

Katedra Roślin Ozdobnych i Architektury Krajobrazu, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
ul. Głęboka 28, 20-612 Lublin  
e-mail: marzena.parzymies@up.lublin.pl

PAWEŁ SZOT, MARZENA PARZYMIES, MONIKA PONIEWOZIK

### **Rozmnażanie storczyków w kulturach tkankowych**

Propagation of orchids in tissue cultures

**Streszczenie.** Storczyki to jedne z najważniejszych roślin ozdobnych. W związku z ogromną liczbą gatunków i odmian storczyków, z których większość nie może być rozmnażana generatywnie, rośliny te są rozmnażane także wegetatywnie. Jedną z metod wykorzystywaną powszechnie jest rozmnażanie *in vitro*. W pracy przedstawiono istniejący stan wiedzy na temat kiełkowania nasion w warunkach *in vitro* oraz mikrorozmnażania storczyków, z uwzględnieniem najbardziej znaczących wyników badań.

**Słowa kluczowe:** mikrorozmnażanie, PLB, protokormy, orchidea, kalus, nasiona

#### WSTĘP

Storczyki to ogromna grupa roślin ozdobnych, które stanowią cenny materiał wykorzystywany we florystyce oraz do dekoracji wnętrz, głównie jako rośliny doniczkowe. Nieliczne gatunki botaniczne mogą być z powodzeniem uprawiane w ogrodzie. Storczyki są obecnie jednymi z najważniejszych gatunków na światowych rynkach roślin ozdobnych, a w Europie stanowią jedną z głównych gałęzi produkcji roślin ozdobnych [Wróblewska i Rudzki 2012]. Orchidee znalazły się w grupie 10 najbardziej pożądanых roślin uprawianych na kwiat cięty [Fakouri Ghaziani i in. 2014]. Światowa uprawa tych roślin wynosi 8% całej produkcji roślin ozdobnych [Asgar i in. 2011]. Do tej grupy roślin zaliczanych jest około 800 rodzajów i 25 000 gatunków [Fakouri Ghaziani i in. 2014]. Popyt na storczyki jest tak duży, że rozmnażanie metodami tradycyjnymi nie wystarcza na pokrycie zapotrzebowania rynku. Rozmnażanie generatywne jest bardzo powolne i powoduje powstawanie roślin heterozygotycznych. Intensywne prace badawcze sprawiły, że obecnie duże znaczenie w produkcji sadzonek zyskało rozmnażanie w kulturach tkankowych, prowadzone w celu wyprodukowania w jak najkrótszym czasie jak największej liczby roślin potomnych jednorodnych genetycznie, o wysokiej jakości i przy minimalnych nakładach finansowych [Asgar i in. 2011, Wróblewska i Rudzki 2012, Balilashaki i in. 2014]. Dzięki licznym pracom badawczym możliwe jest rozmnażanie *in vitro* wielu gatunków storczyków [Collins i Dixon 1992], ponadto stworzono liczne procedury techniczne i wprowadzono patenty dotyczące mikrorozmnażania tych roślin.

Poza rozmnażaniem storczyków w celach komercyjnych mikrorozmnażanie wykorzystywane jest także w celu zachowania różnorodności biologicznej oraz ochrony rzadkich i zagrożonych gatunków [Fakouri Ghaziani i in. 2014]. W naturalnych warunkach cykl rozwojowy rzadkich gatunków storczyków, tj. *Cypripedium calceolus*, *Dactylorhiza majalis*, *Epipactis atrorubens*, *Epipactis palustris* oraz *Orchis morio*, trwa ok. 5–10 lat do momentu kwitnienia i następnie tworzenia nasion [Zaniecka i Łojkowska 2004], dlatego też w wielu przypadkach rozmnażanie *in vitro* jest o wiele szybsze. Co ważniejsze, nowe rośliny uzyskane tą metodą mogą posłużyć do zasilenia naturalnych populacji rzadkich i zagrożonych gatunków. W przypadku rozmnażania orchidei metodami *in vitro* nie ma zagrożenia dla roślin matecznych, ponieważ pobieranie eksplantatów odbywa się w sposób nieinwazyjny [Collins i Dixon 1992]. Collins i Dixon [1992] dowiedli, iż zagrożony gatunek *Diuris longifolia*, występujący w zachodniej Australii, można rozmnażać w warunkach *in vitro* za pomocą kultur tkankowych uzyskanych z pędów kwiatostanowych, a Pindel i Pindel [2004] rozmnażali zagrożone europejskie gatunki storczyków, inicjując kultury tkankowe przy użyciu nasion.

Techniki *in vitro* umożliwiają szybkie masowe namnażanie cennych gatunków i odmian storczyków, a także hodowlę i wprowadzanie na rynek nowych genotypów.

#### ROZMNAŻANIE ZA POMOCĄ NASION W WARUNKACH *IN VITRO*

Rozmnażanie orchidei w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem nasion jest szczególnie polecane w przypadku rzadkich i zagrożonych gatunków, gdyż nie powoduje uszkodzenia rośliny matecznej. Liczne badania potwierdzają skuteczność tej metody u takich roślin, jak: *Cymbidium giganteum* [Hossain i in. 2010], *Catasetum fimbriatum*, *Cyrtopodium paranaensis* [Valle Rego-Oliveira i Faria 2005], *Dactylorhiza hatagiera* [Warghat i in. 2014], *Oncidium* [Kalimuthu i in. 2007] oraz zagrożonego gatunku *Laelia speciosa* [Avila-Diaz i in. 2009]. Tonecki i Dobrzyński [2008] zakładali kultury *Platanthera bifolia*, wysiewając niedojrzałe nasiona, a Kumar i in. [2002] zainicjowali kultury *Cymbidium elegans* i *Rhynchostylis retusa* z wykorzystaniem ich zielonych torebek nasiennych. Pindel i Pindel [2004] do rozmnażania zagrożonych europejskich gatunków: *Cypripedium calceolus*, *Dactylorhiza maculata*, *Epipactis helleborine*, *Goodyera repens* i *Gymnadenia conopsea* wykorzystali fragmenty zielonych torebek nasiennych i niedojrzałych zalążni, z których uzyskali kultury protokomopodobne. Ponadto Murdad i in. [2006] oraz Niknejad i in. [2011] dowiedli, że z nasion *Phalaenopsis gigantea* z powodzeniem można uzyskiwać protokormy.

Warty podkreślenia jest fakt, iż nasiona storczyków są bezbielmowe, mają ograniczone zasoby lipidów i tłuszczu, co sprawia, że bardzo trudno kiełkują [Niknejad i in. 2011, Fakouhri Ghaziani i in. 2014].

Początkowo storczyki rozmnażano metodą symbiotycznego wysiewu nasion, umieszczanych na pożywkach, w których znajdowały się strzępki grzyba. Dwie ważne prace dotyczące grzybów żyjących w symbiozie ze storczykami zostały opublikowane w 1909 roku, jedna autorstwa Bernarda (*L'évolution dans la symbiose, les orchidees et leur champignons commensaux*), druga – Burgeffa (*Die Wurzelpilze der Orchideen, ihre Kultur und ihr Leben in der Pflanze*) [Yam i Arditti 2009]. Hans Edmund Nikola Burgeff opracował metody izolowania i hodowli endofitów oraz symbiotycznego kiełkowania

storczyków [Burgeff 1911 – za: Yam i Arditti 2009]. Sądził on, że endofity występujące na storczykach to odrębna grupa grzybów, które nazwał *Orcheomyces*. W późniejszych badaniach okazało się, że jego teoria była błędna. Co ważniejsze, Burgeff twierdził też, że istnieje głęboka zależność między storczykami i grzybami, co zostało potwierdzone przez wielu autorów. Szczególnie istotna była tu symbioza korzeni tych roślin z grzybami z rodzaju *Rhizoctonia* sp., które powodowały scukrzanie skrobi i zmiany w odczynie środowiska [Knudson 1922]. Warto zwrócić uwagę na fakt, że obecnie wiele rzadkich gatunków storczyków zagrożonych jest wyginięciem i metoda symbiotycznego wysiewu z wykorzystaniem grzybów *Rhizoctonia* sp. może mieć ogromne znaczenie w ich mikrorozmnażaniu.

Obecnie znanych jest kilka technik izolacji i namnażania grzybów *Rhizoctonia* sp. Wu i in. [2010] izolowali je z *Cymbidium goeringii* poprzez zmiżdżenie na szalkach Petriego odkażonych fragmentów korzeni długości 5–6 mm, a następnie namnażali te grzyby na podłożu z agaru z dekstrozy ziemniaczanej (PDA) (20 ml). Nontachaiyapoom i in. [2010] pozyskiwali grzyby ze storczyków: *Paphiopedilum*, *Dendrobium* i *Cymbidium* poprzez usunięcie welamenu i ścięcie pod mikroskopem środkowej części korzenia, na której występuje grzybnia; następnie umieszczali tak uzyskane eksplantaty na podłożu PDA.

Bernard prowadził też próby kiełkowania nasion z użyciem sproszkowanych bulw storczyka oraz cukru [Bernard 1903, 1904 – za: Yam i Arditti 2009]. Mimo niepowodzeń w uzyskaniu siewek orchidei były to pierwsze badania dotyczące asymbiotycznego kiełkowania nasion storczyków. Także Burgeff przeprowadził doświadczenia nad kiełkowaniem nasion bez udziału grzybów [Burgeff 1959 – za: Yam i Arditti 2009]. Wyniki obu autorów wykorzystał później Knudson [1922], który opracował metodę asymbiotycznego wysiewu nasion, do dziś szeroko stosowaną. Udowodnił tym samym, że *Laelia* i *Cattleya* mogą być rozmnażane bez obecności grzybów w pożywce. To właśnie on wykazał, że kiełkowanie nasion nie odbywa się na skutek obecności grzyba, a jedynie dzięki wydzielanym przez niego do podłoża pewnym substancjom związanym z rozkładem skrobi. Tym samym udowodnił, że grzyby mogą być zastąpione cukrami. W swoich pracach stwierdził, że lepsza od glukozy jest fruktoza. Odkrycie to w znaczący sposób ułatwiło rozmnażanie orchidei w warunkach *in vitro*. Dzięki tej metodzie nie ma konieczności izolowania grzybów mikoryzowych oraz dobierania odpowiednich szczepów do danego gatunku storczyka.

