

TERESA CYBULARZ-URBAN, EWA HANUS-FAJERSKA

**BADANIA WPŁYWU INFEKCJI WIRUSAMI CyMV I ORSV
NA ZDOLNOŚCI MORFOGENETYCZNE MERIKLONÓW
Cattleya schönbrunnensis × *C. leopoldii gutata***

*Z Katedry Botaniki
Akademii Rolniczej im. Hugona Kollątaja w Krakowie*

ABSTRACT. The study concerning the organogenetic reaction of micropropagated orchid tissues coinfecting with *Cymbidium* mosaic virus and *Odontoglossum* ringspot virus and of respective healthy control clone is presented.

Key words: *Cattleya* Lindl., viral infection, micropropagation, morphogenesis

Wstęp

Storczyki można rozmnażać z siewu oraz tradycyjnie w sposób wegetatywny, przy czym wzrost ograniczonej liczby roślin otrzymanych tą drogą jest powolny, gdyż są to rośliny o słabym przyroście. Młode liście rozwijają się wolno, a starsze długo pełnią funkcje asymilacyjne. Z tego powodu jest powszechne stosowanie technik mnożenia *in vitro*, zwłaszcza wartościowych odmian i mieszańców, co umożliwia znaczne podwyższenie współczynnika rozmnażania. Do najczęściej stosowanych należą kultury merystemów i wierzchołków pędów (Morel 1964, Champagnat i Morel 1969, Torres i Mogollon 1998, Torres i in. 1998) oraz organów wegetatywnych i generatywnych, najczęściej liści, korzeni, fragmentów kwiatostanów (Champagnat i in. 1970, Pindel i Miczyński 1996, Colli i Kerbauy 1993, Kerbauy i Colli 1997, Murthy i Pyati 2001, Chen i in. 2004). Rozmnażanie na skalę produkcyjną storczyków metodą kultur *in vitro* spowodowało szerokie rozprzestrzenienie szklarniowych, w naszych warunkach, upraw storczyków epifitycznych, semiepifitycznych oraz litofitycznych, a także umożliwiło reintrodukcję zagrożonych gatunków rodzimych storczyków naziemnych (Lee i Lee 2003, Pindel i Pindel 2004, Znaniecka i in. 2004). *Cattleya* Lindl., epifityczny storczyk o pięknych kwiatach, rosnący w warunkach naturalnych na zboczach And w Ameryce Południowej, jest bardzo ceniony zarówno w kolekcjach, jak i przez producentów.

Stan fitosanitarny upraw, dzięki stosowaniu efektywnych metod ochrony storczyków przed chorobami pochodzenia grzybowego, jest niepokojący jedynie w zakresie chorób wirusowych. Najczęściej diagnozowane są wirusy mozaiki *Cymbidium* (CyMV) oraz pierścieniowej plamistości *Odontoglossum* (ORSV) (Wisler 1989, Cybularz i in. 1990, 1993, Barcial i Bajet 2003). W przypadku infekcji wirusowej całości cennego materiału, co niejednokrotnie się zdarza, jedyną możliwością otrzymania zdrowych roślin matczynych staje się kultywacja w warunkach *in vitro* izolowanych tkanek merystematycznych, często łączona z zabiegami termoterapii oraz chemioterapii. W kolejnym etapie następuje mikrorozmnażanie odwirusowanego materiału (Morel 1960, Walkey 1980, Deogratias i in. 1989). Na temat zabiegów chemioterapeutycznych w literaturze przedmiotu spotyka się prace, w których zastosowanie określonych dawek regulatorów wzrostu spowodowało supresję wirusa w porażonych tkankach (Omura i Wakimoto 1978, Kartha 1984).

