

Marković M., Tanasić M., Stojić N., Bulatović R., Jović M., Vidojković S., Stanković D. 2012. *Improvement of Micropropagation Protocol of Phalaenopsis sp. for the Method of Direct Shoot Regeneration from Nodes of Floral Spikes*. Bulletin of the Faculty of Forestry 106: 141-150.

Марија Марковић
Милош Танасић
Невена Стојић
Радивоје Булатовић
Марта Јовић
Слободан Видојковић
Душан Станковић

UDK: 635.9:582.594:581.165.7
Оригинални научни рад
DOI: 10.2298/GSF1206141M

УНАПРЕЂЕЊЕ ПРОТОКОЛА ЗА МИКРОПРОПАГАЦИЈУ *PHALAENOPSIS* SP. ДИРЕКТНОМ РЕГЕНЕРАЦИЈОМ ИЗДАНАКА ИЗ НОДУСНИХ РЕЗНИЦА

Извод: У раду је успешно испитана могућност модификације протокола микропропагације *Phalaenopsis* sp. са циљем поједностављења самог поступка уз смањење трошкова. Резултати истраживања су показали да се поједине компоненте подлоге (екстракт течног ендосперма кокосовог ораха, глутамин и морфолин-етан сулфонска киселина) могу изоставити, а поједине, као што је пептон могу заменити доступнијим и јефтинијим (сојино брашно) без губитка на квалитету произведених биљака. Фактор мултипликације у раду је износио 7,6 изданака по експлантату након 150 дана гајења у култури *in vitro*, а истовремено на истој хранљивој подлози 60% експлантата је образовало коренов систем који је углавном био добро развијен.

мр Марија Марковић, асистент, Универзитет у Београду – Шумарски факултет, Београд (e-mail: marija.markovic@sfb.bg.ac.rs)

дипл. инж. Милош Танасић, Универзитет у Београду – Шумарски факултет, Одсек за пејзажну архитектуру и хортикултуру

дипл. инж. Невена Стојић, Универзитет у Београду – Шумарски факултет, Одсек за пејзажну архитектуру и хортикултуру

дипл. инж. Радивоје Булатовић, Универзитет у Београду – Шумарски факултет, Одсек за пејзажну архитектуру и хортикултуру

дипл. инж. Марта Јовић, Универзитет у Београду – Шумарски факултет, Одсек за пејзажну архитектуру и хортикултуру

дипл. инж. Слободан Видојковић, Универзитет у Београду – Шумарски факултет, Одсек за пејзажну архитектуру и хортикултуру

дипл. инж. Душан Станковић, Универзитет у Београду – Шумарски факултет, Одсек за пејзажну архитектуру и хортикултуру

Кључне речи: микропропагација, *Phalaenopsis* sp., мултипликација изданака, производња орхидеја

IMPROVEMENT OF MICROPROPAGATION PROTOCOL OF *PHALAE-NOPSIS* SP. FOR THE METHOD OF DIRECT SHOOT REGENERATION FROM NODES OF FLORAL SPIKES

Abstract: This paper successfully investigated the possibility of modification of the micropropagation protocol of *Phalaenopsis* sp. with an aim to simplify the procedure and reduce the costs. The obtained results show that some medium components can be successfully omitted (coconut water, glutamine, 2-morpholinoethanesulfonic acid) and some of them (peptone) can be replaced with a cheaper constituent (soy flour) while preserving the quality of the obtained microplants. The multiplication rate was 7,6 shoots per explant after the period of 150 days of cultivation *in vitro*. On the same medium 60% of explants were rooted and roots were mostly well developed.