Kluczowym zabiegiem, który decyduje o możliwości inicjacji i prowadzenia kultury, jest odkażanie nasion. W zależności od gatunku storczyków autorzy w różny sposób przeprowadzali zabieg dezynfekcji. Jedną z metod było zanurzenie torebek nasiennych i załóżni w 70% roztworze etanolu, a następnie przez 5 min w 0,1% chlorku rtęci [Pindel i Pindel 2004]. Kumar i in. [2002] zielone torebki nasienne *Cymbidium elegans* i *Rhynchostylis retusa* poddawali odkażaniu poprzez zanurzenie w 80% alkoholu z dodatkiem Tween 80, a następnie na 10 s umieszczali je pod lampą UV. Natomiast Warghat i in. [2014] najpierw umieszczali nasiona w 100% roztworze etanolu na 5 min, a następnie na 15–20 min w roztworze podchlorynu sodu o stężeniu 0,1%. Podchlorynu sodu w stężeniu 1,5% przez 15 min używali też Valle Rego-Oliveira i Faria [2005], a Udomdee i in. [2012] odkażali nasiona *Paphiopedilum* 0,6% roztworem NaOCl przez 10 min. Kalimuthu i in. [2007] przeprowadzili zabieg odkażania powierzchniowego torebek nasiennych *Oncidium*, zanurzając je najpierw w 5% roztworze podchlorynu sodu, a następnie w 70% roztworze etanolu i podpalając. Zaniecka i Łojkowska [2004] dezynfekowały torebki

*Cypripedium calceolus*, *Dactylorhiza majalis*, *Epipactis atrorubens*, *Epipactis palustris* oraz *Orchis morio* poprzez umieszczenie ich w 5% roztworze podchlorynu wapnia ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ), a potem w 70% etanolu. Następnie rozcinały torebki nasienne, a uzyskane nasiona, po zapakowaniu w torebki filtracyjne, zanurzały na ok. 15 min w  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ . Tonecki i Dobrzyński [2008] wykonywali zabieg odkażania nasieniaków *Platanthera bifolia*, umieszczając je na 15 s w 70% alkoholu etylowym, a w kolejnym etapie na ok. 20 min w 3% roztworze chloraminy T. U *Cymbidium giganteum* wykonano dezynfekcję przy użyciu 0,04% Bevistinu i siarczanu streptomycyny, a następnie traktowano nasiona 0,01%  $\text{HgCl}_2$  z dodatkiem detergentu Teepool 10% przez 10 min i zanurzano w 70% roztworze etanolu [Hossain i in. 2010]. U *Laelia speciosa* korzystne okazało się zastosowanie przez 5 min 70% roztworu etanolu, a następnie przez 5 min 3% nadtlenu wodoru i umieszczanie torebek w 1,2% podchlorynie sodu na ok. 15–20 min. Ostatnim etapem było przemycie materiału wodą destylowaną i zanurzenie w 93% etanolu oraz podpalenie [Avila-Diaz i in. 2009]. Pacek-Bieniek i in. [2010] dezynfekowali torebki nasienne *Zygostates grandiflora* wyłącznie w 0,4%  $\text{NaOCl}$ .

Czynnikiem, który często decyduje o przebiegu rozmnażania w kulturach tkankowych, jest skład pożywki. W przypadku *Dactylorhiza hatagiera* maksymalną zdolność kiełkowania nasion uzyskano na podłożu Lindeman [Warghat i in. 2014]. Pożywkę MS stosowali Pindel i Pindel [2004] do namnażania rzadkich europejskich gatunków storczyków. Używano jej też do zakładania kultury zagrożonego gatunku – *Laelia speciosa* [Avila-Diaz i in. 2009], *Cymbidium elegans* i *Rhynchostylis retusa* [Kumar i in. 2002] oraz *Oncidium* [Kalimuthu i in. 2007]. Także u *Catasetum fimbriatum* i *Cyrtopodium paranaensis* najlepsze wyniki osiągnięto na pożywce MS oraz ½ MS, na której uzyskano najlepiej wykształcony system korzeniowy [Valle Rego-Oliveira i Faria 2005]. Nasiona *Cymbidium giganteum* najlepiej kiełkowały, a tym samym dostarczały sadzonek o wysokiej jakości, na pożywce PM [Hossain i in. 2010]. Pożywki do kiełkowania storczyków najczęściej zestalane były agarem. Do asymbiotycznego wysiewu *Oncidium* podłoże zestalono agarem w ilości  $0,8 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  [Kumar i in. 2002, Kalimuthu i in. 2007], podczas gdy Valle Rego-Oliveira i Faria [2005] używali agaru w ilości  $6 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ , a Pacek-Bieniek i in. [2010] –  $7 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Nasiona *Paphiopedilum* wysiewano na pożywki uzupełnione agarem Sigma w ilości  $5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  podłoża oraz wzbogacone dodatkami organicznymi, tj. ekstraktem z ziemniaka ( $50 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) oraz z banana ( $25 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) [Udomdee i in. 2012]. Natomiast nasiona *Cymbidium elegans* lepiej i szybciej kiełkowały na podłożach zestalonych Phytagelem w ilości  $0,25 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  pożywki [Kumar i in. 2002].

O możliwości wykształcenia siewek w warunkach *in vitro* niejednokrotnie decyduje zawartość regulatorów wzrostu w pożywce. W przypadku *Laelia speciosa* największy procent skiełkowanych nasion oraz siewki o dużym wigorze uzyskiwano na podłożu uzupełnionym sacharozą w ilości  $30 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  oraz NAA w ilości  $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  i  $\text{GA}_3$  w ilości  $0,1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  podłoża. Zastosowanie gibereliny miało znaczny wpływ na wzrost elongacyjny siewek [Avila-Diaz i in. 2009]. Także u *Comparettia falcata* zaobserwowano, że  $\text{GA}_3$  zwiększyło procent skiełkowanych nasion oraz pozytywnie wpłynęło na rozwój roślin, natomiast w obecności NAA nastąpiło znaczne pogorszenie kiełkowania [Pedroza-Manrique i in. 2005]. Także Kumar i in. [2002] podają, że uzupełnienie podłoża regulatorami wzrostu z grupy auksyn i cytokinin korzystnie wpływa na kiełkowanie nasion *Cymbidium elegans* i *Rhynchostylis retusa*. Najkorzystniejsze efekty osiągnięto, wzbogacając podłoże MS regulatorami BAP ( $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) i NAA ( $0,1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ).

U *Oncidium* intensywny rozwój siewek osiągnięto poprzez zastosowanie BAP w ilości  $2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  podłoża [Kalimuthu i in. 2007]. Wzbogacenie pożywki z IBA w ilości  $3 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  kinetyną w ilości  $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  przyczyniło się do zwiększenia ilości pędów *Dactylorhiza hatagiera*, ich wydłużenia, a ponadto wpłynęło na zwiększenie liczby i długości korzeni [Warghat i in. 2014]. W badaniach Pacek-Bieniek i in. [2010] stwierdzono, że pojawienie się pierwszego liścia oraz korzenia z nasion *Zygostates grandiflora* przyspieszane jest przez dodanie do pożywki węgla aktywnego w ilości  $1\text{--}3 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Zaobserwowano, że wraz ze wzrostem stężenia węgla zwiększała się powierzchnia pierwszego liścia i długość pierwszego korzenia.

Tonecki i Dobrzyński [2008] stwierdzili, że obecność kwasu cytrynowego w stężeniu  $200 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  zapobiegała zamieraniu protokormów powstałych z nasion *Platanthera bifolia* oraz umożliwiła prawidłowy rozwój siewek. Natomiast Kumar i in. [2002] zaobserwowali, że zastosowanie hydrolizatu kazeiny o stężeniu  $2 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  zwiększyło liczbę wykiełkowanych siewek oraz skróciło czas kiełkowania nasion *Cymbidium elegans* i *Rhynchostylis retusa*. Zaniecka i Łojkowska [2004] podają, że wiele gatunków storczyków występuje naturalnie na glebach ubogich w azot organiczny, a wzbogacenie podłoża w kulturach *in vitro* w azotany i azot amonowy powoduje poprawę kiełkowania nasion m.in. *Cypripedium calceolus*, *Dactylorhiza majalis* i *Epipactis palustris*.

Czynniki fizyczne także mają wpływ na kiełkowanie nasion w kulturach tkankowych. Tonecki i Dobrzyński [2008] wykazali, że istotny wpływ na kiełkowanie nasion storczyków ma światło. Nasiona *Platanthera bifolia* przetrzymywane w świetle nie były zdolne do dalszego wzrostu i rozwoju. Aby zwiększyć procent kiełkowania, nasiona umieszczano w ciemności na 12 tygodni w temperaturze  $4^{\circ}\text{C}$ . Zettler i McInnis [1994] wykazali, że nasiona *Platanthera integrilabia* najlepiej kiełkowały, gdy umieszczano je na 7 dni w świetle, przy fotoperiodzie 16 h – dzień / 8 h – noc, a następnie przez 7 dni przetrzymywane były w ciemności. Ponadto taki sposób postępowania zapewnił lepszy rozwój nowych roślin z protokormów, które zostały wzmocnione przez pierwotne działanie światła. W przypadku *Dactylorhiza majalis* oświetlenie kultury po 16 h przez 10–14 dni zwiększyło procent skiełkowanych nasion z 40 do 75 [Rasmussen i in. 1990].

Zaniecka i Łojkowska [2004] stwierdziły, że na kiełkowanie ma wpływ także czas, jaki upłynął od kwitnienia do zbioru nasion. U *Cypripedium calceolus* oraz *Dactylorhiza majalis* najlepsze efekty osiągnięto na podłożu T849 oraz na podłożu o 1/5 składu MS (tzw. modyfikacja Wetsteyn) z nasion zebranych 50 dni po kwitnieniu, a u *Epipactis palustris* – 35 dni po kwitnieniu. Tonecki i Dobrzyński [2008] najlepsze rezultaty uzyskali z nasion *Platanthera bifolia* zebranych 3 tygodnie przed ich dojrzaniem. Ponadto stwierdzili, że zdolność kiełkowania znacznie spada wraz ze stopniem dojrzałości nasion.