Celem prezentowanych badań jest ocena efektu jaki mieszana infekcja wirusami mozaiki *Cymbidium* i pierścieniowej plamistości *Odontoglossum* wywiera na możliwości regeneracyjne cennego mieszańca międzygatunkowego *Cattleya schönbrunnensis* × *C. leopoldii gutata*, uzyskanego w Ogrodzie Botanicznym Uniwersytetu Jagiellońskiego. Porównywano dynamikę morfogenezy materiału porażonego i zdrowych, uprzednio odwirusowanych, kultur kontrolnych na etapie mikrorozmnażania pędów, uzyskanych w wyniku regeneracji ze stożków wzrostu. Równocześnie sprawdzano efekt chemioterapeutyczny zróżnicowanych dawek zeatyny, benzyloadeniny (BA) oraz kwasu naftylooctowego (NAA) i kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego (2,4-D), dodawanych do pożywek w trakcie inicjacji oraz namnażania kultywowanych tkanek.

Material i metody

Materiał roślinny stanowiły odrębne klony fioletowo kwitnącego mieszańca *Cattleya schönbrunnensis* × *C. leopoldii gutata*: systemicznie porażony wirusami mozaiki *Cymbidium* (CyMV) oraz pierścieniowej plamistości *Odontoglossum* (ORSV) – klon ICCsMI1 oraz zdrowy kontrolny klon HCCs1. Identyfikację wirusów przeprowadzono używając testu biologicznego i serologicznego oraz następujących roślin testowych: *Cassia occidentalis* L., *Chenopodium amaranticolor* Costa i Reyn., *Ch. quinoa* Willd., *Gomphrena globosa* L., *Nicotiana glutinosa* L., *N. tabacum* L. 'Xanthi', *Tetragonia expansa* Murr. (Cybularz i in. 1993). Rośliny donorowe, stanowiące źródło eksplantatów, a następnie zregenerowane pędy testowano na obecność CyMV i ORSV metodą DAS-ELISA, zgodnie z metodyką publikowaną przez Clark i Adams (1977). W celu założenia kultur, pobierane pąki, po 30-sekundowym traktowaniu 70-procentowym alkoholem etylowym, sterylizowano przez 60 s w 0,1-procentowym roztworze chlorku rtęci i trzykrotnie przemywano sterylną wodą destylowaną. Stożki wzrostu wielkości ok. 2-4 mm³ izolowano pod mikroskopem stereoskopowym i umieszczano pojedynczo w probówkach na pożywce MS w modyfikacji Kozak (1991) z dodatkiem 2,0 mg·dm⁻³ siarczanu adeniny, 9,7 mg·dm⁻³ kwasu askorbinowego, 0,5 mg·dm⁻³ zeatyny, 4,95 mg·dm⁻³ BA i 1,0 mg·dm⁻³ NAA, o pH 5,5. Jako źródło węgla stosowano 3-procentową sacharozę. Pożywki zestalano 0,8-procentowym agarem Difco. Kultywację prowadzono w stałej temperaturze wynoszącej 25°C±2°C i wilgotności względnej ok. 70%, w warun-

kach fotoperiodu 16/8 h. Jako źródło światła stosowano lampy fluorescencyjne o białej barwie światła i natężeniu promieniowania $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Pędy otrzymane z eksplantatów pierwotnych namnażano w 100 mililitrowych kolbach Erlenmeyera, po 25 sztuk w każdej, na zmodyfikowanej pożywce MS o tym samym składzie, z dodatkiem $4,95 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ BA, $0,125 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ 2,4-D i $1,0 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ NAA, przy czym pozostałe parametry pozostawiono bez zmian. Pasaże przeprowadzano cyklicznie, co sześć tygodni. Zregenerowane rośliny, po przesadzeniu do doniczek, aklimatyzowano do uprawy w warunkach szklarniowych w komorach wzrostowych o wilgotności względnej wynoszącej 60%, w wymienionych wyżej warunkach fizycznych przez 3 tygodnie, a następnie w szklarni.

W trakcie trwania każdego pasażu prowadzono obserwacje dotyczące efektywności procesu regeneracji. Analizowano następujące parametry: liczba, wielkość, udział procentowy zregenerowanych pędów i korzeni powietrznych, współczynnik namnażania odpowiednio pędów i korzeni, świeża i sucha masa reprezentatywnych prób zregenerowanych organów. Sucha masa oznaczana była zgodnie z metodyką zastosowaną przez Nowak (1999).