Key words: micropropagation, *Phalaenopsis* sp., shoots multiplication, orchids production

1. УВОД

Микропропагација представља методу вегетативног размножавања чијом применом се из малих делова биљака (ембриони, семе, пупољци, апикални меристем, калус, појединачне ћелије) на вештачким храњивим подлогама, у стерилним условима регенеришу нове биљке. Она омогућава добијање висококвалитетног и здравог садног материјала у кратком временском периоду, јер се производња одвија у контролисаним условима, не постоји зависност од годишњих доба, велика је уштеда на простору и времену неопходном за гајење, потребна је мала количина иницијалног биљног материјала због чега се не морају формирати велики матичњаци, а коефицијент мултипликације је висок. Међутим, ова метода има и својих недостатака међу којима су најзначајнији велика почетна улагања за опремање лабораторије и велика цена рада високо квалификоване радне снаге. (Dole, Wilkins, 2004, Grbić, 2004, Mišić, 2004).

Данас се микропропагација користи у масовној производњи многих комерцијално значајних таксона, а велики број њих се масовно размножава искључиво методом микропропагације. Међу њима су култивари цветно декоративних биљака који припадају родовима *Lilium* sp., *Gerbera* sp., *Alstroemeria* sp., *Anthurium* sp., фамилији *Orchidaceae*, као и бројни лиснодекоративни таксони (Dole, Wilkins, 2004).

У комерцијалној производњи микропропагација први пут почиње да се користи приликом вегетативног размножавања орхидеја, шездесетих година прошлог века (Pierik, 1990). У *ex vitro* условима при вегетативном размножавању орхидеја, би било потребно и до десет година да се добије нова биљка, а генеративно размножавање би било веома отежано јер је семе ситно, без ендосперма и да би

клијало неопходно је присуство симбиотских гљива које обезбеђују неопходне хранљиве материје (Pierik, 1990). Због тога је култура ткива једини начин који се може ефикасно користити у размножавању орхидеја. До данас, велики број истраживача се бавио изналажењем оптималних услова микропропагације различитих врста орхидеја, користећи хранљиве подлоге различитог састава и различите типове експланата (меристем, листове, сегменте стабљика, итд.) како би процес добијања уједначених и квалитетних биљака био што једноставнији (Tisserat, Jones, 1999).

Међу комерцијално значајним родовима орхидеја је и *Phalenopsis* sp. који је уједно и најмање захтеван у односу на остале родове који се комерцијално гаје, а његова производња, односно читав процес добијања биљака способних за пласман је краћи (до 15 месеци) и једноставнији у односу на *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Paphiopedilium*, *Cattleya* (преко 2 године) (Dole, Wilkins, 2004). Интересантно је да је поступак микропропагације за *Phalaenopsis* развијен касније у односу на друге орхидеје, почетком седамдесетих година прошлог века, јер примена уобичајених протокола за орхидеје је код култивара *Phalaenopsis* резултирала соматклоналним варијацијама (Griesbach, 2002). Ипак, истраживање оптималних услова размножавања *Phalaenopsis* sp. културом ткива није изгубило на актуелности и до данас су спроведена бројна истраживања везана за микропропагацију култивара овог рода, користећи различите експланте, међу којима су сегменти интернодија цветног стабла, сегменти листова, врхови коренова, аксиларни пупољци на цветном стаблу (Tse *et al.*, 1971, Reisinger *et al.*, 1976, Tokuhara, Mii, 1993, Arrditti, Ernst, 1993, Ichihashi, 1997, Ishii *et al.*, 1998, Park *et al.*, 2002). Кошир *et al.* (2004) препоручују директну регенерацију изданака из нодуса цветних стабала као метод којим се могућност појаве соматклоналних варијација своди на минимум, при том спроведећи детаљна истраживања која су имала за циљ изналажење једноставног протокола за поменути метод размножавања. Међутим, поставља се питање колико је примена резултата које су добили Кошир *et al.* (2004) компликована и скупа, односно да ли се њихов протокол може додатно модификовати тако да постане доступан и слабије опремљеним лабораторијама, без великих улагања. На овај начин би комерцијално размножавање *Phalaenopsis* sp. било једноставније и не би било доступно само уско специјализованим и скупим лабораторијама, већ би било прихватљивије за мале произвођаче, колекционаре и хобисте јер данас „кућно” размножавање појединих биљака културом ткива постаје све популарније (Home tissue culture Group, 2012).