#### KULTURY PROTOKORMÓW

Protokorm jest strukturą charakterystyczną tylko dla roślin z rodziny *Orchidaceae*. Są to grupy niezróżnicowanych komórek miękiszowych powstających podczas kiełkowania nasion. Protokormy są kolejnym stadium rozwoju zarodka składającego się z komórek merystematycznych, w których nie można wyodrębnić stożka wzrostu i korzeni [Oszkinis 1991].

U *Dactylorhiza hatagiera* protokorm obserwowano po 3 tyg. od inicjacji kultury na pożywce Lindemann [Warghat i in. 2014], natomiast Murdad i in. [2006] u *Phalaenopsis gigantea* używali podłoża XER zestalonego agarem Sigma w ilości  $1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ , na którym po 14 dniach uzyskiwali protokorm. Kalimuthu i in. [2007] uzyskiwali wyżej opisane struktury u *Oncidium* na pożywce MS zestalonej agarem w ilości  $0,8 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ , natomiast Hossain [2008] zaobserwował na pożywce Mitra intensywne kiełkowanie nasion *Epidendrum ibaguense*, na poziomie 80%, a tym samym wytwarzanie protokormu. Hossain i in. [2010] stwierdzili intensywny wzrost protokormu na skutek wzbogacenia podłoża peptonem w stężeniu  $2 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

U *Dendrobium nobile* zaobserwowano, że na proliferację protokormów wpływał Triacantanol (TRIA). Autorzy uzyskali pozytywne efekty w wyniku wzbogacenia pożywki tym składnikiem w ilości od  $0,9$  do  $3 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Niższe lub wyższe stężenia powodowały brązowienie eksplantatów. Najwyższy odsetek protokormów zaobserwowano przy zawartości TRIA w ilości  $1,7 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  [Malabadi i in. 2004].

Jako dodatek do pożywek, który powoduje intensywne namnażanie i dzielenie się komórek, można zastosować wodę kokosową (CW). Potwierdzają to badania Murdad i in. [2006], którzy wzbogacili podłoże wodą kokosową (15%) i aktywnym węglem (AC) w stężeniu  $2,5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Także Hossain i in. [2010] dowiedli, że u *Cymbidium giganteum* następuje zwiększona indukcja protokormów, a u *Epidendrum ibaguense* uzyskano te struktury o znacznie większym rozmiarze [Hossain 2008] na skutek uzupełnienia pożywki aktywowanym węglem w ilości  $2 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

#### KULTURY ORGANÓW ROŚLINNYCH

Za odkrywcę metody mikrorozmnażania storczyków uznawany jest profesor Georges Morel, który jako pierwszy uzyskał kultury storczyka z wierzchołków pędu w roku 1960. Tak naprawdę storczyki po raz pierwszy zostały rozmnożone *in vitro* przez dr. Gavino Rotorę w 1949 roku, natomiast Hans Thomale jako pierwszy zainicjował kultury orchidei z wierzchołków pędu w roku 1956. Rotor założył kultury *Phalaenopsis* z pędów kwiatostanowych, które wykładał na pożywkę Knudsona C, przeznaczoną do asymbiotycznego kiełkowania nasion tego storczyka [Yam i Arditti 2009].

Do zapoczątkowania kultur tkankowych storczyków mogą być wykorzystane różne organy, np. pąki boczne, fragmenty pędów, pąków kwiatostanowych, liści. Pąki boczne zostały wykorzystane do inicjacji kultur takich gatunków, jak: *Dendrobium nobile* [Asghar i in. 2011], *Dendrobium longicornu* [Dohling i in. 2012], *Geoderum purpureum* [Mohapatra i Rout 2005]. Udomdee i in. [2012] stwierdzili, że rozmnażanie *Paphiopedilum* sp. za pomocą pąków pachwinowych jest mało wydajne i opracowali procedurę rozmnażania sabotków na skalę produkcyjną z zastosowaniem nacinania pędów, co, jak wykazali, ma korzystny wpływ na intensywność mikrorozmnażania. Dowiedli, iż najwięcej nowych, żywotnych pędów rozwijało się na pędach nacinanych pionowo. Z kolei Malabadi i in. [2004] do inicjacji kultury *Dendrobium nobile* używali eksplantatów pobranych z wierzchołkowych części pędu, podobnie jak Roy i Banerjee [2003], którzy wykorzystali je do namnażania *Dendrobium fimbriatum* var. *oculatum*, a Geetha i Shetty [2000] oraz Giridhar i Ravishabkar [2003] – *Vanilla planifolia*. Takie storczyki, jak: *Paphiopedilum* sp. [Chang i in. 2005], *Vanilla planifolia* [Geetha i Shetty 2000,

Giridhar i Ravishabkar 2003], *Dendrobium macrostachyum* [Pyati i in. 2002] oraz *Dendrobium chrysanthum* [Hajong i in. 2013], można rozmnażać *in vitro* za pomocą fragmentów pędów z węzłami. U *Phalaenopsis amabilis* 'Cool Breeze' zadowolające efekty uzyskano, inicjując kultury z węzłów pędów kwiatostanowych [Balilashaki i in. 2014]. U storczyków z rodzaju *Phalaenopsis* korzystne okazało się zastosowanie fragmentów pędów z pąkami [Kosir i in. 2004] oraz pąków śpiących pobieranych z pędów kwiatostanowych [Ramesh i in. 2013]. Powszechnie stosowanym materiałem do inicjacji kultur tkankowych storczyków są liście. Chen i in. [2004] dowiedli, że rośliny *Paphiopedilum* sp. można z powodzeniem rozmnażać, wykorzystując fragmenty liści, a Nayak i in. [1997] wykorzystywali je do mikrorozmnażania *Acampe praemorsa*. Do zakładania kultur tkankowych mogą być także wykorzystywane eksplantaty pobrane z kwiatostanów. Sharma [2012] potwierdził przydatność pylników do zainicjowania kultury *Rhynchostylis retusa*. Autor ten zwraca jednak uwagę na fakt, że istotne jest stadium rozwojowe kwiatu, z którego pobierane są pylniki. Otwarte kwiatostany wydzielają etylen, który hamuje regenerację. Santana i Chaparro [1999] do mikrorozmnażania *Oncidium* sp. wykorzystywali pąki kwiatowe. W podobny sposób postępowali Liao i in. [2011], wykorzystując do inicjacji kultury poprzecznie przecięte pąki *Paphiopedilum* 'Deperle' o długości 1,5–3 cm i *Paphiopedilum* 'Armeni White' o długości 2,5 cm. Badacze ci wykazali, że tylko tkanki położone u podstawy pąków wytwarzały pąki przybyszowe, a następnie rośliny. Teixeira da Silva i Giang [2014] podjęli próby rozmnażania klonalnego *Phalaenopsis* z wykorzystaniem różnych części kwiatostanu, tj. części grzbietowej, płatka, warzki i pylnika. Autorzy ci nie uzyskali jednak satysfakcjonujących wyników, które umożliwiłyby stworzenie unikalnej techniki mikrorozmnażania. Z kolei Collins i Dixon [1992] użyli pędów kwiatostanowych *Diuris longifolia* zawierających pąki boczne.

Ważnym etapem zapoczątkowania kultury *in vitro* jest dezynfekcja powierzchniowa eksplantatów inicjalnych. Pierwszym etapem odkażania jest zastosowanie kilku kropel detergentu, który ma na celu zmniejszenie napięcia powierzchniowego i ułatwienie dezynfekcji. Liczni autorzy polecają preparat Tween 20 [Kosir i in. 2004, Kannan 2009, Balilashaki i in. 2014, Teixeira da Silva i Giang 2014]. Collins i Dixon [1992] używali preparatu Tween 80 o stężeniu  $0,05 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

Szeroko stosowaną substancją do odkażania powierzchniowego jest podchloryn sodu (NaOCl). Jest to środek łatwo dostępny, który z powodzeniem eliminuje większość mikroorganizmów. Według badań przeprowadzonych przez Asghar i in. [2011] najkorzystniejsze okazało się 10-minutowe odkażanie pąków pachwinowych *Dendrobium nobile* 'Emma White' w NaOCl o stężeniu 10%. Skuteczność tego zabiegu potwierdzają badania Dohling i in. [2012] na *Dendrobium longicornu*. Także Balilashaki i in. [2014] wykazali pozytywny wpływ 10-minutowej dezynfekcji pędów kwiatostanowych *Phalaenopsis amabilis* 'Cool Breeze' w roztworze NaOCl o stężeniu 7%. Stwierdzili oni zakażenie jedynie 10% eksplantatów. Podchloryn sodu okazał się przydatny także do zakładania kultur z pąków kwiatowych. Santana i Chaparro [1999] wykonali zabieg dezynfekcji pąków kwiatowych *Oncidium* 2% roztworem NaOCl przez 10 min. Collins i Dixon [1992] do odkażania pędów kwiatostanowych *Diuris longifolia* używali tej substancji w 1% stężeniu, a Teixeira da Silva i Giang [2014] pierwszy etap odkażania kwiatostanów *Phalaenopsis* wykonali poprzez zanurzenie ich w 1% roztworze podchlorynu sodu na ok. 1 min. Natomiast Sharma [2012] przeprowadził zabieg dezynfekcji kwiatostanów

*Phalaenopsis*, umieszczając je w 70% roztworze etanolu na 30 s, a następnie w roztworze streptomycyny o stężeniu 0,1% na ok. 20 min i na koniec odkażał je przez 20 min w 4% NaOCl. Inni autorzy podają skuteczność zastosowania kwasu dichloroizocyjanurowego (sól sodowa) o stężeniu  $16,6 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  do dezynfekcji węzłów oraz pąków śpiących pobranych z pędów kwiatostanowych *Phalaenopsis* [Kosir i in. 2004, Ramesh i in. 2013]. Substancja ta okazała się skuteczna, gdyż po jej zastosowaniu stwierdzono tylko 4% zakażonych eksplantatów. Geetha i Shetty [2000], zakładając kultury *Vanilla planifolia*, poddali eksplantaty wierzchołkowe i segmenty węzłowe 10-minutowej dezynfekcji 0,1% roztworem chlorku rtęci ( $\text{HgCl}_2$ ). Jako jeden z etapów odkażania powierzchniowego fragmentów organów roślinnych wykorzystuje się także etanol. Najczęściej stosowane stężenie to 70%. Skuteczność etanolu została potwierdzona m.in. przez Malabadi i in. [2004], którzy stosowali go do dezynfekcji wierzchołkowych fragmentów pędów *Dendrobium nobile*. Balilashaki i in. [2014] odkażali pędy kwiatostanowe *Phalaenopsis amabilis* za pomocą bawełny nasączonej 70% roztworem etanolu. Teixeira da Silva i Giang [2014] dezynfekowali kwiatostany *Phalaenopsis* podchlorynem sodu zawierającym 1% aktywnego chloru i następnie umieszczali je w 80% roztworze etanolu na 5 s.