Doświadczenie prowadzono dwukrotnie w 15 powtórzeniach dla materiału porażonego wirusem i w takiej samej liczbie powtórzeń w przypadku kontrolnego materiału zdrowego, na pożywce namnożeniowej, traktując kolbę z 25 pędami jako jedno powtórzenie. Otrzymane wyniki oceniano statystycznie używając programu Statistica 6.1 oraz testu F.

Wyniki

Na liściach zawirusowanych roślin donorowych obserwowano podłużne sfaldowania blaszek liściowych oraz przebarwienia i plamy nekrotyczne. W kwiatach następowała deformacja okwiatu, z częstą redukcją poszczególnych jego elementów i roz biciem barwy. W trakcie rozwoju kwiata obserwowano nekrozy stopniowo obejmujące całe powierzchnie listków okwiatu (fot. 1). W porównaniu ze zdrowym materiałem kontrolnym, materiał zawirusowany charakteryzowało rozregulowanie procesu kwitnienia.

Na aseptycznie wyizolowanych stożkach wzrostu następowała proliferacja komórek, a następnie formowanie się zaczątków struktur i organów. Przebieg morfogenezy w kulturach zawirusowanych był niejednokrotnie nierównomierny i zaburzony. Część porażonej tkanki charakteryzowała się stymulacją podziałów komórkowych, jednocześnie rozwój 38% eksplantatów pierwotnych był zahamowany. Z reguły pojawiały się pąki regenerujące z grupy niezróżnicowanych komórek parenchymatycznych – tkanki protokormopodobnej. Protokormy te można było łatwo oddzielać i pasażować. Z pąków rozwijały się pędy, które pasażowano na pożywkę namnożeniową, w której zrezygnowano z zeatyny, natomiast wprowadzono $0,125 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ 2,4-D. Na etapie namnażania uzyskanych pędów stwierdzono, że w trzech kolejnych sześciotygodniowych pasażach wartość współczynnika namnażania kultur zdrowych była bardzo wyrównana i wynosiła od 10 do 11, jedynie w ostatnim pasażu była wyraźnie wyższa – 16,5. W tkance porażonej regeneracja pąków przybyszowych przebiegała ze znacznie mniejszą intensywnością i wartość współczynnika namnażania wahała się od 3,2 do 6,5 w okresie dwudziestu czterech tygodni kultury. Wpływ porażenia wirusowego na możliwości regeneracyjne eksplantatów okazał się statystycznie istotny (tab. 1). Jednocześnie średnia długość 302

Tabela 1

Wpływ infekcji CyMV i ORSV na potencjał regeneracyjny kultur *Cattleya shönbrunensis* × *C. leopoldii gutata* w czterech kolejnych pasażach na pożywce namnozeniowej
The effect of CyMV and ORSV infection on regeneration potential in subsequent four passages of micropropagated *Cattleya shönbrunensis* × *C. leopoldii gutata*

Pasaż/ tkanka Passage/ tissue	Współczyn- nik namna- żania Propagation coefficient	Długość pędów Length of shoots (mm)	Liczba pędów Num- ber of shoots	Liczba korzeni powietrz- nych/pęd Number of aerial roots/shoot	Świeża masa Fresh matter (mg)	Sucha masa Dry matter (mg) × 10
1/kontrola 1/virus free	10,0 ± 1,9 b*	6,8 ± 0,6 e	151	1,0 ± 0,4 d	319,7 ± 39,3 bc	28,7 ± 5,3 c
2/kontrola 2/virus free	10,6 ± 1,2 b	7,4 ± 0,5 de	159	1,1 ± 0,5 d	369,3 ± 46,3 b	28,5 ± 2,6 c
3/kontrola 3/virus free	11,0 ± 0,9 b	11,2 ± 0,7 ab	165	12 ± 0,9 a	625,9 ± 52,4 a	48,3 ± 3,7 b
4/kontrola 4/virus free	16,5 ± 1,0 a	9,2 ± 0,5 cd	249	5,6 ± 1,7 b	681,9 ± 75,6 a	61,4 ± 6,9 a
1/porażona 1/infected	6,5 ± 0,6 c	9,8 ± 0,7 bc	98	2,2 ± 0,5 cd	342,8 ± 33,3 b	28,5 ± 3,4 c
2/porażona 2/infected	5,0 ± 0,5 cd	8,5 ± 0,7 cd	75	2,5 ± 0,5 cd	199,7 ± 34,5 cd	16,4 ± 1,9 d
3/porażona 3/infected	4,3 ± 1,7 d	11,9 ± 0,9 a	65	4,2 ± 0,5 bc	97,6 ± 7,9 de	11,7 ± 1,1 d
4/porażona 4/infected	3,2 ± 0,3 d	12,3 ± 0,6 a	64	3,8 ± 0,4 bc	72,0 ± 6,5 e	9,3 ± 1,0 d

