

## **Rozmnażanie *Paphiopedilum insigne* (Wall. ex Lind.) Pfitzer**

### **w kulturach *in vitro***

*Paphiopedilum insigne* (Wall. ex Lind.) Pfitzer jest oryginalnym storczykiem, który z powodzeniem może być wykorzystany na kwiat cięty oraz jako roślina doniczkowa. W Polsce jest to gatunek mało znany, poszukiwany głównie przez hobbystów. Roślina ta jest dostępna na rynku przede wszystkim zimą, kiedy przypada okres jej kwitnienia, a wysoka cena i niewielka dostępność *P. insigne* decydują o jego znikomej popularności.

Mając na uwadze powyższe, podjęto badania, których celem było opracowanie technologii efektywnej produkcji *P. insigne* w kulturach tkankowych.

W pierwszym etapie określono wpływ odkażania torebek nasiennych w następujących substancjach: 0,5% AgNO<sub>3</sub> (20 min), 0,1% HgCl<sub>2</sub> (5 s), 1% NaOCl (30 min) lub 96% alkohol etylowy z opalaniem w ogniu, a także zastosowanie zestalonej pożywki dwufazowej z fazą w postaci: sterylnej wody, płynnego podłoża ¼ MS, roztworu GA<sub>3</sub> w stężeniu 400 mg·dm<sup>-3</sup> lub bez dodatku drugiej fazy, na kiełkowanie nasion *P. insigne*. Dezynfekcja torebek nasiennych poprzez zanurzenie w 96% etanolu, a następnie opalenie w ogniu pozwoliły na uzyskanie czystych kultur i wysokiego współczynnika regeneracji. Dodatek fazy ciekłej do podłoża zestalonego też korzystnie wpływał na tworzenie protokormów.

W celu uzyskania dobrej jakości regenerantów oraz wysokiego współczynnika rozmnażania, prowadzono badania dotyczące wpływu regulatorów wzrostu oraz naturalnych substancji biologicznie czynnych na współczynnik multiplikacji oraz cechy morfologiczne regenerantów. Uzyskane protokormy wykładano na pożywki uzupełnione: 1 mg·dm<sup>-3</sup> BA + 5 mg·dm<sup>-3</sup> KIN; 1 mg·dm<sup>-3</sup> BA + 2 mg·dm<sup>-3</sup> TDZ; 1 g·dm<sup>-3</sup> BA + 1 mg·dm<sup>-3</sup> hydrolizatu kazeiny (CH); 1 g·dm<sup>-3</sup> CH; 5 mg·dm<sup>-3</sup> TDZ + 1 mg·dm<sup>-3</sup> 2,4-D. Wykazano, że uzupełnienie pożywki 1 mg·dm<sup>-3</sup> BA łącznie z 5 mg·dm<sup>-3</sup> KIN lub 2 mg·dm<sup>-3</sup> TDZ stymuluje wzrost i rozwój protokormów w rozety. Oceniono też wpływ cytokinin: BA, TDZ i KIN dodanych do pożywki w różnych stężeniach, pojedynczo lub w kombinacjach na wzrost i rozwój rozet *P. insigne in vitro*. Stwierdzono, że uzupełnienie pożywki BA w stężeniu 0,5 mg·dm<sup>-3</sup> pozwoliło na uzyskanie wysokiego współczynnika rozmnażania. W trakcie prowadzonych badań porównano także wzrost i rozwój regenerantów na pożywkach ½ MS oraz VW uzupełnionych regulatorami wzrostu oraz substancjami biologicznie czynnymi pochodzenia naturalnego: 5 mg·dm<sup>-3</sup> KIN + 1 mg·dm<sup>-3</sup> BA; 1 g·dm<sup>-3</sup> CH; 1 mg·dm<sup>-3</sup> BA

+ 2 mg·dm<sup>-3</sup> TDZ; 1 g·dm<sup>-3</sup> CH + 1 mg·dm<sup>-3</sup> BA, wodą kokosową (CW) w stężeniu 15 i 20% oraz pulpą z banana (BP) w stężeniu 20 lub 30 g·dm<sup>-3</sup>. Nie wykazano istotnego wpływu rodzaju pożywki na współczynnik rozmnażania. Stwierdzono natomiast, że wysoki współczynnik rozmnażania można uzyskać zastępując cytokininy hydrolizatem kazeiny w stężeniu 1 g·dm<sup>-3</sup>.