Balilashaki i in. [2014] zwrócili uwagę na fakt, że istotny wpływ na stopień zainfekowania kultur *Phalaenopsis amabilis* miała m.in. średnica szypułki kwiatostanowej. Głównie w przypadku starszych roślin wzrastało ryzyko zakażenia kultury ze względu na większą grubość szypułki, natomiast młode rośliny, pomimo że charakteryzowały się delikatniejszymi tkankami, były bardziej odporne na zakażenia.

Warunkiem wzrostu eksplantatów jest odpowiednio dobrane podłoże. Rośliny rozmnażane *in vitro* rosną na pożywkach, które są dostosowane do danego gatunku, a nawet odmiany, a więc mają odpowiedni stopień zestalenia, pH oraz zawierają wszystkie niezbędne makro- i mikroelementy. Wybierając odpowiedni skład pożywki do prowadzenia kultur, należy pamiętać, iż tkanki pobrane z różnych części rośliny mogą mieć odmienne wymagania pokarmowe. Ponadto Balilashaki i in. [2014] stwierdzili, że powodzenie kultury zależy od tak istotnych czynników, jak: wiek organu, z którego pobrany został eksplantat, skład pożywki, w tym uzupełnienie jej regulatorami wzrostu. Powszechnie stosowanym podłożem jest pożywka Murashige i Skooga (MS) [1962]. Jej uniwersalne działanie i odpowiedni skład do mikrorozmnażania storczyków zostały potwierdzone dla takich storczyków, jak: *Acampe praemorsa* [Nayak i in. 1997], *Cymbidium* [Kannan 2009], *Dendrobium* [Khatun i in. 2010, Talukder i in. 2003], *Dendrobium chrysanthum* [Hajong i in. 2013], *Dendrobium longicornu* [Dohling i in. 2012], *Geoderum purpureum* [Mohapatra i Rout 2005], *Orchids catasetum* [Fakouri Ghaziani i in. 2014], *Phalaenopsis amabilis* 'Cool Breeze' [Balilashaki i in. 2014] oraz *Vanilla planifolia* [Geetha i Shetty 2000]. Pożywki z połową składu mineralnego MS używano w doświadczeniach z *Cymbidium ensifolium* var. *misericors*, *Epidendrum*, *Oncidium*, *Paphiopedilum* [Chang i in. 2005] oraz *Paphiopedilum philippinense* [Chen i in. 2004]. Największą efektywność mikrorozmnażania *Vanda* sp. z pąków śpiących uzyskano na pożywkach Vacin i Went [Collins i Dixon 1992]. Do wegetatywnej reprodukcji roślin *Phalaenopsis* z pąków śpiących jako eksplantatów inicjalnych pobranych z pędów kwiatostanowych najlepsza okazała się pożywka o składzie takim samym jak komercyjne podłoże P6793 (Sigma) [Kosir i in. 2004]. Malabadi i in. [2004] do mikrorozmnażania *Dendrobium nobile* z eksplantatów wierzchołkowych używali pożywki Mitra (1976), natomiast Roy i Banerjee [2003] do mikrorozmnażania *Dendrobium fimbriatum* var. *oculatum* wykorzystywali podłoże



Knudson C, podobnie jak Santana i Chaparro [1999] do indukcji protokormów z fragmentów pąków liściowych. Geetha i Shetty [2000] uzyskali wysokiej jakości sadzonki *Vanilla planifolia* na pożywce N69 o niższym stężeniu soli, co pozytywnie wpłynęło na kondycjonowanie kultur. Ponadto autorzy ci zaobserwowali, że na takim podłożu następuje intensywne namnażanie pędów oraz że są one dłuższe i mają szersze liście. Udomdee i in. [2012] eksplantaty uzyskane na skutek podłużnego cięcia pędów *Paphiopedilum* umieszczali na trzech podłożach: P<sub>2</sub>, Vacin & Went oraz RB. Po 3 miesiącach prowadzenia kultury najlepsze parametry uzyskano na pożywce P<sub>2</sub> – rośliny wykształciły zielone i dobrze rozwinięte liście. Na dwóch pozostałych podłożach zaobserwowano żółknięcie blaszek liściowych.

Ramesh i in. [2013] uzyskali zadowalające efekty, rozmnażając *Phalaenopsis* za pomocą pąków śpiących występujących na pędach kwiatostanowych na pożywce Norstog (1973) zestalonej preparatem Gerlite<sup>TM</sup>. Przydatność tego preparatu, w stężeniu  $2,5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ , potwierdzają Huang i in. [2001] przy zestalaniu pożywek wykorzystywanych do inicjacji kultur *Paphiopedilum*. Inni autorzy wykorzystywali agar, najczęściej w stężeniu  $8 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  [Hajong i in. 2013, Fakouri Ghaziani i in. 2014], natomiast Teixeira da Silva i Giang [2014] używali Bacto-agaru w stężeniu  $8 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

Balilashaki i in. [2014] wykazali, iż w kulturach *in vitro* *Phalaenopsis* poważnym problemem jest wydzielanie związków fenolowych. Czynniki te wymuszały konieczność przenoszenia eksplantatów na świeże pożywki co 14 dni. Korzystne efekty, w postaci pochłaniania tych związków, uzyskano poprzez zastosowanie węgla aktywnego w ilości  $0,5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-1}$  [Fakouri Ghaziani i in. 2014]. Węgiel aktywny jest też często stosowany w celu poprawy wzrostu i rozwoju roślin *in vitro* [Pindel i Pindel 2004]. Substancja ta w stężeniu 0,02 oraz 0,03% była też z powodzeniem stosowana w mikrorozmnażaniu zagrożonych europejskich gatunków *Anacamptis pyramidalis*, *Dactylorhiza* spp., *Epipactis* spp., *Gymnadenia* spp. oraz *Listera ovata* w celu poprawy ich rozwoju w warunkach *in vitro* [Waes 1987]. Dodatek aktywnego węgla korzystnie wpływa na napowietrzenie pożywek, co przyczynia się do wzmożenia indukcji systemu korzeniowego. Autorzy Moraes i in. [2005] obserwowali dużą liczbę długich korzeni u *Miltonia flavescens* po zastosowaniu węgla aktywnego w ilości  $2 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-1}$  oraz u *Oncidium trulliferum* (ilość węgla aktywnego –  $1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-1}$ ), a Bhadra i Hossain [2003] – u *Geodorum densiflorum* (ilość węgla aktywnego –  $1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-1}$ ).

Regeneracja pędów w kulturach tkankowych zależy w szczególności od zawartości cytokinin, które wykorzystywane są do znoszenia dominacji wierzchołkowej i stymulacji rozwoju pąków kwiatowych [Udomdee i in. 2012]. Liczne doświadczenia pokazują, że wzbogacenie podłoża w substancje z tej grupy hormonów roślinnych powodowało wzmocnioną regenerację pędów. Pyati i in. [2002] wykazali zwiększoną produkcję pędów z pąków pachwinowych u *Dendrobium macrostachyum* przy zastosowaniu BAP (benzyladeniny) w stężeniu 1 i  $2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ . W przypadku *Geodorum purpureum* korzystne efekty uzyskano po uzupełnieniu pożywki w BAP w stężeniu  $3 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  oraz w IAA (kwas indoliloctowy) w stężeniu  $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  [Mohapatra i Rout 2005]. Kosir i in. [2004] zastosowali BAP w ilości  $2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  oraz NAA (kwas naftylo-1-octowy) w stężeniu  $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ , co przyczyniło się do zwiększenia współczynnika regeneracji pędów *Phalaenopsis*. Asghar i in. [2011] podają, iż duża liczba, ale niższych pędów tworzyła się u roślin *Dendrobium nobile* 'Emma White' rozmnażanych za pomocą pąków pachwinowych na pożywkach z dodatkiem BAP w ilości  $2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Natomiast

eksplantaty *Dendrobium longicornu* pozytywnie zareagowały na obecność w pożywce BAP w stężeniu  $3,4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  i NAA w ilości  $0,9 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  [Dohling i in. 2012]. Balilashaki i in. [2014] dowiedli, że dodatek BAP w ilości  $4,4$  i  $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  stymulował rozwój wszystkich pąków śpiących wykorzystanych jako eksplantaty inicjalne. Obserwacje przeprowadzone przez Chang i in. [2005] wykazały, że w przypadku roślin *Paphiopedilum* następowało zwiększenie indukcji pędów poprzez dodanie do pożywki TDZ (tidiazuron – syntetyczna cytokinina) i 2,4-D (kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy). Także Hajong i in. [2013] potwierdzili skuteczność TDZ w ilości  $5 \mu\text{M}$  u *Dendrobium chrysanthum*. Nayak i in. [1997] stwierdzili, że w kulturach liści *Acampe praemorsa* częstotliwość regeneracji oraz liczba zregenerowanych pędów przybyszowych zwiększała się wprost proporcjonalnie do wzrostu stężenia TDZ, przy czym optymalna ilość TDZ w pożywce wynosiła  $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Malabadi i in. [2004] wykazali przydatność zastosowania triakontanolu (TRIA). Związek ten stosowany w stężeniu  $1,75 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  korzystnie wpływał na regenerację pędów *Dendrobium nobile* [Malabadi i in. 2004].