*Średnia z 375 eksplantatów, wartości oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie dla P = 5%.

*Mean of 375 explants, values within column followed by the same letter are not significantly different at P = 5%.

pędów zregenerowanych w kulturach zainfekowanych CyMV i ORSV była większa, wynosiła bowiem od 8,5 do 12,3 mm. Wartości analogicznych średnich 724 pędów zregenerowanych w trakcie półrocznej oceny materiału zdrowego wynosiły od 6,8 do 11,2 mm, zatem zachodziła okresowa stymulacja wzrostu pędów zawirusowanych i jednocześnie osłabienie tempa regeneracji nowych pąków (ryc. 1 i 2). Podczas wszystkich czterech pasażów namnażania zawirusowanych pędów obserwowano dużą liczbę formowanych korzeni powietrznych, zatem w tym materiale centra merystematyczne mogły różnicować się raczej w zawiązki korzeni a nie pędów (fot. 2). Zawirusowane pędy wytwarzały przeciętnie od 2,2 do 4,2 korzeni, których długość sięgała 10 mm (tab. 1). Wyniki prezentowane w tabeli 1 świadczą o tym, że obecność wirusów w tkankach zmniejszyła przyrost ich masy, co potwierdzają zarówno pomiary świeżej, jak i suchej masy, zwłaszcza w ostatnich dwóch ocenianych pasażach. W przeprowadzonym doświadczeniu

Fot. 1. Objawy infekcji mieszanej wirusami mozaiki *Cymbidium* (CyMV) i pierścieniowej plamistości *Odontoglossum* (ORSV) na kwiatach mieszańca *Cattleya schönbrunnensis* × *C. leopoldii gutata*

Phot. 1. Symptoms of *Cymbidium* mosaic virus (CyMV) and *Odontoglossum* ringspot virus (ORSV) coinfection on *Cattleya schönbrunnensis* × *C. leopoldii gutata* flowers

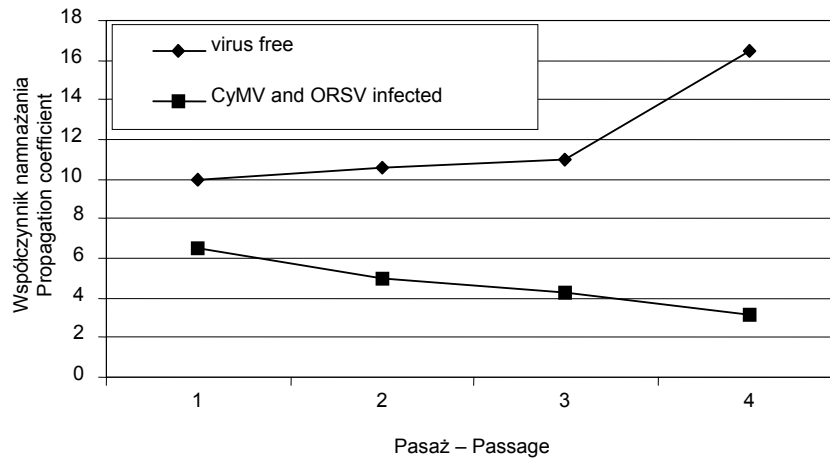


Fot. 2. Porażone pędy, z widocznymi korzeniami powietrznymi, zregenerowane na zmodyfikowanej pożywce MS z dodatkiem 2,0 mg·dm⁻³ siarczanu adeniny, 9,7 mg·dm⁻³ kwasu askorbinowego oraz 0,125 mg·dm⁻³ 2,4-D, 1,0 mg·dm⁻³ NAA, 4,95 mg·dm⁻³ BA

