culture *Amer. Orchid. Soc. Bul.* 35, 118—122.
21. Sagawa Y., Shoji T.: 1967. Clonal progation of *Dendrobiums* through shoot meristem culture. *Amer. Orchid. Soc. Bul.* 856—9.
22. Scull R. M., Jr.: 1967. Aspects of meristem culture in *Cattleya* aliance. *Amer. Orchid. Soc. Bul.* 36, 103—108.
23. Stoltz L. P.: 1968. Dane nieopublikowane.
24. Tachtadžjan A. L.: 1966. Sistema i filogenija cvetkovykh rastenij. Nauka Moskwa—Leningrad. 1966.
25. Vine S. J.: 1968. Improved culture of apical tissues for production of virus-free strawberries. *J. Hort. Sci.* 43, 293—7.
26. Vine S. J., Jones O. P.: 1969. The culture of shoot tips of hop (*Humulus lupulus* L.) to eliminate viruses. *J. Hort. Sci.* 44, 281—4.
27. Wilfret G. J.: 1966. Formation of protocorm — like bodies on excised *Cymbidium* shoot tips. *Amer. Orchid. Soc. Bull.* 35, 10, 823—7.
28. Wimber D. E.: 1963. Clonal multiplication of *Cymbidium* through tissue culture of the shoot meristem. *Amer. Orchid. Soc. Bull.* 32, 105—107.
29. Wimber D. E.: 1965. Additional observations on clonal multiplication of *Cymbidium* Through culture of shoot meristemes. *Cymbidium Soc. News*. 20, 4. 7—10.