Могућност економичне производње украсних биљака код нас путем микропропагације, без нарушавања квалитета и продуктивности су испитивали Grbić и Radanov (1992). Циљ њихових истраживања је био, између осталог и да се пронађе економичан начин за оснивање мањих лабораторија за културу ткива у оквиру расадника и тиме омогући примена микропропагације у условима наше расадничке производње. Применом резултата њихових истраживања трошкови оснивања лабораторије су сведени на невероватних 2% од средстава потребних за набавку класичне опреме у доба објављивања рада.

Поред опреме, велики значај у микропропагацији има сложеност целог поступка што доводи до потребе за високо квалификованом радном снагом. Већина врста које се размножавају микропропагацијом се могу гајити на стандарним стерилним подлогама са додатком агара и макро и микроелемената, најчешће MS раствора минералних соли (Murashige, Skoog, 1962), уз додаток одговарајућег баланса фитохормона (Vinterhalter, Vinterhalter, 1997). Међутим, састав хранљиве подлоге код орхидеја је нешто сложенији и обично укључује и додавање течног ендосперма кокосовог ораха, пептона, као и глутамин (Sinha *et al.*, 2007). Vinteralter и Vinterhalter (1997) наводе да се неке компоненте (као што је миоинозитол) додају у хранљиве подлоге често по аутоматизму, јер су се показале успешним код других врста, што не мора да значи да су неопходне и код испитиване врсте. Водећи се тиме, циљ наших истраживања је био да се установи да ли се састав хранљиве подлоге за размножавање орхидеја може поједноставити и да ли се његовом модификацијом могу смањити трошкови. У том смислу, испитана је могућност микропропагације одабраног култивара *Phalaenopsis* "Pink Butterfly" на подлогама на којима су изостављени течни ендосперм кокосовог ораха и глутамин, а уместо пептона је на основу истраживања везаних за подлоге за клијање спора гљива употребљено сојино брашно (Radulić, 1996). Такође, сахароза која је додавана у хранљиве подлоге није била *pro analysi* чистоће, већ је коришћена десет пута јефтинија сахароза намењена људској исхрани која је углавном задовољавајуће чистоће за микропропагацију многих врста (Thore *et al.*, 2008), али не постоје подаци о њеном коришћењу приликом размножавања орхидеја.

2. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА

За истраживање је одабрана здрава матична биљка *Phalaenopsis* "Pink Butterfly" која је набављена у малопродајном објекту у Београду. Одабрана биљка је имала образована три цветна стабла са којих су узети пупољци који су коришћени као иницијални материјал за успостављање културе *in vitro* у новембру 2011. године. Сав материјал је био пореклом од једне матичне биљке.

Са цветних стабала су исецане нодусне резнице дужине око 3 cm. Сваки нодус је имао дормантан латерални пупољак са ког је пажљиво уклоњена брактеја, а затим је извршена површинска стерилизација у 4% раствору NaOCl са додатком 2-3 капи препарата Tween 20. Стерилизација је трајала 10 минута, а затим су резнице испране у ламинарној комори 3 пута по два минута стерилном дестилованом водом и постављене на медијум. Приликом постављања на медијум, крајеви резница дужине 5-7 mm су одсечени.

Хранљива подлога за мултипликацију изданака је имала модификован и поједностављен састав. Кошиг *et al.* (2004) су тестирали ефекат неколико медијума које различити аутори препоручују за микропропагацију фаленописиса. Најповољније резултате су добили коришћењем комерцијалне подлоге Р 6793 коју производи Sigma (2011) (табела 1). Водећи се резултатима њихових истраживања,