Cytokininy są często odpowiedzialne także za jakość otrzymanych *in vitro* roślin. Asghar i in. [2011] wykazali, że kinetyna w stężeniu  $1,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  pozytywnie wpływała na długość pędów *Dendrobium nobile* ‘Emma White’, ale ograniczała ich liczbę. Natomiast Talukder i in. [2003] zaobserwowali, że zastosowanie w podłożu BAP w ilości  $2,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  oraz NAA o stężeniu  $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  znacząco zwiększyło liczbę i długość pędów oraz liczbę liści u *Dendrobium*. W kulturach storczyków z rodzaju *Catasetum* wyższe rośliny o zwiększonej liczbie liści uzyskano poprzez dodanie do pożywki BAP i NAA, w takiej samej ilości:  $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  [Fakouri Ghaziani i in. 2014]. Khatun i in. [2010] zaobserwowali, że do regeneracji pędów *Dendrobium* przyczyniało się uzupełnienie podłoża w BAP o stężeniu  $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  oraz w IAA w ilości  $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Zastosowane regulatory wzrostu miały pozytywny wpływ na długość pędów i ich świeżą masę oraz liczbę liści i ich długość.

Pozytywny wpływ na jakość roślin mogą wywierać dodatki organiczne, którymi wzbogacane są pożywki. Woda kokosowa (CW) zawiera duże ilości czynnych substancji, które w znaczący sposób wpływają na podziały komórkowe [Puchooa 2004, Asghar i in. 2011]. Asghar i in. [2011] wykazali, że w kulturach *Dendrobium nobile* ‘Emma White’ istotny wpływ na liczbę i długość pędów miała obecność wody kokosowej w pożywce w stężeniu  $100 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Także u *Dendrobium macrostachyum* zwiększenie liczby pędów z pąków pachwinowych nastąpiło po wzbogaceniu podłoża mleczkiem kokosowym. Autorzy wykazali, że wraz ze wzrostem stężenia tego składnika z 5 do 10%, a następnie do 15%, zwiększała się liczba uzyskanych mikrosadzonek [Pyati i in. 2002]. Huang i in. [2001] stwierdzili, że wzbogacenie pożywki mlekiem kokosowym (15%) i hydrolizatem kazeiny ( $1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) powoduje zwiększoną proliferację pędów i przynosi pozytywne efekty w postaci lepszego rozwoju systemu korzeniowego u *Paphiopedilum*. Natomiast ekstrakty z ziemniaka ( $10 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) i banana ( $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) wpływały korzystnie na namnażanie pędów tego gatunku.

W kulturach *in vitro* w celu poprawy wzrostu wydłużeniowego można wykorzystywać regulatory wzrostu z grupy giberelin. U *Laelia speciosa* korzystne rezultaty osiągnięto, wzbogacając pożywki w  $\text{GA}_3$  (kwas giberelinowy) w ilości  $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  [Avila-Diaz i in. 2009]. Natomiast Giridhar i Ravishabkar [2003] zaobserwowali, że intensywne namnażanie się pędów u *Vanilla planifolia* następowało po zastosowaniu BAP

w ilości  $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  i  $\text{GA}_3$  w ilości  $0,01 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ , co wpływało korzystnie na wzrost elongacyjny pędów i pozwalało uzyskać rośliny o szerszych liściach.

Do ukorzenia uzyskanych w kulturach tkankowych pędów najczęściej stosowane są auksyny. W przypadku *Dendrobium nobile* 'Emma White' korzystny wpływ na ukorzenie miało dodanie do pożywki IBA (kwas indolilomasłowy) w ilości  $2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  [Asghar i in. 2011]. Mohoparta i Rout [2005] w swoich badaniach dowiedli, że dodatek IAA w stężeniu  $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  zwiększał liczbę ukorzenionych pędów *Geoderum purpureum*. Podobne wyniki uzyskali Hossain i in. [2010] w przypadku *Cymbidium giganteum*. Natomiast Balilashaki i in. [2014] polecają IAA w stężeniu  $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  do indukowania korzeni *Phalaenopsis amabilis*. Hajong i in. [2013] otrzymali dobrze ukorzone rośliny *Dendrobium chrysanthum* przy NAA w stężeniu  $1,8 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Natomiast Nayak i in. [1997] zaobserwowali, że wysokie stężenie NAA (powyżej  $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) negatywnie wpływało na regenerację zarówno pędów, jak i korzeni *Acampe praemorsa*.

Do ukorzenia niektórych gatunków storczyków, obok auksyn, wykorzystuje się także cytokininy. Khatun i in. [2010] podają, że użycie NAA łącznie z BAP w ilości  $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  pozytywnie wpłynęło na długość i liczbę korzeni *Dendrobium*. Fakouri Ghaziani i in. [2014] polecają stosowanie kombinacji NAA w ilości  $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  i BAP w ilości  $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  do ukorzenia *Castseum* sp.

Oprócz auksyn na ukorzenie pędów storczyków w kulturach tkankowych mogą mieć wpływ także inne substancje. Malabadi i in. [2004] potwierdzili przydatność Triacantanolu (TRIA) do ukorzenia sadzonek *Dendrobium nobile*, a najwięcej ukorzenionych roślin uzyskano, wzbogacając pożywkę tą substancją w ilości  $2 \mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Collins i Dixon [1992] zaobserwowali, że lepsze ukorzenie sadzonek *Diuris longifolia* nastąpiło, gdy zwiększono stężenie sacharozy z 30 do  $40 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  lub na skutek dodania 0,05% węgla aktywnego w obecności sacharozy o stężeniu  $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

Ostatnim etapem mikrozmnażania roślin jest aklimatyzacja w warunkach *ex vitro*. Hajong i in. [2013] wyjmowali pędy storczyków z dobrze wykształconymi korzeniami z pożywek i dokładnie myli je wodą destylowaną, a następnie umieszczali sadzonki *Dendrobium chrysanthum* w kolbach Erlenmeyera wypełnionych substratem z pokruszonej cegły i węgla drzewnego, łupin orzecha kokosowego i mchu w stosunku 1 : 1 : 1 : 1. Podłoże przed sadzeniem roślin zostało dwukrotnie przemyte wodą destylowaną. Aby utrzymać właściwą wilgotność, uzupełniono kolby 20 ml wody destylowanej. Dopiero po 30 dniach rośliny były przenoszone do doniczek wypełnionych takim samym podłożem. Z kolei Geetha i Shetty [2000] sadzili *Vanilla planifolia* w podłożu Soilrite w doniczkach i umieszczali je na 15–20 dni w tunelu foliowym, w którym utrzymywano 100% wilgotność. W takich warunkach przyjęło się 88–94% roślin. Sharma [2012] umieszczał sadzonki *Rhynchostylis retusa* do momentu, aż osiągną 3 cm wysokości, w półstałej pożywce o zmniejszonym stężeniu makro- i mikroelementów, bez sacharozy i witamin. Po osiągnięciu wymaganej wysokości rośliny przenoszono do stałego podłoża składającego się w równych proporcjach z mchu, węgla drzewnego, kory sosnowej oraz pokruszonej cegły i okrywano folią na 4 tyg., w folii stopniowo robione były otwory w celu obniżenia wilgotności powietrza. Mathews i Rao [1985] ukorzeniały pędy *Vanda* w momencie, gdy miały wykształcone od 4 do 6 liści. Jako podłoże stosowali mech *Sphagnum*, węgiel drzewny i kawałki cegły. Malabadi i in. [2004] umieszczali po 3 rośliny *Dendrobium nobile* z dobrze wykształconymi korzeniami w doniczkach o średnicy 15 cm, wypełnionych kawałkami węgla, łupinami kokosa i pokruszoną cegłą (2 : 2 : 1).

Sadzonki były codziennie podlewane i raz w tygodniu nawożone fosforanem dwuamotycznym oraz azotem (N : P : K – 20 : 10 : 10).

Aklimatyzacja *Dendrobium chrysanthum* prowadzona była w temperaturze  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , przy 12-godzinym dniu. Intensywność światła wynosiła  $60 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . W trakcie hartowania autorzy zaobserwowali, że rośliny zrzucały liście, ale były one szybko zastępowane nowymi. Aklimatyzację przetrwało 79% roślin [Hajong i in. 2013]. Gatunek *Diuris longifolia* aklimatyzowano w temperaturze  $18 \pm 25^\circ\text{C}$  [Collins i Dixon 1992]. Cha-um i in. [2010] stwierdzili, że rośliny *Phalaenopsis* powinny być aklimatyzowane w nieco niższej temperaturze,  $15\text{--}25^\circ\text{C}$ , oraz przy względnej wilgotności powietrza wynoszącej  $60 \pm 5\%$  RH. Natomiast Puchooa [2004] umieszczała rośliny *Dendrobium* w koszach wypełnionych węglem drzewnym oraz okrytych osłoną z polichlorku winylu i aklimatyzowała w temperaturze  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  przy 16-godzinym oświetleniu światłem białym o natężeniu  $500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , uzyskując 84% przyjęć.

#### MERYKLONY – ZARODKI SOMATYCZNE

W kulturach tkankowych storczyków występują specyficzne organy, z ang. PLB – protocorm-like bodies, które są tworem analogicznym do protokormu powstającego z nasion, a w rzeczywistości są to zarodki somatyczne powstałe w wyniku rozmnażania wegetatywnego [Lee i in. 2013]. Według Ishii i in. [1998] początkowym etapem formowania PLB jest embriogeneza somatyczna. Rozmnażane w ten sposób rośliny są nazywane meryklonami. Organy te mogą z powodzeniem być wykorzystane do mikrorozmnażania storczyków w kulturach tkankowych. Są one szczególnie przydatne do szybkiego rozmnażania rzadkich i zagrożonych gatunków storczyków z rodzaju *Castetum* [Fakouri Ghaziani i in. 2014], do rozmnażania w warunkach *in vitro* storczyków, które wytwarzają małe ilości nasion [Murdad i in. 2006].

