

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Jana LOKAR

**ASIMBIOTSKA KALITEV ORHIDEJ
IZ RODU *Phalaenopsis***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Jana LOKAR

**ASIMBIOTSKA KALITEV ORHIDEJ
IZ RODU *Phalaenopsis***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**ASYMBIOTIC GERMINATION OF ORCHIDS
FROM THE *Phalaenopsis* GENUS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija Kmetijstvo – agronomija. Delo je bilo opravljeno na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Zlato LUTHAR.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Gregor OSTERC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Zlata LUTHAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za agronomijo

Članica: doc. dr. Jana MUROVEC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za agronomijo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Podpis

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 582.581:631.547.1:631.589(043.2)
- KG orhideja/*Phalaenopsis*/križanje/asimbiotska kalitev/gojišče/razvojne faze
- AV LOKAR, Jana
- SA LUTHAR, Zlata (mentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
- LI 2016
- IN ASIMBIOTSKA KALITEV ORHIDEJ IZ RODU *Phalaenopsis*
- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
- OP IX, 35 str., 14 pregl., 15 sl., 44 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI V poskus asimbiotske kalitve je bilo vključenih 16 dozorelih semenskih glav, ki so bile rezultat uspešnega križanja 5 od 8 komercialnih orhidej rodu *Phalaenopsis*. Orhideje so se med seboj razlikovale po številu cvetnih stebel ter velikosti in barvi cvetov. Zrela semena smo razkužili z 1,6 % dikloroizocianurno kislino in inokulirali na dve vrsti gojišč S1 in S2 s polno in polovično koncentracijo hranil v dveh ponovitvah. Dosegli smo 90,6 % aseptično kulturo, pri ostalih je bila vir okužbe plesen. Znotraj naključno označene površine 1 cm² smo tedensko opravljali opazovanja, začeni s tednom po inokulaciji. Do 12. tedna smo opravili 9 opazovanj, v katerih smo spremljali nabrekanje semen, kalitev in razvojne faze do drugega lista in pojava korenin. Posamezne razvojne faze smo prešteli 12. teden po inokulaciji. Ugotovili smo, da med uporabljenimi gojišči obstajajo značilne razlike v povprečnem številu vitalnih ($p = 0,0023$) in propadlih protokormov ($p = 0,0491$) ter nabreklih semenih ($p = 0,0007$). Na povprečno število nekalivih semen gojišče ni imelo značilnega vpliva ($p = 0,3985$). Odstotek vitalnih protokormov in sejančkov je bil večji na gojiščih s polovično koncentracijo hranil, medtem ko je bil na gojiščih s polno koncentracijo hranil, predvsem pri gojišču S2, manjši.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Dn
- DC UDC 582.581:631.547.1:631.589(043.2)
- CX orchid/*Phalaenopsis*/crossbreeding/asymbiotic germination/culture media/
developmental stages
- AU LOKAR, Jana
- AA LUTHAR, Zlata (supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
- PY 2016
- TI ASYMBIOTIC GERMINATION OF ORCHIDS FROM THE *Phalaenopsis*
GENUS
- DT Graduation thesis (University studies)
- NO IX, 35 p., 14 tab., 15 fig., 44 ref.
- LA sl
- Al sl/en
- AB In the asymbiotic germination experiment, 16 mature seed capsules were included, which were the result of a successful interbreeding of 5 out of 8 commercial orchids from the genus *Phalaenopsis*. Orchids differed from one another by the number of flower stalks and the size and color of flowers. Mature seeds were disinfected with 1.6% dichloroisocyanuric acid and inoculated onto two types of media S1 and S2 with full and half-nutrient concentrations in two repetitions. A 90.6% aseptic culture was achieved, the source of infection was mold. Within a randomly selected area of 1 cm², observations were performed weekly, starting the week following the inoculation. By the 12th week, 9 observations were conducted in which the swelling of seeds, germination and development phase to the second leaf as well as the emergence of roots were witnessed. On the 12th week following the inoculation, all development phases were counted. It was found that the mediums used typically differed in the average number of viable ($p = 0.0023$) and failed protocorms ($p = 0.0491$) and swollen seeds ($p = 0.0007$). The medium used had no typical influence on the average number of non-germinated seeds ($p = 0.3985$). The percentage of viable protocorms and seedlings was higher in the media with half the concentration of nutrients, while in the media containing full concentration of nutrients, in particular in the medium S2, it was smaller.