Табела 1. Састав хранљиве подлоге

Table 1. Medium components

Компоненте Components	Модификована подлога Modified medium mg/L	P 6793 (Sigma) mg/L
Неорганске компоненте/Inorganic		
KNO ₃	950,0	950,0
NH ₄ NO ₃	825,0	825,0
*MgSO ₄ x 7H ₂ O	185,0	-
**MgSO ₄	-	90,35
*CaCl ₂ x 2H ₂ O	220,0	-
**CaCl ₂	-	166,0
KH ₂ PO ₄	85,0	85,0
*MnSO ₄ x 4H ₂ O	11,15	-
**MnSO ₄ x H ₂ O	-	8,45
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	4,3	5,3
H ₃ BO ₃	3,1	3,1
KI	0,415	0,415
NaMoO ₄ x 2H ₂ O	0,125	0,125
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,0125	0,0125
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,0125	0,0125
FeSO ₄ x 7H ₂ O	13,9	27,8
Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	18,6	37,24
Органске компоненте/Organic		
Тиамин HCl/Thiamine HCl	0,025	1,0
Никотинска киселина/Nicotinic acid	0,125	0,5
Глицин/Glycine	0,5	-
Активан угаљ/Activated charcoal	1500	-
Мио-инозитол/Myo-inositol	-	100
Пептон/peptone	-	2000
Сојино брашно/Soy flour	2000	-
MES	-	1000
ВАР	2,0	2,0
NAA	0,5	0,5
Сахароза/Sucrose	20000	20000

Легенда/Legend: *Хидратне соли у пола концентрације према Murashige, Skoog, (1962)/Hydrated salts in half-strength concentration of MS complex according to Murashige, Skoog, (1962); **Соли са мањим садржајем кристалне воде према спецификацији производа (Sigma, 2011), при том су концентрације соли идентичне у обе подлоге када се обрачунају молекули воде/Hydrated salts according to Sigma medium composition with a smaller number of molecules of water of crystallization; MES - Морфолин-етан сулфонска киселина/2-Morpholinoethanesulfonic acid; ВАР - Бензиламинопурин/Benzylaminopurine; NAA - Нафтилсирћетна киселина/Naphthalene acetic acid;

као и препорукама Sinha *et al.* (2010) користили смо подлогу која је садржала MS (Murashige, Skoog, 1962) минералне и органске компоненте у упула мањој концентрацији, као и 2% сахарозу, 8% агар, 2 g/L сојиног брашна (уместо пептона) и 1,5 g/L активног угља, 2 mg/L ВАР (бензил-аминопурин) и 0,5 mg/L NAA (нафтил-сирћетна киселина) (табела 1). Пре аутоклавирања на притиску од 1,5 atm и температури од 120° C у трајању од 20 минута, подешена је рН вредност медијума на 5,3 додавањем 0,1 N HCl и 0,1 N NaOH. Након тога је подлога разливена у стаклене посуде, запремине 120 mL, пречника 3,5 cm, са 30-35 mL по посуди које су затворене затварачима од газе, вате и алуминијумске фолије.

Културе су гајене у собним условима, без регулације фотопериода, при температури која се кретала између 20°С и 28°С. Трајање субкултуре је било 30 дана.

Након сваке субкултуре одређен је број изданака, као и појава ожиљавања, а добијени подаци су статистички анализирани у одговарајућем статистичком програму, при чему су одређени: стандарна девијација узорка, стандарна грешка аритметичке средине и коефицијент варијације.

3. РЕЗУЛТАТИ СА ДИСКУСИЈОМ

Иницијална фаза је успешно обављена, свега 14,3% постављених резница је било контаминирано (2 резнице од 14 постављених). Контаминација се испољила после 5-7 дана након постављања резница, а контаминирани резнице су поново стерилисане и постављене на свеж медијум.

Након 20 дана по постављању код свих резница, укључујући и контаминирани (поново стерилисане) дошло је до пролиферације дормантних пупољака, што се и очекивало у складу са резултатима које су добили Кошиг *et al.* (2004). Пупољци су развили кратке изданке дужине око 1 cm, који су 30 дана од постављања одвојени од стабљике и постављени на свеж медијум.