Meryklony mogą powstawać z różnych organów roślinnych, m.in. z fragmentów liści, pędów oraz pąków kwiatowych [Tee i in. 2010]. Doświadczenia wykazały, że mogą one powstawać w warunkach *in vitro* z fragmentów liści mieszańca *Vanda* [Mathews i Rao 1985], *Dendrobium* ‘Sonia’ [Puchooa 2004] oraz *Phalaenopsis gigantea* [Niknejad i in. 2011]. U *Dendrobium phalaenopsis* [Nge i in. 2006] oraz *Dendrobium longicornu* [Dohling i in. 2012] PLB uzyskano po uprzednim wyłożeniu na płynną pożywkę pąków pachwinowych, a u *Cymbidium* sp. [Kannan 2009] oraz *Phalaenopsis* i *Doritaenopsis* [Tohukara i Mii 2003] – pąków wierzchołkowych. Ponadto Kannan [2009] stwierdził, że bardziej intensywna proliferacja występuje w części peryferyjnej eksplanatu, czyli w obszarze epidermy, niż w obszarze rdzenia. Struktury te można też uzyskać z pąków kwiatostanowych, co potwierdzają badania Tokuhara i Mii [2003] na *Phalaenopsis*, Santana i Chaparro [1999] na *Oncidium* oraz Balilashaki [2014] na *Phalaenopsis amabilis* ‘Cool Breeze’.

Do namnażania meryklonów zaleca się pożywki płynne [Kukułczanka i Paluch 1971, Santana i Chaparro 1999, Puchooa 2004, Hossain i in. 2010], jednak dla prawidłowego rozwoju kultury dalsze etapy prowadzi się na podłożach zestalonych m.in. agarom [Hossain i in. 2010]. Jednak Kukułczanka i Paluch [1971] podają, że struktury *Cymbidium* uzyskane na pożywkach płynnych znacznie wolniej przechodzą w stadium rośliny, dopiero po ok. 2 miesiącach, a uzyskane na pożywkach stałych są większe i mają bardziej

soczystą tkankę. Santana i Chaparro [1999] namnażali PLB uzyskane z pąków kwiatowych *Oncidium*, na płynnej pożywce MS. Ten sam rodzaj podłoża zastosowała Puchooa [2004] u *Dendrobium*. Dohling i in. [2012] uzyskali wyżej opisane struktury z eksplantatów węzłowych *Dendrobium longicornu* na pożywce MS zestalonej 0,8% agarem. Teixeira da Silva [2012] potwierdził przydatność pożywki Teixeira *Cymbidium*<sub>PLB</sub> do rozmnażania *Cymbidium*. Do wyżej opisanych pożywek zastosowano dodatek Bacto-agaru w ilości  $8 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  [Teixeira da Silva 2012]. Także Fakouri Ghaziani i in. [2014] uzyskali kultury PLB na pożywkach MS zestalonych agarem (agar – agar) w stężeniu  $0,8 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Aktar i in. [2007] osiągnęli najwyższą wydajność formowania PLB oraz największą liczbę pędów i liści *Dendrobium* na pożywce MS o zmniejszonej o połowę zawartości soli mineralnych. Oprócz podłoża MS, w celu uzyskania najdłuższych liści autorzy polecają pożywkę Knudson C. U roślin *Vanda* zwiększoną indukcję PLB uzyskano na podłożu Vacin i Went zestalonym preparatem Gerlite<sup>TM</sup> w ilości  $8 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  [Gnasekaran i in. 2012].

Do uzyskania optymalnego namnażania PLB konieczne jest zachowanie odpowiednich proporcji pomiędzy stężeniem auksyn i cytokinin w pożywce. Santana i Chaparro [1999] stwierdzili, że małe dawki regulatorów wzrostu są niezbędne do inicjacji PLB. Ich rodzaj i stężenie należy modyfikować w zależności od gatunku i odmiany rośliny. Ponadto dla uzyskania optymalnej liczby PLB o wysokiej jakości ważne jest, aby cytokinina wystąpiła w pożywce w większym stężeniu niż auksyna ( $C > A$ ), co warunkuje odpowiedni kierunek organogenezy. Potwierdzają to badania Hossaina i in. [2010], którzy obserwowali stymulację tworzenia tych struktur na skutek wzbogacenia płynnego podłoża w BAP w ilości  $2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  i w NAA w ilości  $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ . U *Phalaenopsis gigantea* korzystne rezultaty otrzymano na pożywce z dodatkiem TDZ ( $0,3 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) i NAA ( $0,01 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) [Niknejad i in. 2011]. W przypadku *Oncidium* intensywne namnażanie PLB nastąpiło, gdy do podłoża dodano NAA ( $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) i BAP ( $5,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ). Dohling i in. [2012] u *Dendrobium longicornu* zaobserwowali wzmoczoną produkcję tych struktur na pożywce z BAP w stężeniu  $3,4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  i 2,4-D w ilości  $3,3 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ , a Islam i in. [2014] – u mieszańca *Dendrobium alba*  $\times$  *Ascanda dongtarm* na podłożach MS z dodatkiem NAA w ilości  $2,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  i kinetyny w ilości  $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Kukułczanka i Kromer [1984] oceniali wpływ pożywki Reinerta i Mohra uzupełnionej NAA i IBA oraz BAP w stężeniu 6 i  $10 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ , a także peptonem w ilości  $1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Stwierdzili, że na skutek zastosowania tych substancji w kulturach różnych organów *Phalaenopsis* następowało intensywne tworzenie PLB, ale rozwój roślin, w tym ukorzenianie, został zahamowany. Puchooa [2004] stosowała pożywkę MS wzbogaconą o BA w ilości  $0,1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  oraz o NAA w ilości  $1,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ , co pozytywnie wpływało na indukcję tych struktur z eksplantatów liściowych *Dendrobium*. TDZ w dawce  $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  pozytywnie oddziaływał na produkcję PLB u *Phalaenopsis amabilis*, jednak zwiększenie stężenia tej substancji nie prowadziło do powstawania większej liczby PLB, a przy stężeniu  $3 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  autorzy zaobserwowali znacznie słabsze powstawanie tych struktur [Balilashaki i in. 2014].

Także inne substancje mogą pozytywnie wpływać na tworzenie PLB u storczyków. Kukułczanka i Paluch [1971] zauważyły, że w przypadku *Cymbidium* uprawianego na pożywce Tshuchiya liczba PLB zwiększyła się po dodaniu do pożywki peptonu Peptobak-Bacutil w stężeniu  $2 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Ramesh i in. [2013] obserwowali, że duże ilości PLB tworzyły się u *Phalaenopsis* na pożywce Norstog (1973) wzbogaconej w  $\text{MnSO}_4$  w ilości

$4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Nge i in. [2006] wykazali, że do stymulacji namnażania PLB na pożywkach płynnych można użyć chitosanu w stężeniu 15 ppm. Autorzy ci zalecali dalsze prowadzenie kultury na pożywkach stałych z dodatkiem chitosanu w stężeniu 20 ppm. W ciągu 12 tyg. uzyskali od 5 do 7 nowych roślin.

Tworzenie się meryklonów może być także stymulowane poprzez dodanie do pożywki substancji organicznych. Santana i Chaparro [1999] stwierdzili, że lepiej zróżnicowane kultury PLB tworzyły się na pożywce z miąższem zielonych owoców banana ( $100 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ). Także Aktar i in. [2007] wykazali, że wzbogacenie podłoża MS o zmniejszonej o połowę zawartości soli mineralnych miąższem z banana korzystnie wpływało na organogenezę *Dendrobium*, w tym na takie parametry, jak: świeża masa i liczba PLB oraz liczba liści, ich wysokość oraz długość pędów. Jak podaje Puchooa [2004], aby spowodować intensywne namnażanie i dzielenie PLB, do pożywek można dodać wodę kokosową (CW). Autorka ta najlepsze rezultaty uzyskała, stosując 15% wodę kokosową. Zastosowanie wyższych (20%) i niższych (10%) stężeń CW hamowało proliferację PLB. Także Nambiar i in. [2012] potwierdzają przydatność wody kokosowej, która korzystnie wpłynęła na proliferację opisywanych struktur u *Dendrobium* 'Alya Pink'. Ponadto zaobserwowano, że z jednej struktury może wytworzyć się nawet 10 nowych pędów na skutek wzbogacenia pożywki homogenatem z ziemniaka w stężeniu  $10 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  [Puchooa 2004]. Natomiast u *Vanda* intensywniejszą proliferację PLB zaobserwowano po dodaniu do podłoża wody kokosowej (10%) i ekstraktu z pomidora (20%). Wyższe ilości ekstraktu z ziemniaka (powyżej 20%) ograniczały proliferację pędów *Vanda* 'Kasem's Delight', podobnie jak wyciąg z papai w stężeniu powyżej 10% [Gnasekaran i in. 2012]. Odmienne rezultaty uzyskali Nambiar i in. [2012], stosując ekstrakty z banana i pomidora. W ich badaniach wzbogacenie podłoża tymi dodatkami nie wpływało w znaczący sposób na namnażanie się PLB *Dendrobium* 'Alya Pink'. Nambiar i in. [2012] zaobserwowali, że spośród węglowodanów najlepiej na wzrost wyżej omawianych struktur *Dendrobium* 'Alya Pink' oddziaływała glukoza, po zastąpieniu nią sacharozy, w roślinach powstałych na pożywkach z sacharozą stwierdzono natomiast wysoką zawartość chlorofilu.