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	1
1.1 NAMEN	1
1.2 DELOVNA HIPOTEZA	1
1.3 CILJI	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 KUKAVIČEVKE	2
2.2 SISTEMATIKA RODU <i>Phalaenopsis</i>	3
2.3 LASTNOSTI CVETA	3
2.3.1 Oprašitev	4
2.3.2 Oploditev in razvoj semena	5
2.4 KALITEV	5
2.4.1 In vivo kalitev in mikoriza	5
2.4.2 In vitro kalitev in mikropropagacija	6
2.5 RAZKUŽEVANJE SEMEN	7
2.6 SESTAVA GOJIŠČA	7
3 MATERIAL IN METODE	8
3.1 RASTLINSKI MATERIAL	8
3.2 RAZKUŽEVANJE SEMEN	8
3.3 INOKULACIJA SEMEN NA GOJIŠČE	9
3.4 SESTAVA IN PRIPRAVA GOJIŠČA	9
3.5 KALITEV <i>IN VITRO</i>	11
3.6 SPREMLJANJE KALIVOSTI IN RAZVOJNIH FAZ	11
3.7 STATISTIČNA ANALIZA	12
4 REZULTATI	13
4.1 OPRAŠITEV IN RAZVOJ SEMENSKIH GLAVIC	13
4.2 ASEPTIČNOST <i>IN VITRO</i> KULTURE	13
4.3 VPLIV GOJIŠČA NA KALITEV IN RAZVOJ SEJANČKOV	14
4.3.1 En teden po inokulaciji semen	14
4.3.2 Dva tedna po inokulaciji semen	14
4.3.3 Tri tedne po inokulaciji semen	15
4.3.4 Štiri tedne po inokulaciji semen	16

4.3.5	Pet tednov po inokulaciji semen	16
4.3.6	Šest tednov po inokulaciji semen	17
4.3.7	Sedem tednov po inokulaciji semen	18
4.3.8	Osem tednov po inokulaciji semen	18
4.3.9	Devet tednov po inokulaciji semen	20
4.3.10	Dvanajst tednov po inokulaciji semen	20
4.4	ANALIZA RAZVOJNIH FAZ	24
4.4.1	Analiza vitalnih protokormov	24
4.4.2	Analiza propadlih protokormov	25
4.4.3	Analiza nabreklih semen	25
4.4.4	Analiza nekalivih semen	26
5	RAZPRAVA	28
5.1	RASTLINSKI MATERIAL	28
5.2	RAZKUŽEVANJE SEMEN	28
5.3	VPLIV GOJIŠČA NA KALITEV IN RAZVOJ SEJANČKOV	29
6	SKLEPI	30
7	POVZETEK	31
8	VIRI	33
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	Str.
Preglednica 1: Opis osmih orhidej <i>Phalaenopsis</i> , katerih semena so bila vključena v <i>in vitro</i> kalitev	8
Preglednica 2: Sestava S1 in S2 gojišča za kalitev in razvoj do drugega pravega lista orhidej <i>Phalaenopsis</i>	10
Preglednica 3: Število opršenih cvetov osmih orhidej <i>Phalaenopsis</i> in nastalih semenskih glavic s semeni primernimi za <i>in vitro</i> kalitev	13
Preglednica 4: Okuženost kulture en, tri in dvanajst tednov po inokulaciji semen orhidej <i>Phalaenopsis</i> na štirih različnih gojiščih	14
Preglednica 5: Nabreklost semen, prisotnost protokormov in rizoidov tri tedne po inokulaciji na gojiščih S1 in S2 s polno in polovično koncentracijo hranil	15
Preglednica 6: Število vitalnih in propadlih protokormov ter nabreklih in nekalivih semen orhidej <i>Phalaenopsis</i> , inokuliranih na gojišče S1 s polno in polovično koncentracijo hranil iz 16 semenskih glavic	21
Preglednica 7: Število vitalnih in propadlih protokormov ter nabreklih in nekalivih semen orhidej <i>Phalaenopsis</i> , inokuliranih na gojišče S2 s polno in polovično koncentracijo hranil iz 16 semenskih glavic	21
Preglednica 8: Analiza variance števila vitalnih protokormov orhidej <i>Phalaenopsis</i> po dvanajstih tednih inokulacije semen na štirih različnih gojiščih	24
Preglednica 9: Duncan-ov test razlik v povprečnem številu vitalnih protokormov orhidej <i>Phalaenopsis</i> po dvanajstih tednih inokulacije semen na štirih različnih gojiščih	24
Preglednica 10: Analiza variance števila propadlih protokormov orhidej <i>Phalaenopsis</i> po dvanajstih tednih inokulacije semen na štirih različnih gojiščih	25
Preglednica 11: Duncan-ov test razlik v poprečnem številu propadlih protokormov orhidej <i>Phalaenopsis</i> po dvanajstih tednih inokulacije semen na štirih različnih gojiščih	25
Preglednica 12: Analiza variance števila nabreklih semen orhidej <i>Phalaenopsis</i> po dvanajstih tednih inokulacije na štirih različnih gojiščih	26
Preglednica 13: Duncan-ov test razlik v številu nabreklih semen orhidej <i>Phalaenopsis</i> po dvanajstih tednih inokulacije na štirih različnih gojiščih	26
Preglednica 14: Analiza variance števila nekalivih semen orhidej <i>Phalaenopsis</i> po dvanajstih tednih inokulacije na štirih različnih gojiščih	26