Phot. 2. Infected shoots regenerated on modified MS supplemented with 2.0 dm⁻³ adenine sulphate, 9.7 mg·dm⁻³ ascorbic acid and 0.125 mg·dm⁻³ 2,4-D, 1.0 mg·dm⁻³ NAA, 4.95 mg·dm⁻³ BA, producing aerial roots

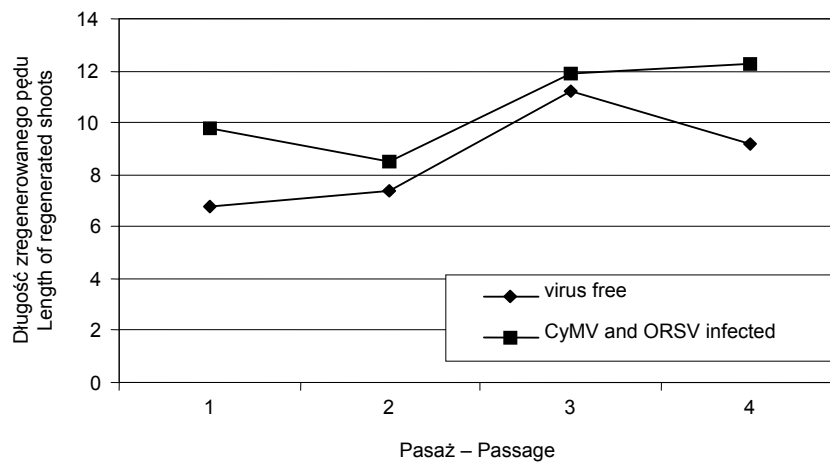


Fot. 3. Aklimatyzowane meriklony *Cattleya schönbrunnensis* × *C. leopoldii gutata*
po przesadzeniu do doniczek
Phot. 3. Acclimatized mericlones of *Cattleya schönbrunnensis* × *C. leopoldii gutata* after
transplanting to pots



Ryc. 1. Wpływ infekcji wirusami CyMV i ORSV na możliwości regeneracji pędów przybyszowych w kulturach *Cattleya*

Fig. 1. Effect of CyMV and ORSV infection on *Cattleya* adventitious shoot regeneration



Ryc. 2. Porównanie tempa wzrostu pędów przybyszowych *Cattleya* w kulturach zdrowych oraz porażonych wirusami CyMV i ORSV

Fig. 2. The comparison of adventitious shoots growth rate in healthy and in CyMV and ORSV infected *Cattleya* cultures

świeża masa kultur porażonych stanowiła 38,7% odpowiedniej wartości kultur kontrolnych, zaś spadek suchej masy wynosił 34,7%. Wszystkie uzyskane w wyniku mikrorozmnazania rośliny aklimatyzowano do uprawy w warunkach szklarniowych (fot. 3). Testy diagnostyczne potwierdziły obecność wirusa pierścieniowej plamistości *Odontoglossum* w aklimatyzowanym materiale pochodzącym z porażonych kultur. W trakcie kultywacji, zgodnie z opisanym wyżej przebiegiem badań, materiału porażonego kompleksem CyMV i ORSV, wyeliminowano jedynie infekcję wirusem mozaiki *Cymbidium*.

Dyskusja

Warunki uprawy roślin donorowych i ich kondycja zdrowotna wywierają jednakowo duży wpływ na przebieg kultywacji izolowanych tkanek i na przebieg procesu morfogenezy *in vitro*. Istotnym czynnikiem jest zaburzenie poziomu endogennych regulatorów wzrostu w zawirusowanych tkankach, między innymi w wyniku akumulacji metabolitów stresu, co jest dobrze udokumentowane w literaturze (**Sequeira** 1973, **Grand** i **Mansfield** 1999). Zaburzenia w procesach morfogenetycznych porażonej tkanki, obserwowane na etapach różnicowania primordiów pędów i korzeni oraz ich rozwoju, stanowią morfologiczną odpowiedź kulturowanych tkanek, wynikającą z modyfikacji szlaków metabolicznych komórek zainfekowanych wirusem. Podobne rezultaty uzyskali **de Vries Paterson i in.** (1992), **Nowak** (1999) oraz **Tsao i in.** (1999) badając tkanki szparaga, śliwy oraz maliny porażonych różnymi wirusami, czyli niezależnie od przynależności systematycznej zarówno patogena, jak i gospodarza wykorzystanych w doświadczeniach.