#### KULTURY KALUSA

W przypadku storczyków tworzenie kalusa jest bardzo trudne ze względu na powolny wzrost i tendencję do nekroz [Naing i in. 2011]. Liczne badania dowiodły, iż intensyfikacja tworzenia kalusa następuje na skutek wzbogacenia pożywki cytokininami. Do jego inicjacji w kulturach pylników niezbędny był dodatek BAP w ilości  $10 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ , NAA w ilości  $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  oraz peptonu w ilości  $2 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  pożywki [Sharma 2012]. Zastosowanie TDZ sprzyjało powstawaniu tej tkanki na liściach *Paphiopedilum giganteum*, przy czym jego optymalne stężenie wynosiło  $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  [Niknejad i in. 2011]. Korzystne działanie cytokinin potwierdzają też Ishii i in. [1998]. Autorzy ci wykazali, że u *Phalenopsis* niezbędne było wzbogacenie podłoża w 2,4-D ( $0,1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) i w BAP ( $0,01 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) oraz w sacharozę ( $40 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ). Roy i Banerjee [2003] zaobserwowali, że u *Dendrobium fimbriatum* var. *oculatum* pozytywne efekty następowały po zastosowaniu NAA w ilości  $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  i BAP w dawce  $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Naing i in. [2011] uzyskali kalus u *Coelogyne cristata* po zastosowaniu 2,4-D w ilości  $2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  oraz BAP w dawce  $2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Teixeira da Silva i Giang [2014] do mikrorozmnażania *Phalae-*

*nopsis* wykorzystali elementy kwiatostanu i uzyskali kalus, prowadząc kultury w świetle przy PPF 45  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , oraz na pożywce wzbogaconej w TDZ w ilości 2 lub 4  $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  oraz w 2,4-D w dawce 1  $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Wytworzona w tych warunkach struktura była twarda i okazała się nieprzydatna do dalszej regeneracji. Ishii i in. [1998] wykazali, że kalus u *Paphiopedilum* można skutecznie indukować z protokormów, na podłożach wzbogaconych sacharozą, natomiast dodatek wody kokosowej hamował wytwarzanie tej tkanki u *Coelogyne cristata* [Naing i in. 2011].

Teixeira da Silva [2012] do indukcji kalusa u *Cymbidium* polecał pożywkę TC<sub>CALLUS</sub>. Do inicjacji kultur kalusa *Rhynchostylis retusa* z wykorzystaniem pylników zastosowano pożywkę Sharma [Sharma 2012].

Ponadto dowiedziono, że na wytwarzanie kalusa u storczyków z rodzaju *Phalaenopsis* doskonale wpływa preparat Gerlite<sup>TM</sup>, dlatego też wskazane jest jego zastosowanie jako środka zestalającego pożywkę [Ishii i in. 1998].

#### PODSUMOWANIE

Storczyki to bardzo popularne rośliny ozdobne uprawiane jako rośliny doniczkowe, także na kwiaty cięte wykorzystywane w bukietarstwie, a niektóre gatunki mogą być z powodzeniem uprawiane jako rośliny ogrodowe. Duże zainteresowanie storczykami, a tym samym znaczny popyt na nie, sprawia, że poszukuje się metod szybszego i bardziej wydajnego rozmnażania tych roślin.

Dzięki zastosowaniu kultur tkankowych storczyków możliwe jest uzyskanie dużej ilości wolnych od patogenów chorobotwórczych roślin potomnych, które w krótkim czasie mogą zostać wprowadzone na rynek [Wróblewska i Rudzki 2012, Balilashaki i in. 2014]. Rozpowszechnienie rozmnażania *in vitro* za pomocą nasion umożliwiło także uzyskiwanie nowych odmian. Powstałe mieszańce to m.in. *Phalaenopsis*, które są dostępne w szerokiej gamie kolorystycznej.

Rozpowszechnienie uprawy storczyków w kulturach tkankowych zawdzięcza się pracom dwóch naukowców, Burgeffa i Bernarda, których badania doprowadziły do opracowania metody symbiotycznego i asymbiotycznego kiełkowania nasion w warunkach *in vitro*. Następnym krokiem było opracowanie technologii rozmnażania wegetatywnego w kulturach tkankowych, które zapewnia uzyskanie roślin potomnych identycznych z roślinami macierzystymi, co pozwoliło na rozmnażanie wielu odmian. Dzięki wprowadzeniu większej liczby roślin na rynek storczyki stały się dostępne dla większości konsumentów.

Mikrorozmnażanie storczyków pozwala także na prowadzenie aktywnej ochrony wielu gatunków należących do tej grupy roślin. Dzięki zastosowaniu kultur tkankowych możliwe jest rozmnażanie rzadkich i zagrożonych gatunków storczyków, przetrzymywanie ich w bankach genów, a nawet ponowne wprowadzanie do naturalnego środowiska w celu zasilenia lub odbudowania populacji. Kultury tkankowe są w tym celu wykorzystywane na całym świecie [Collins i Dixon 1992, Pindel i Pindel 2004, Fakouri Ghaziani i in. 2014].

Historia rozmnażania storczyków w warunkach *in vitro* sięga 400 lat wstecz i prawdopodobnie nigdy się nie skończy. Badacze na całym świecie nadal będą poszukiwać coraz to nowszych i bardziej wydajnych metod rozmnażania tych pięknych roślin.

## PIŚMIENNICTWO

- Aktar S., Nasiruddin K.M., Khaldun A.B.M., 2007. Organogenesis of *Dendrobium* Orchids Using Traditional Media and Organic Extracts. *J. Agric. Rural Dev.* 5, 30–35.
- Asghar S., Ahmad T., Hafiz I.A., Yaseen M., 2011. *In vitro* propagation of orchid (*Dendrobium nobile*) var. Emma white [!]. *Afr. J. Biotechnol.* 10 (16), 3097–3103.
- Avila-Diaz I., Oyama K., Gomez-Alonso C., Salgado-Gaeciglia R., 2009. *In vitro* propagation of endangered orchids *Laelia speciosa*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 99, 335–343.
- Balilashaki K., Naderi R., Kalantari S., Soorni A., 2014. Micropropagation of *Phalaenopsis amabilis* cv. 'Cool Breeze' with using of folwer stalk nodes and leaves of sterile obtained from node cultures. *Int. J. Farm. Alli. Sci.* 3 (7), 823–829.
- Bhadra S.K., Hossain M.M., 2003. *In vitro* germination and micropropagation of *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr., an endangered orchid species. *Plant Tiss. Cult.* 13, 165–171.
- Chang W.C., Chang J.T., Chun Chen Y., Lin Y.H., Su Y.H., Chen T.Y., Tseng M.C., Kuo H.L., Wu I.F., Chueh C.M., 2005. *In Vitro* Morphogenesis of Five Orchids. *Acta Hort.* 692, 115–118.
- Cha-um S., Ulziibat B., Kirdmanee Ch., 2010. Effects of temperature and relative humidity during *in vitro* acclimatization, on physiological changes and growth character of *Phalaenopsis* adapted to *in vivo*. *Am. J. Cosmet. Surg.* 4 (9), 750–756.
- Chen T.-Y., Chen J.-T., Chang W.-C., 2004. Plant regeneration through direct shoot bud formation from leaf cultures of *Paphiopedilum* orchids. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 76, 11–15.
- Collins M.T., Dixon K.W., 1992. Micropropagation of an Australian terrestrial orchid *Diuris longifolia* R. Br. *Austral. J. Exp. Agric.* 32, 131–135.
- Dohling S., Kumaria S., Tandon P., 2012. Multiple shoot induction from axillary bud cultures of the medicinal orchid, *Dendrobium longicornu*. *AoB Plants*, doi: 10:1093/aobpla/pls032.
- Fakouri Ghaziani M.V., Baker A., Negahdar N., Kaviani B., 2014. Micropropagation of *Orchis catasetum* – a rare and endangered orchid. *Sci. Papers. Ser. B, Horticulture* 58, 317–322.
- Geetha S., Shetty S.A., 2000. *In vitro* propagation of *Vanilla planifolia* a tropical orchid. *J. Curr. Sci.* 79, 886–889.
- Giridhar P., Ravishabkar G.A., 2003. Efficient micropropagation of *Vanilla planifolia* Andr. under influence of thidiazuron, zeatin and coconut milk. *Indian J. Biotechnol.* 3, 113–118.
- Gnasekaran P., Poobathy R., Mahmood M., Samian M.R., Subramaniam S., 2012. Effects of complex organic additives on improving the growth of PLBs of *Vanda* Kasem's Delight. *Aust. J. Crop Sci.* 6 (8), 1245–1248.
- Hajong S., Kumaria S., Tandon P., 2013. Effect of plant growth regulators on regeneration potential of axenic nodal segments od *Dendrobium chrysanthum* Wall. *Ex Lindl. J. Agric. Sci. Technol.* 15, 1425–1435.
- Hossain M.M., 2008. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Epidendrum ibaguense* Kunth. (Orchidaceae). *Afr. J. Biotechnol.* 7, 3614–3619.
- Hossain M.M., Sharma M., Teixeira da Silva J.A., Pathak P., 2010. Seed germination and tissue culture of *Cymbidium giganteum* Wall. ex Lindl. *Sci. Hortic.* 123, 479–487.
- Huang L.-Ch., Lin Ch.-J., Kuo Ch.-I., Huang B.-L., Murashige T., 2001. *Paphiopedilum* cloning *in vitro*. *Sci. Hortic.* 91, 111–121.
- Ishii Y., Takamura T., Goi M., Tanaka M., 1998. Callus induction and somatic embriogenesis of *Phalaenopsis*. *Plant Cell Rep.* 17, 446–450.
- Islam M.N., Nasiruddin K.M., Al-Amin M., 2014. *In vitro* growth and multiplication of a hybrid orchid (*Dendrobium alba* × *Ascanda dongtarm*) with different concentration of plant growth regulators. *J. Biosci. Agric. Res.* 1, 27–33.
- Kalimuthu K., Senthilkumar R., Vijayakumar S., 2007. *In vitro* microporpagation of orchid, *Oncidium* sp. (Dancing Dolls). *Afr. J. Biotechnol.* 6, 1171–1174.