KAZALO SLIK

	Str.
Slika 1: Naključno izbrana površina 1 cm ² na pokrovu petrijevke, znotraj katere smo opravljali tedenska bonitiranja	11
Slika 2: Razvojne faze od nabrekanja semen do formiranja listov: A – nenabreklo seme; B – nabreklo seme; C – beli protokorm; D – zeleni protokorm; E – protokorm z rizoidi; F – protokorm z zametkom za list	11
Slika 3: Semena orhidej <i>Phalaenopsis</i> tri tedne po inokulaciji na gojišče: A – kaljiva in nekaljiva semena; B - protokormi z rizoidi	16
Slika 4: Semena orhidej <i>Phalaenopsis</i> štiri tedne po inokulaciji na gojišče: A – kaljiva in nekaljiva semena ter pojav protokormov; B - protokormi z gostejšimi rizoidi	16
Slika 5: Semena orhidej <i>Phalaenopsis</i> pet tednov po inokulaciji na gojišče: A – propadanje protokormov; B – razlika v velikosti med nekalivimi semeni in protokormi z zametkom za list; C – protokormi z rizoidi in zametki za list	17
Slika 6: Podolgovati vitrificirani protokormi orhidej <i>Phalaenopsis</i> : A – na gojišču S1 pri oznaki 7; B – na gojišču S1 pri oznaki 4	19
Slika 7: Začetek propadanja protokormov sedem tednov po inokulaciji semen orhidej <i>Phalaenopsis</i> na gojišča	19
Slika 8: Odstotek vitalnih protokormov iz 16 semenskih glavic orhidej <i>Phalaenopsis</i> na štirih različnih gojiščih	22
Slika 9: Odstotek propadlih protokormov iz 16 semenskih glavic orhidej <i>Phalaenopsis</i> na štirih različnih gojiščih	22
Slika 10: Odstotek nabreklih semen iz 16 semenskih glavic orhidej <i>Phalaenopsis</i> na štirih različnih gojiščih	23
Slika 11: Odstotek nekalivih semen iz 16 semenskih glavic orhidej <i>Phalaenopsis</i> na štirih gojiščih	23
Slika 12: Povprečno število vitalnih protokormov z mejami zaupanja orhidej <i>Phalaenopsis</i> po dvanajstih tednih inokulacije semen na štirih različnih gojiščih	24
Slika 13: Povprečno število propadlih protokormov z mejami zaupanja orhidej <i>Phalaenopsis</i> po dvanajstih tednih inokulacije semen na štirih različnih gojiščih	25
Slika 14: Povprečno število nabreklih semen z mejami zaupanja orhidej <i>Phalaenopsis</i> po dvanajstih tednih inokulacije na štirih različnih gojiščih	26
Slika 15: Povprečno število nekalivih semen z mejami zaupanja orhidej <i>Phalaenopsis</i> po dvanajstih tednih inokulacije na štirih različnih gojiščih	27

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

S1	oznaka komercialnega gojišča proizvajalca Sigma 6793
S2	oznaka komercialnega gojišča proizvajalca Sigma 1056
BAP	6-benzil aminopurin
NAA	α -naftalen očetna kislina
SP	stopinje prostosti
SKO	srednji kvadirani odklon
<i>p</i> -vrednost	izraža tveganje v kolikšni meri so vzorčni podatki v skladu z zastavljeno ničelno hipotezo
VKO	vsota kvadratnih odklonov
***	statistično značilno pri stopnji 0,001
**	statistično značilno pri stopnji 0,01
*	statistično značilno pri stopnji 0,05
NS	nabreklo seme
P	protokorm
R	rizoid
+	majhna prisotnost in nabreklost
++	srednja prisotnost in nabreklost
+++	velika prisotnost in nabreklost
-	odsotnost
±	rahlo opazna sprememba

1 UVOD

Orhideje so ena izmed največjih družin med cvetnicami z več kot 25.000 trenutno opisanimi vrstami (Chase, 2005). So trajnice, ki rastejo v najrazličnejših okoljih in z različnimi ravnimi prilagoditvami. Rod *Phalaenopsis* sestavljajo epifiti ali litofiti, ki rastejo pritrjeni na veje ali debla, skale, po mahovnatih bregovih, obdanih z vodo in skoraj vedno v globoki senci (Kramer, 1997).