W zależności od stosowanej techniki regeneracji zawirusowanej tkanki, istnieje potencjalna możliwość jej terapii. Kultury merystemów są stosowane rutynowo w celu uwalniania zainfekowanego materiału od patogenów wirusowych, przy czym zaleca się izolację kopuły merystemu, bez primordiów liściowych, gdyż w trakcie ich rozwoju szybko dochodzi do formowania elementów waskularnych, co sprzyja przeniesieniu wirusa na daleki dystans. Trudności w trakcie tak prowadzonych badań polegały na tym, że eksplantaty merystematyczne *Cattleya* sp. często ulegają nekrotyzacji na skutek oksydacji fenoli, bądź rosną bardzo wolno (**Morel** 1960, **Ishii** 1974, **Walkey** 1980). Dlatego, biorąc pod uwagę masowe rozmnażanie materiału, oceniano możliwość uwolnienia materiału od porażenia CyMV i ORSV gdy eksplantatami pierwotnymi używanymi do inicjacji kultur były stożki wzrostu długości 2-4 mm, czasem wraz z 1-2 związkami liści. Eksplantaty takie charakteryzowały się większą żywotnością i szybszym przyrostem tkanek. Na etapie namnażania pędów wprowadzono 2,4-D w stosunkowo niskiej dawce, by uzyskać efekt supresji infekcji, bez wywołania zmienności w namnażanym materiale roślinnym (**Steward** 1989). Otrzymane rośliny nie wykazywały wyraźnych zmian morfologicznych, lecz zostały uwolnione od porażenia tylko jednym z kompleksu wirusów, wirusem mozaiki *Cymbidium*. Terapeutycznie na kulturowane tkanki mógł również podziałać wysoki poziom cytokininy w pożywce oraz substancji o zbliżonej budowie chemicznej (**Zenkeler** 2001), gdyż zastosowana dawka wynosiła $5,45 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ (zeatyna oraz benzyloadenina) i dodatkowo $2,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ siarczanu adeniny w pożywce inicjacyjnej, a następnie $4,95 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BA, $2,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ siarczanu adeniny, obok wymienianej powyżej dawki silnie działającej syntetycznej auksyny – $0,125 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ 2,4-D w pożywce namnożeniowej. Nie były to jednak wystarczające warunki do eliminacji bardziej stabilnego wirusa pierścieniowej plamistości *Odontoglossum* (**Wisler** 1989, **Zettler i in.** 1990, **Hu i Ferreira** 1994) i z tego powodu jest planowana kontynuacja doświadczeń nad terapią tkanek *Cattleya* porażonych ORSV. Do tej pory nie ukazały się żadne prace dotyczące tego zagadnienia.

Wnioski

1. Współczynnik namnażania zdrowych kultur kontrolnych *Cattleya schönbrennensis* × *C. leopoldii gutata* był bardziej wyrównany i istotnie wyższy aniżeli kultur porażonych CyMV i ORSV.

2. W trakcie mikrorozmnażania materiału porażonego kompleksem wirusów nastąpiło obniżenie poziomu caulogenezy. Jednocześnie poziom ryzogenezy był stały i dość wysoki.

3. Zawirusowane kultury charakteryzowały się przejściową stymulacją rozwoju pędów.

4. Pomiarzy świeżej i suchej masy mogą stanowić parametr wskazujący na depresję w potencjale regeneracyjnym pędów w kulturach zainfekowanych wirusami.