Poważnym problemem w kulturach *in vitro* są związki fenolowe, wytwarzane przez rośliny w odpowiedzi na reakcję stresową, jaką jest np. zranienie tkanki podczas pasażowania. Określono wpływ kwasu askorbinowego (AA): 10, 20, 30 mg·dm<sup>-3</sup> lub węgla aktywnego (AC) w stężeniach 1, 2 lub 4 g·dm<sup>-3</sup> na multiplikację, cechy morfologiczne oraz zawartość o-dihydroksyfenoli w liściach kultywowanych roślin. Stwierdzono, że zastosowanie 10 mg·dm<sup>-3</sup> AA lub 1-2 g·dm<sup>-3</sup> AC pozwoliło na zmniejszenie zawartości związków fenolowych w liściach kultywowanych roślin, a najwyższy współczynnik rozmnażania uzyskano w obecności 2 g·dm<sup>-3</sup> AC. Wykazano również, że 1 mg·dm<sup>-3</sup> AC stymuluje rozwój systemu korzeniowego badanego gatunku.

Za prawidłowy wzrost i rozwój roślin podczas aklimatyzacji odpowiedzialny jest dobrze rozwinięty system korzeniowy. W ostatnim etapie badań określono wpływ auksyn tj. NAA, IAA lub IBA w stężeniach: 0,5; 1; 2,5; 5 mg·dm<sup>-3</sup> na ukorzenianie *P. insigne in vitro*. Wykazano, że na pożywkach uzupełnionych IAA w stężeniach 0,5-1 mg·dm<sup>-3</sup> lub IBA w stężeniach 1-2,5 mg·dm<sup>-3</sup> 100% eksplantatów wytworzyło korzenie.

Ostatnim etapem prowadzonych badań była aklimatyzacja uzyskanych mikrosadzonek do warunków *ex vitro*. Mikrosadzonki kultywowano *in vitro* na pożywkach uzupełnionych auksynami: IAA lub IBA w stężeniu 1 mg·dm<sup>-3</sup>, a następnie umieszczano w pojemnikach wypełnionych podłożami: mech torfowiec, mech torfowiec + podłoże do storczyków 1:1 (v:v), podłoże do storczyków, podłoże do storczyków + torf kwaśny 1:1 (v:v). W wyniku suplementacji pożywki 1 mg·dm<sup>-3</sup> IAA oraz aklimatyzacji mikrosadzonek w podłożu dla storczyków, najwięcej roślin przeżyło aklimatyzację. Rośliny aklimatyzowane w podłożu do storczyków charakteryzują się najlepszymi parametrami stanu fizjologicznego, o czym świadczą wartości maksymalnej fotochemicznej wydajności kwantowej fotosystemu II ( $F_v/F_m$ ), względnej zawartości wody (RWC) i deficyt wysycenia wodą (WSD). Zastosowane podłoża wpływały na zmiany aktywności enzymów stresu oksydacyjnego, jednak uzyskane wyniki nie są jednoznaczne i wymagają dalszych badań.

## **Propagation of *Paphiopedilum insigne* (Wall. ex Lind.) Pfitzer in tissue culture**

*Paphiopedilum insigne* (Wall. Ex Lind.) Pfitzer is an original orchid that can be successfully used as a cut flower and as a pot plant. In Poland, it is a little-known species, sought mainly by hobbyists. This plant is available on the market only in winter, when it blooms, and the high price and low availability of *P. insigne* determine its negligible popularity.

Considering the above, research was undertaken aimed at developing a technology for the effective production of *P. insigne* in tissue cultures.

In the first stage, was to estimate the influence of the disinfection of the seed capsules in the following substances was investigated: 0.5% AgNO<sub>3</sub> (20 min), 0.1% HgCl<sub>2</sub> (5 s), 1% NaOCl (30 min) or immersed in a 96% ethanol and burned in a direct flame, as well as the use of a solidified two-phase medium with a liquid phase in the form of: sterile water, liquid medium  $\frac{1}{4}$  MS, GA<sub>3</sub> solution at a concentration of 400 mg·dm<sup>-3</sup> or without the addition of a second phase, for the germination of *P. insigne* seeds. Seed capsule disinfection by immersion in 96% ethanol and burned in the direct flame allowed to obtain cultures free of contamination and with the highest number of regenerated protocorms. The addition of the liquid phase to the solidified substrate also had a positive effect on the formation of protocorms.