Značilnosti naravnega okolja vrst iz rodu *Phalaenopsis* so velika povprečna temperatura in vlažnost ter primerna senca. Gojenje naravnih vrst zaradi prej navedenih zahtev je uspešno le, če jih gojimo v rastlinjaku. Veliko križancev (hibridov) uspešno raste v bivalnih prostorih, ampak to so na splošno starejše rastline, ki so bile v te namene žlahtnjene (Kramer, 1997).

Seme orhidej ne vsebuje endosperma, ampak samo embrijo in testo, samo 10 vrst ima nekaj endospermalnih celic (Plant ..., 2000), kar pa ni dovolj za uspešno kalitev. Kalitev je odvisna od simbioze z mikorizno glivo (kalitev *in vivo*). Možna pa je tudi asimbiotska kalitev v odsotnosti mikorizne glive v kontroliranih razmerah (kalitev *in vitro*), kar ima za posledico večji odstotek kalivih semen in vitalnejše rastline, ker so optimalno preskrbljene s hranili.

Proučevali smo asimbiotsko kalitev orhidej rodu *Phalaenopsis* v *in vitro* razmerah, ki so nastale po različnih kombinacijah križanj osmih rastlin.

1.1 NAMEN

Namen diplomskega dela je bil proučiti asimbiotsko kalitev semen, ki so nastala na 5 od 8 orhidej, po 16 uspešnih kombinacijah križanj, in spremljati razvojne faze do drugega lista na dveh komercialnih gojiščih s polovično in polno koncentracijo hranil.

1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Pričakovali smo, da bo kalitev in rast na gojiščih z različno koncentracijo hranil različno uspešna. Glede na to, da so orhideje nezahtevne glede hranil, smo predvidevali, da bodo boljši rezultati na gojiščih s polovično koncentracijo hranil in da bosta hormona α -naftalen očetna kislina (NAA) in 6-benzil aminopurin (BAP) imela pozitiven vpliv na razvojne faze po kalitvi.

1.3 CILJI

Želeli smo potrditi delovno hipotezo in hkrati doseči čim hitrejšo in čim bolj izenačeno kalitev križancev. Če bo delovna hipoteza potrjena, bi se izsledki raziskave lahko uporabili v nadaljnjih biotehnoških postopkih, to je pri *in vitro* rasti in razvoju orhidej. Če bi ugotovili značilno boljše rezultate na gojiščih z manj hranili, je to z ekonomske plati za komercialno proizvodnjo zelo ugodno, saj bi s tem zmanjšali stroške gojenja orhidej.

2 PREGLED OBJAV

2.1 KUKAVIČEVKE

Kukavičevke (Orchidaceae) so botanična družina, ki obsega več kot 25.000 različnih vrst in podvrst. Največja raznolikost je v tropskih predelih Južne Amerike in jugovzhodne Azije, kjer prevladujejo epifiti. V Evropi raste okoli 300 vrst, v Sloveniji uspevajo orhideje terestričnega tipa oziroma v tleh rastoče. Po podatkih, ki jih navaja Ravnik (2002), je pri nas 76 vrst in podvrst, medtem ko Dolinar (2015) navaja 79 vrst in podvrst, ki so uvrščene v 28 rodov. Omenja tudi 20 vrst, ki so se po raznih pisnih navedbah pojavljale v Sloveniji, vendar v zadnjem obdobju prisotnost oziroma uspevanje teh kukavičevk ni bilo potrjeno ali pa njihova sistematika ni dovolj natančno raziskana in opredeljena. Zaradi težavnega morfološkega ločevanja nekaterih vrst med seboj in velike fenotipske raznolikosti med posameznimi primerki, je omenjeno število, ki sloni na morfoloških opisih, verjetno drugačno. Zelo malo je raziskav, ki bi slonele na molekularnih analizah in bi bile v pomoč morfološkim opredelitvam.