Literatura

- Barcial M.P., Bajet N.B.** (2003): Geographical distribution, detection and symptoms of virus infection in orchids. PCARD-Highlights-2002, R & D Symposium, Philippines: 83-84.
- Champagnat M., Morel G.M.** (1969): Multiplication vegetative des *Cattleya* a partir de bourgeons cultivés *in vitro*. Soc. Bot. Fr. Mem. 116: 111-132.
- Champagnat M., Morel G.M., Mounetou B.** (1970): La multiplication vegetative des *Cattleya* a partir de jeunes feuilles cultivées aseptiquement *in vitro*. Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg. 12/11: 97-114.
- Chen T., Chen J., Chang W.** (2004): Plant regeneration through direct shoot bud formation from leaf cultures of *Paphiopedilum* orchids. Plant Cell Tissue Org. Cult. 76: 11-15.
- Clark MF, Adams AM.** (1977): Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assays. J. Gen. Virol. 34: 475-483.
- Colli S., Kerbaux G.B.** (1993): Direct root tipp conversion of *Catasetum* into protocorm-like bodies. Effect of auxin and cytokinin. Plant Cell Tissue Org. Cult. 33: 39-44.
- Cybularz T., Kobyłko T., Miczyński K., Maj Z.** (1990): Preliminary identification of virus infecting *Cattleya Waltersiana* × *Cattleya H. L. Knoles* × *Cattleya Schönbrunnensis*. Folia Hort. 2/2: 89-98.
- Cybularz T., Kobyłko T., Miczyński K.** (1993): Koegzystencja wirusa mozaiki *Cymbidium* (CyMV) i wirusa pierścieniowej plamistości *Odontoglossum* (ORSV) na mieszańcu z rodzaju *Cattleya*. Acta Agrar. Silvestria Ser. Agrar. 31: 29-40.
- Deogratias J.M., Dosba F., Lutz A.** (1989): Eradication of prune dwarf virus, prunus necrotic ringspot virus, and apple chlorotic leaf spot virus in sweet cherries by a combination of chemotherapy, thermotherapy and *in vitro* culture. Can. J. Plant Pathol. 11: 337-342.
- Grant M., Mansfield J.** (1999): Early events in host-pathogen interactions. Curr. Opin. Plant Biol. 2/4: 312-319.
- Hu J.S., Ferreira S.** (1994): Orchid viruses. Am. Orchid Soc. Bull. 63: 897-898.
- Ishii M.** (1974): Partial elimination of virus from doubly infected orchids by meristem explant culture. Acta Hort. 36: 229-233.
- Kartha K.K.** (1984): Elimination of viruses. Cell Cult. Som. Cell Genet. Plants 1: 577-584.
- Kerbaux G.B., Colli S.** (1997): Increased conversion of apical root meristem of *Catasetum fimbriatum* into protocorm-like body through ethylene. Lindleyana 12: 59-63.
- Kozak D.** (1991): Shoot regeneration from various parts of *Narcissus* cv. Carlton through tissue culture. Pr. Inst. Sadown. Kwiac. Ser. B 16: 41-47.
- Lee Y.L., Lee N.** (2003): Plant regeneration from protokorm-derived callus of *Cypripedium formosanum*. In vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 39: 475-479.