In order to obtain good quality regenerants and a high multiplication rate, in presented studies were carried out on the effect of growth regulators and natural biologically active substances on the multiplication and morphological features of *P. insigne*. The obtained protocorms were transferred on media supplemented with: 1 mg·dm<sup>-3</sup> BA + 5 mg·dm<sup>-3</sup> KIN; 1 mg·dm<sup>-3</sup> BA + 2 mg·dm<sup>-3</sup> TDZ; 1 g·dm<sup>-3</sup> BA + 1 mg·dm<sup>-3</sup> hydrolizatu kazeiny (CH); 1 g·dm<sup>-3</sup> CH; 5 mg·dm<sup>-3</sup> TDZ + 1 mg·dm<sup>-3</sup> 2,4-D. It has been shown that in order to obtain good quality *P. insigne* microseedlings, it is advisable to supplement the medium with 1 mg·dm<sup>-3</sup> BA + 2 mg·dm<sup>-3</sup> TDZ or 5 mg·dm<sup>-3</sup> KIN + 1 mg·dm<sup>-3</sup> BA. The influence of cytokinins BA, TDZ and KIN added to the medium in various concentrations, individually or in combination, on the growth and development of *P. insigne* rosettes *in vitro* was rated. It was found that supplementing the BA medium in the concentration of 0.5 mg·dm<sup>-3</sup> allowed to obtain a high multiplication rate. During the research, the growth and development of regenerants on  $\frac{1}{2}$  MS and VW media supplemented with growth regulators and biologically active substances of natural origin were also compared: 5 mg·dm<sup>-3</sup> KIN + 1 mg·dm<sup>-3</sup> BA; 1 g·dm<sup>-3</sup> CH; 1 mg·dm<sup>-3</sup> BA + 2 mg·dm<sup>-3</sup> TDZ; 1 g·dm<sup>-3</sup> CH + 1 mg·dm<sup>-3</sup> BA, coconut water (CW) at a concentration

of 15 and 20% and banana pulp (BP) at a concentration of 20 or 30 g·dm<sup>-3</sup>. On the basis of the obtained results, it was shown that the ½ MS medium can be successfully used for cultivation cultures of *P. insigne*, and its preparation requires less costs and effort. It was also found that a highest multiplication rate can be obtained by replacing cytokinins with casein hydrolyzate at a concentration of 1 g·dm<sup>-3</sup>.

A serious problem in *in vitro* cultures are the phenolic compounds produced by plants in response to a stress, such as injury to tissue during passage. The influence of ascorbic acid (AA) was determined: 10, 20, 30 mg·dm<sup>-3</sup> or activated carcoal (AC) in concentrations of 1, 2 or 4 g·dm<sup>-3</sup> on multiplication, morphological features and the content of o-dihydroxyphenols in the leaves of cultivated plants. It was found that the use of 10 AA mg·dm<sup>-3</sup> allowed to reduce the content of phenolic compounds in the leaves of cultivated plants, and the highest multiplication rate was obtained in the presence of 2 g·dm<sup>-3</sup> AC. It was also shown that 1 mg·dm<sup>-3</sup> AC stimulates the development of the root system of the studied species.

A well-developed root system is responsible for the proper growth and development of plants during acclimatization. In the last stage of the study, the influence of auxins, ie NAA, IAA or IBA, in concentrations of: 0.5; 1; 2.5; 5 mg·dm<sup>-3</sup> for rooting *P. insigne in vitro*. It was shown that on media supplemented with IAA in concentrations of 0.5-1 mg·dm<sup>-3</sup> or IBA in concentrations of 1-2.5 mg·dm<sup>-3</sup>, 100% of the explants developed roots.

The final stage of the research was the acclimatization of the obtained microseedlings to *ex vitro* conditions. Microplants were cultivated *in vitro* on media supplemented with auxins: IAA or IBA at a concentration of 1 mg·dm<sup>-3</sup>, and then placed in containers filled with the following media: sphagnum moss, sphagnum moss + orchid substrate 1: 1 (v: v), orchid substrate, substrate for orchids + acid peat 1:1 (v:v). As a result of supplementation the medium with 1 mg·dm<sup>-3</sup> IAA and the acclimatization of the microseedlings in the substrate for orchids, most plants survived the acclimatization. Plants acclimatized in the substrat for orchid are characterized by the best parameters of the physiological state, as evidenced by the values of the maximum photochemical quantum yield of photosystem II (Fv/Fm), relative water content (RWC) and water saturation deficit (WSD).