У другој субкултури изданци су развили листове, 2-5 листова по постављеном експлантату, а код појединих експлантата у пазуху листова је дошло до пролиферације пупољака. Формирани бусенови су пребачени на свеж медијум, а од треће субкултуре, број нових пупољака дужине преко 5 mm, који се могу одвојити од матичног бусена и поставити на свеж медијум је евидентиран. Подаци добијени у трећој, четвртој и петој субкултури приказани су у табели 2. Због малог броја експлантата као и због разлика у величини и степену развијености бусенова, наведене три субкултуре нису могле да се посматрају као понављања експеримента, па је приликом статистичке обраде података одређена само стандарна девијација узорка, као и стандарна грешка аритметичке средине и коефицијент варијације.

Као што се у табели 2 може видети број нових изданака који су се развили из аксиларних пупољака након 30 дана гајења у култури *in vitro* достигао је највише 3, док код одређеног броја изданака није дошло до пролиферације пупољака. Углавном су у питању млади изданци који су одвојени од матичне биљке и током субкултуре су само развили листове.

Табела 2. Број нових изданака који се развио по експлантату након 30 дана гајења у култури *in vitro*

Table 2. Number of newly developed shoots per explant after 30 days of *in vitro* culture

Субкултура Subculture	min	max	X ± se	Sx	V (%)
3.	0	3	1,3 ± 0,48	0,91	76,6
4.	0	3	1,5 ± 0,55	1,08	68,8
5.	0	3	1,4 ± 0,46	0,87	66,5

Легенда/Legend: X ± se - средња вредност ± стандардна грешка аритметичке средине при интервалу поверења од 95%/mean ± standard error with a 95,0% confidence interval; Sx - стандардна девијација аритметичке средине/standard deviation; V- коефицијент варијације/coefficient of variation;

Као што се у табели 2 може видети број нових изданака који су се развили из аксиларних пупољака након 30 дана гајења у култури *in vitro* достигао је највише 3, док код одређеног броја изданака није дошло до пролиферације пупољака. Углавном су у питању млади изданци који су одвојени од матичне биљке и током субкултуре су само развили листове.

Просечан број изданака је био најмањи у трећој субкултури (1,3), а незнатно виши у остале две, 1,5 и 1,4 респективно. Добијени резултат је сасвим задовољавајући ако се узме у обзир да су за 160 дана (5 субкултура) гајења у култури *in vitro* Кошиг *et al.* (2004) најповољнији резултат добили на Р 6793 подлози, од 14 експлантата укупно 117 нових изданака (117/14 = 8,35 по експлантату). За 5 субкултура (150 дана), са фактором мултипликације 1,5 добили бисмо 7,6 нових изданака, што је када се узме у обзир степен модификације медијума, као и варирање температуре и фотопериода током раста култура, сасвим задовољавајућа вредност, незнатно нижа од 8,35. Шта више, може се очекивати да су на овај начин добијене биљке већ током саме микропропагације постепено прилагођене на температурне осцилације и разлике у осветљености чиме ће и њихова аклиматизација бити лакша. У односу на резултате које су Кошиг *et al.* (2004) добили са осталим типовима хранљивих подлога, према препорукама Arditti и Ernst (1993), Tisserat и Jones (1999), резултати приказани у нашем раду су далеко повољнији.

Интересантно је да су изданци током наших истраживања, упркос високој концентрацији ВАР-а (2 mg/L) формирали коренове (слика 1). Коренови су формиранли након 60 дана гајења (2 субкултуре), 1 - 4 коренова по експлантату, код 60% постављених експлантата. Дужина коренова се кретала од 1 - 5 cm. Кошиг *et al.* (2004) су коренове код малог броја биљака добили на подлози Р 6793, као и на подлози која је садржала само ВАР (2 mg/L) без ауксина, а највећи број експлантата у њиховом раду је регенерисао коренове на подлози без фитохормона. У последња два случаја састав подлоге је био исти (са изузетком ВАР-а), а разликовао се од подлоге Р 6793 према садржају макро соли, при чему се значајна разлика огледа



Слика 1. Ожиљени изданци *Phalaenopsis* sp.
Figure 1. Rooted shoots of *Phalaenopsis* sp.