- Kannan N., 2009. An *in vitro* study on micropropagation of *Cymbidium* orchids. *Curr. Biot.* 23, 244–250.
- Khatun H., Khatun M.M., Biswas M.S., Kabir M.R., Al-Amin M., 2010. *In vitro* growth and development of *Dendrobium* hybrid orchid. *Bangladesh J. Agril Res.* 35 (3), 507–514.
- Knudson L., 1922. Non-symbiotic germination of orchid seeds. *Bot. Gaz.* 73, 1–25.
- Kosir P., Skof S., Luthar Z., 2004. Direct shoot regeneration from nodes of *Phalaenopsis* Orchids. *Acta Agric. Slov.* 83 (2), 233–242.
- Kukułczanka K., Kromer K., 1984. Namnażanie i rozwój protokormów *Phalaenopsis* w kulturach *in vitro*. *Acta Univ. Wratisl. Pr. Bot.* 667 (30), 15–29.
- Kukułczanka K., Paluch B., 1971. Zastosowanie peptonu Peptobak-Bacutil w hodowli merystematycznej tkanki *Cymbidium* Sw. *Acta Agrobot.* 24 (1), 53–62.
- Kumar A., Nandi S.K., Bag N., Palni L.M.S., 2002. Tissue culture studies in two important orchid taxa: *Rhynchostylis retusa* (L.) Bl. and *Cymbidium elegans* Lindl. Gyanodaya Prakashan, Nainital, India, 113–124.
- Lee Y.-I., Hsu S.-T., Yeung E.C., 2013. Orchid protocorm-like bodies are somatic embryos. *Am. J. Bot.* 100 (11), 1–11, DOI: 10.3732/ajb.1300193.
- Liao Y.-J., Tsai Y.-Ch., Sun Y.-W., Lin R.-S., Wu F.-S., 2011. *In vitro* shoot induction and plant regeneration from flower buds in *Paphiopedilum* orchids. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 47, 702–709.
- Malabadi R.B., Mulgund G.S., Kallappa N., 2004. Micropropagation of *Dendrobium nobile* from shoot tips sections. *J. Plant Physiol.* 162, 473–478.
- Mathews V.H., Rao P.S., 1985. *In vitro* Culture of *Vanda* Hybrid (*Vanda* TMA × *Vanda* Miss Joaquim). II. Studies on Seedling Explants. *Proc. Indian Nat. Sci. Acad.* 4, 496–504.
- Mohapatra A., Rout G.R., 2005. *In vitro* micropropagation of *Geoderum purpureum* R. Br. *Indian J. Biotechnol.* 4, 568–570.
- Moraes L., Faria R.T., Cuquel F.L., 2005. Activated charcoal for *in vitro* propagation of Brazilian orchids. *Acta Hort.* 683 (3), 383–389.
- Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473–479.
- Murdad R., Hwa K.S., Seng C.K., Latip M.A., Aziz Z.A., Ripin R., 2006. High frequency multiplication of *Phalaenopsis gigantea* using trimmed bases protocorms technique. *Sci. Hortic.* 111, 73–79.
- Naing A.H., Chung J.D., Lim K.B., 2011. Plant Regeneration through Indirect Somatic Embryogenesis in *Coelogyne Cristata* Orchid. *Am. J. Plant Sci.* 2, 262–267.
- Nambiar N., Tee C.S., Maziah M., 2012. Effects of organic additives and different carbohydrate sources on proliferation of protocorm-like bodies in *Dendrobium* Alya Pink. *Plant Omics J.* 5 (1), 10–18.
- Nayak N.R., Patnaik S., Rath S.P., 1997. Direct shoot regeneration from foliar explants of an epiphytic orchid *Acampe praemorsa* (Roxb.) Blatter and McCann. *Plant Cell Rep.* 16, 583–586.
- Nge K.L., Nwe N., Chandkrachang S., Stevens W.F., 2006. Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture. *Plant Sci.* 170, 1185–1190.
- Niknejad A., Kadir M.A., Kadzimin S.B., 2011. *In vitro* plant regeneration from protocorm-like bodies (PLBs) and callus of *Phalaenopsis gigantea* (Epidendroideae: Orchideaceae). *Afr. J. Biotechnol.* 10 (56), 11808–11816.
- Nontachaiyapoom T.S., Sasirat S., Manoch L., 2010. Isolation and identification of Rhizoctonia-like fungi from roots of three orchid genera, *Paphiopedilum*, *Dendrobium*, and *Cymbidium*, collected in Chiang Rai and Chiang Mai provinces of Thailand. *Mycorrhiza* 20, 459–471.
- Oszkinis K., 1991. *Storczyki*. PWRiL, Warszawa.

- Pacek-Bieniek A., Dyduch-Siemińska M., Rudaś M., 2010. Influence of activated charcoal on seed germination and seedling development by asymbiotic method in *Zygostates grandiflora* (Lindl.) Mansf. (Orchideaceae). *Folia Hort.* 22 (2), 45–50.
- Pedroza-Manrique J., Fernandez-Lizarazo Ch., Suarez-Silva A., 2005. Evaluation of the effect of three growth regulators in the germination of *Compartmentia falcata* seeds under *in vitro* conditions. *In Vitro Cell. Dev. Biol., Plant* 41, 838–843.
- Pindel A., Pindel Z., 2004. Initiation of *in vitro* cultures of chosen endangered European species of orchids. *Folia Hort.* 16 (2), 111–117.
- Puchooa D., 2004. Comparison of different culture media for the *in vitro* culture *Dendrobium* (Orchideaceae). *Int. J. Agric. Biol.* 6, 884–888.
- Pyati A.N., Murthy H.N., Hahn E.J., Paek K.Y., 2002. *In vitro* propagation of *Dendrobium macrostachyum* Lindl. – A threatened orchid. *Indian J. Exp. Biol.* 40, 620–623.
- Ramesh T., Sabariraj K., Nithiya R., Naveenraj D., Krubha J., Chitra B., Renganathan P., 2013. *In vitro* studies and conservation of endangered orchids in *Phalaenopsis* species. *Int. J. Cur. Tr. Res.* 2 (1), 97–99.
- Rasmussen H., Andersen T.F., Johansen B., 1990. Light stimulation and darkness requirement for symbiotic germination of *Dactylorhiza majalis* (Orchideaceae) *in vitro*. *Physiol. Plant.* 79, 226–230.
- Valle Rego-Olivera L. do, Faria R.T. de, 2005. *In vitro* propagation of Brazilian orchids using traditional culture media and commercial fertilizers formulations. *Acta Scient. Agron.* 27, 1–5.
- Roy J., Banerjee N., 2003. Induction of callus and plant regeneration from shoot-tip explants of *Dendrobium fimbriatum* Lindl. var. *oculatum* Hk. *F. Sci. Hort.* 97, 333–340.
- Santana G.E., Chaparro K., 1999. Clonal propagation of *Oncidium* through the culture of floral buds. *Acta Hort.* 482, 315–320.
- Sharma V., 2012. Orchid micropropagation: regeneration competence of anther culture. *J. Biotechnol. Biomater.* 2, 149, doi: 10.4172/2155-952X.1000149.
- Talukder S.K., Nasiruddin K.M., Yasmin S., Hassan L., Begum R., 2003. Shoot proliferation of *Dendrobium* Orchid with BAP and NAA. *J. Biol. Sci.* 3 (11), 1058–1062.
- Tee Ch.S., Lee P.S., Kiong A.L.P., Mahmood M., 2010. Optimisation of protoplast isolation protocols using *in vitro* leaves of *Dendrobium crumenatum* (pigeon orchid). *Afr. J. Agric. Res.* 5 (19), 2685–2693.
- Teixeira da Silva J.A., 2012. New basal media for protocorm-like body and callus induction of hybrid *Cymbidium*. *J. Fruit Ornam. Plant Res.* 20 (2), 127–133.
- Teixeira da Silva J.A., Giang D.T.T., 2014. Unsuccessful *in vitro* regeneration from *Phalaenopsis* (Orchideaceae) flowers. *All Res. J. Biol.* 5, 18–22.
- Tokuhara K., Mii M., 2003. Highly – efficient somatic embryogenesis from cell suspension cultures of *Phalaenopsis* orchid by adjusting carbohydrate sources. *In Vitro Cell. Dev. Biol., Plant* 39, 365–639.
- Tonecki J., Dobrzyński P., 2008. Rozmnażanie storczyka europejskiego *Platanthera bifolia* (L.) L. C. Rich. w warunkach *in vitro*. *Zesz. Probl. Postęp. Nauk Rol.* 525, 419–425.
- Udomdee W., Wen P.-J., Chin S.-W., Chen F.-Ch., 2012. Shoot multiplication of *Paphiopedilum* orchid through *in vitro* cutting methods. *Afr. J. Biotechnol.* 11 (76), 14077–14082.
- Waes J.V., 1987. Effect of activated charcoal on *in vitro* propagation of western european orchids. *Acta Hort.* 212 (1), 131–138.
- Warghat A.R., Bajpai P.K., Srivastava R.B., Chaurasia O.P., Chauhan R.S., Sood H., 2014. *In vitro* protocorm development and mass multiplication of an endangered orchid, *Dactylorhiza hatagirea*. *Turk. J. Bot.* 38, 737–746
- Wróblewska W., Rudzki P., 2012. Tendencje w produkcji roślin ozdobnych metodą kultur tkankowych w Polsce i na świecie. *Annales UMCS, Horticultura* 22 (4), 20–27.

- Wu J., Ma H., Lü M., Han S., Zhu Y., Jin H., Liang J., Liu L., Xu J., 2010. *Rhizoctonia* fungi enhance the growth of the endangered orchid *Cymbidium goeringii*. *Botany* 88, 20–29.
- Yam T.W., Arditti J., 2009. History of orchid propagation: a mirror of the history of biotechnology. *Plant Biotechnol. Rep.* 3, 1–56.
- Zaniecka J., Łojkowska E., 2004. Establishment of *in vitro* culture collection of endangered European orchids. *Biul. Ogród. Bot. Muz. Zbior.* 13, 69–73.
- Zettler L.W., McInnis T.M., 1994. Light enhancement of symbiotic seed germination and development of an endangered terrestrial orchid (*Platanthera integrilabia*). *Plant Sci.* 102, 133–138.

**Summary.** Orchids belong to the most important ornamental plants. Due to an enormous number of species and cultivars, most of them cannot be propagated generatively and the plants are also propagated vegetatively. One of the methods commonly used is propagation *in vitro*. This review presents the state of knowledge on the subject of micropropagation of orchids, including the most important results on the subject of *in vitro* germination and micropropagation in tissue culture.

**Key words:** micropropagation, PLB, protocorms, orchideaceae, callus, seeds