- Morel G.M.** (1964): Tissue culture: a new means of clonal propagation of orchids. *Am. Orchid Soc. Bull.* 33: 473-478.
- Morel G.M.** (1960): Producing virus-free *Cymbidiums*. *Am. Orchid Soc. Bull.* 29: 495-497.
- Murthy H.N., Pyati A.N.** (2001): Micropropagation of *Aerides maculosum* Lindl. (*Orchidaceae*). *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 37: 223-226.
- Nowak B.** (1999): Regeneracja śliwy (*Prunus domestica* L.) odmiany 'Węgierka Zwykła' z eksplantatów porażonych wirusem ospowatości śliw. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.* 469: 581-586.
- Omura T., Wakimoto S.** (1978): Effect of plant hormones on tobacco mosaic virus concentrations in tobacco tissue cultures. *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.* 22: 211-219.
- Peres L.E., Amar S., Kerbauy G.B., Salatino A., Zaffari G.R., Mercier H.** (1999): Effect of auxin, cytokinin and ethylene treatments on the endogenous ethylene and auxin-to-cytokinin ratio related to direct root tip conversion of *Catasetum fimbriatum* Lindl. (*Orchidaceae*) into buds. *J. Plant Physiol.* 155: 551-555.
- Pindel A., Micyński K.** (1996): Regeneration of *Cymbidium* orchids from leaf and root explants. *Folia Hort.* 8/2: 96-105.
- Pindel A., Pindel Z.** (2004): Initiation of in vitro cultures of chosen endangered European species of orchids. *Folia Hort.* 16/2: 111-117.
- Sequeira L.** (1973): Hormone metabolism in diseased plants. *Rev. Plant Physiol.* 24: 353-380.
- Steward J.** (1989): Orchid propagation by tissue culture techniques – past, present and future. W: *Modern method in orchid conservation: the role of physiology, ecology and management.* Red. H.W. Prichard. Cambridge University Press.
- Torres J., Mogollon N.** (1998): Bulk clonal propagation of *Cattleya luddemanniana* Rchb. W: *Proceedings of the Interamerican Society for Tropical Horticulturae.* Guatemala City 1997, 41: 92-98.
- Torres J., Mogollon N., Crane J.H.** (2000): Clonal micropropagation of *Cattleya mossiae* Parker ex Hook. W: *Proceedings of the Interamerican Society for Tropical Horticulturae.* Barquisimeto 1998, 42: 87-92.
- Tsao C.V., Postman J.D., Reed B.M.** (1999): Single and multiple virus infections reduce in vitro multiplication of 'Malling Landmark' raspberry. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 35/3, 41A: 1013.
- De Vries-Paterson R.M., Evans T.A., Stephens C.T.** (1992): The effect of asparagus virus infection on asparagus tissue culture. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 31: 31-35.
- Walkey D.G.A.** (1980): Production of virus-free plants. *Acta Hort.* 88: 23-31.
- Wisler G.C.** (1989): How to control orchid viruses. Maupin House Publishers.
- Zettler W., Ko N., Wisler G.C., Wong S.M.** (1990): Viruses of orchids and their control. *Plant Dis.* 74/9: 621-626.
- Zenkteler E.** (2001): Kultura merystemów i uwalnianie roślin od wirusów. W: *Biotechnologia roślin.* Red. S. Malepszy. PWN, Warszawa: 33-42.
- Znanięcka J., Maczyszyn K., Łojkowska E.** (2004): Asymbiotyczne kiełkowanie czterech gatunków storczyków europejskich *Cypripedium calceolus*, *Dactylorhiza majalis*, *Epipactis palustris* i *Orchis morio* (*Orchidaceae*). W: *Mater. 53 Zjazdu PTB: Przyroda Polski w europejskim dziedzictwie dóbr natury.* 121.

EXPERIMENTS ON MORPHOGENETIC ABILITIES OF *CATTLEYA SHÖNBRUNENSIS* × *C. LEOPOLDII GUTATA* MERICLONES

S u m m a r y

The course of shoot and root regeneration of *Cattleya shönbrunensis* × *C. leopoldii gutata* clone infected with CyMV and ORSV was compared with healthy clone of respective hybrid

during micropropagation stage of previously obtained mericlones. Shoots obtained from meristematic explants were cultured on solidified MS medium modified according to **Kozak** (1991) with addition of $2.0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ adenine sulphate, $9.7 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ascorbic acid and $4.95 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BA, $1.0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA, $0.125 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ 2,4-D. Control healthy tissues were characterized by significantly higher multiplication rate in comparison to the contaminated material, whereas in CyMV and ORSV infected tissues temporal stimulation of shoot development was observed. The values of micropropagation coefficient were from 3.2 to 6.5 in infected material, depending on the examined passage during the six months period. The respective values of control clone were equal, or above ten. Virus infected cultures exhibited rather stable tendency to form aerial roots during every micropropagation passage, contrary to the reaction observed in healthy material. The viral replication in tissues brought about a clear decrease in fresh and dry matter of cultured tissues, the respective values being statistically significant. Plantlets obtained by micropropagation were successfully acclimatized to the greenhouse conditions, irrespective of health condition.