у знатном смањењу садржаја гвожђа, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ је потпуно изостављен, а концентрација хелата $\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$ смањена, што је присутно и у нашем раду где је концентрација $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ и $\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$ упола нижа у односу на Р 6793 (табела 1). Тиме се потврђује претпоставка коју су изнели Кошић *et al.*, (2004) да смањење садржаја гвожђа у подлози подстиче формирање коренова приликом микропропагације фаленописиса.

4. ЗАКЉУЧАК

Основни циљ наших истраживања је постигнут, уз смањење трошкова и поједностављење састава хранљиве подлоге добијене су виталне биљке, уз релативно висок фактор мултипликације.

Сојино брашно се може користити уместо пептона, а кокосово млеко (екстракт течног ендосперма), глутамин и морфолин-етан сулфонска киселина се могу изоставити у хранљивим подлогама за микропропагацију фаленописиса.

Такође, уместо сахарозе лабораторијске чистоће успешно се може користити сахароза намењена људској исхрани чиме се цена ове компоненте смањује десет пута.

На формирање коренова значајно утиче смањење концентрације гвожђа у хранљивој подлози, мада се препоручује да се спроведу додатна истраживања која би укључила испитивање утицаја различитих концентрација ауксина на ожиљавање изданака.

Свакако да се на приказани начин не може постићи велики обим и квалитет производње какав се постиже у великим комерцијалним лабораторијама у свету, али

је приказани метод више него користан за мале обиме производње, где су захтеви тржишта ограничени, где је хиперпродукција економски неоправдана и где се за релативно кратко време може добити потребан број биљака. Не треба заборавити ни мање значајну предност приказане методе, која због своје једноставности доприноси популаризацији културе ткива, јер на приказани начин *Phalaenopsis* могу размножавати колекционари и уопште људи којима је цвећарство хоби.

ЛИТЕРАТУРА

- Arditti J., Ernst R. (1993): *Micropropagation of orchids*. John Wiley & Sons, New York, USA
- Dole J.M., Wilkins H.F. (2004): *Floriculture, Principles and Species*. 2nd ed. Pearson Prentice Hall, New Jersey
- Grbić M. (2004): *Vegetativno razmnožavanje ukrasnog drveća i žbunja*, I.P. „Tragovi”, I.K.P. „Ne&Bo”, Beograd (273-294)
- Grbić M., Radanov S. (1992): *Jedan ekonomičan način za komercijalnu proizvodnju ukrasnih biljaka kulture tkiva*, Glasnik Šumarskog fakulteta 74, knj. 2, Univerzitet u Beogradu - Šumarski fakultet, Beograd (545-552)
- Griesbach R.J. (2002): *Development of Phalaenopsis Orchids for the Mass-Market. "Trends in new crops and new uses"*, ASHS Press, Alexandria, VA. (458-465)
- Home Tissue Culture Group (<http://www.hometissueculture.org/>) (accessed/приступљено септембра 2012.)
- Ichihashi S. (1997): *Research on micropropagation of Cymbidium, nobile-type Dendrobium, and Phalaenopsis in Japan*, "Orchid Biology: Reviews and Perspectives, VII" ured. Arditti J., Pridgeon A.M., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, (285-316)
- Ishii Y., Takamura T., Goi M., Tanaka M. (1998): *Callus induction and somatic embryogenesis of Phalaenopsis*, Plant Cell Reports 17 (446-450)
- Košir P., Škof S., Lutar Z. (2004): *Direct shoot regeneration from nodes of Phalaenopsis orchids*, Acta agriculturae slovenica 2, Vol. 83 (233-242).
- Mišić D. (2004): *Mikropropagacija rtanjske metvice (Nepeta rtanjensis Diklić & Milojević) kao efikasan način ex situ zaštite*, Magistarski rad, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd (42-94)
- Murashige T., Skoog F. (1962): *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*, Physiologia Plantarum 15 (473-497)
- Park S.Y., Murthy H. N., Paek K.Y. (2002): *Rapid propagation of Phalaenopsis from floral stalk-derived leaves*. In Vitro Cellular Developmental Biology Plant 38, (168-172)
- Pierik R.L.M. (1987): *In Vitro Culture of Higher Plants*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Netherlands
- Radulić M. (1996): *Optimiranje podloge za produkciju ekstracelularne lipaze iz plijesni Aspergillus niger*, Doktorska disertacija, Sveučilište u Rijeci - Medicinski fakultet, Rijeka
- Reisinger D.M., Ball E.A., Arditti J. (1976): *Clonal propagation of Phalaenopsis by means of flower-stalk node cultures*. Orchid Review 84 (45-52)

- Sigma Aldrich, Orchid Culture Media, P 6793 - *Phytamax orchid multiplication medium* (<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/molecular-biology/plant-biotechnology/tissue-culture-protocols/orchid-culture-media.html>) (accessed /приступљено новембра 2011.)
- Sinha P., Hakim M. L., Alam M.F. (2007): *Efficient micropropagation of Phalaenopsis amabilis (L.) BL. cv. "Cool Breeze" using inflorescence axis thin sections as explants*, Propagation of Ornamental Plants 7(1) (9-15)
- Thorpe T., Stasolla C., Yeung E.C., de Klerk G.-J., Roberts A., George E.F. (2008): *The Components of Plant Tissue Culture Media II: Organic Additions, Osmotic and pH Effects, and Support Systems*, „Plant Propagation by Tissue Culture“, 3rd Edition., Springer, AA Dordrecht, Netherlands, 115- 174)
- Tisserat B., Jones D. (1999): *Clonal propagation of orchids*, „Plant Cell Culture Protocols“ ured. Hall R.D., Methods in Molecular Biology 111, Humana Press, Inc., Totowa, NJ, USA, (127-134)
- Tokuhara K., Mii M. (1993): *Micropropagation of Phalaenopsis and Doritaenopsis by culturing shoot tips of flower stalk buds*. Plant Cell Reports 13, (7-11)
- Tse A.T., Smith R.J., Hackett W.P. (1971): *Adventitious shoot formation on Phalaenopsis nodes*. American Orchid Society Bulletin 40, (807–810)
- Vinterhalter D., Vinterhalter B. (1996): *Kultura in vitro i mikropropagacija biljaka*, Axial P.O., Beograd (25-54)

Marija Marković
Miloš Tanasić
Nevena Stojić
Radivoje Bulatović
Marta Jović
Slobodan Vidojković
Dušan Stanković

IMPROVEMENT OF MICROPROPAGATION PROTOCOL OF PHALAEOPSIS SP. FOR THE METHOD OF DIRECT SHOOT REGENERATION FROM NODES OF FLORAL SPIKES

Summary

The aim of this study was to investigate the possibility of simplification of the micropropagation protocol of *Phalaenopsis* sp. in order to reduce the costs. The obtained results show that some medium components can be successfully omitted (coconut water, glutamine, 2-morpholinoethanesulfonic acid) and that some other (peptone) can be replaced with a cheaper constituent (soy flour purchased in the market) without losing the quality of the obtained microplants. Also, instead of sucrose intended for laboratory use, sugar from the market can be successfully used as a medium component. The multiplication rate was 7.6 shoots per explant after a period of 150 days cultivation *in vitro*, which is a high value, slightly lower than the multiplication rate (8.3) obtained on a commercial medium for the micropropagation of *Phalaenopsis* sp. according to the results by Kosić *et al.* (2004). On the same medium, 60% of explants were rooted and the roots were mostly well developed with 1-4 roots per explant which were between 1 and 5 cm long. The rooting was directly influenced by the lower concentration of iron in the medium compared to the commercial medium (Sigma P 6793).