V Sloveniji je od 28 rodov najštevilčnejši rod močvirnic (*Epipactis*). Obsega 15 vrst in podvrst, sledi mu rod mačje uho (*Ophrys*), ki ima 9 vrst. Rodova pilovec (*Anacamptis*) in prstaste kukavice (*Dactylorhiza*) imata po 7 vrst. Rodova kukavica (*Orchis*) in murka (*Nigritella*) imata po 6 vrst, rod naglavka (*Cephalanthera*) ima 3 vrste. Po 2 vrsti obsegajo rodovi kukovičnik (*Gymnadenia*), muhovnik (*Listera*), škrbica (*Spiranthes*), vimenjak (*Platanthera*) in pikastocvetna kukavica (*Neotinea*). Vseh ostalih 16 rodov pa ima po eno vrsto (Dolinar, 2015).

Splošne značilnosti družine kukavičevk je težko opredeliti zaradi izjemne raznolikosti vrst. Raziskovalci, ki se ukvarjajo s proučevanjem te družine, mnogokrat niso enakega mnenja o uvrstitvi nekaterih vrst v samostojne rodove in obratno. Pogoste neutemeljene menjave rodovnih in vrstnih imen ustvarjajo dodatno zmedo v že sicer nepregledno veliki družini. Vsako leto registrirajo in določijo približno 100 doslej neznanih vrst, ki jih raziskovalci odkrijejo v najbolj nedostopnih kotičkih pragozdov po svetu (Jevšnik, 2006).

Družina kukavičevk je razširjena po vsem svetu. Uspevajo v različnih okoljskih razmerah, razen v ekstremnih, kot so suhe puščave, morja in vrhovi najhladnejših gora (Rittershausen in Pilcher, 2000). V pasu med severnim in južnim povratnikom, kjer je pestrost orhidej največja, je velika tudi klimatska pestrost habitatov. Kukavičevke predstavljajo slabo desetino flore na zemlji in so najmlajša ter najbolj pestra družina v rastlinskem svetu, ki se iz leta v leto povečuje (Arditti, 1992; Pridgeon, 1999; Jevšnik, 2006).

Orhideje iz rodu *Phalaenopsis* spadajo v poddružino Orchidoideae znotraj družine kukavičevk (Orchidaceae). Te vednozelenne orhideje izvirajo iz območja, ki sega od Indije do Indonezije in Filipinov ter severnih delov Avstralije. V zmernih klimatih zaradi tropskega izvora uspevajo naravne vrste samo v rastlinjakih. Nekateri sorte, nastale s križanji, so zelo dobro prilagojene na gojenje v bivalnih prostorih (Squire, 2005).

2.2 SISTEMATIKA RODU *Phalaenopsis*

Orhideje iz rodu *Phalaenopsis* so uvrščene v kraljestvo *Plantae* – rastline, deblo *Spermatophyta* – semenke, v poddeblo *Magnoliophyta (Angiospermae)* – kritosemenke, v razred *Liliopsida (Monocotyledonae)* – enokaličnice, v podrazred *Lilidae*, v nadred *Orchidanae*, v red *Orchidales* – kukavičevci in *Asparagales* – enokaličnice, v družino *Orchidaceae* – kukavičevke, v poddružino *Epidendroideae*, v pleme *Vandae*, v podpleme *Sarchantinae* in v rod *Phalaenopsis* (Dressler, 1981; Bremen in sod., 2009).

Christenson (2001) je v obstoječi rod *Phalaenopsis*, ki ga je sistematsko uredil že Sweet (1980), uvrstil še vrste iz dveh do tedaj samostojnih rodov. Vrste rodu *Kingidium* P. F. Hunt imajo 4 polinije in so bile ločene od vrst *Phalaenopsis*, ki imajo dva polinija. Tudi vrste rodu *Doritis* Lindl. so bile ločene od vrst rodu *Phalaenopsis* zaradi števila polinijev, zgradbe medene ustne in terestričnega tipa rasti (Sweet, 1980). Christenson (2001) obravnava *Kingidium* in *Doritis* kot sinonim rodu *Phalaenopsis* in je vrste, ki so bile prej uvrščene v rod *Kingidium*, razporedil v podrodova *Aphyllae* in *Phalaenopsis*, sekcijo *Deliciosae*. Vrste rodu *Doritis* je uvrstil v podrod *Phalaenopsis*, sekcijo *Amboinenses*.

Rod *Phalaenopsis* je zelo obsežen in po klasifikaciji, ki jo je vzpostavil Christenson (2001), obsega 66 vrst ter je razdeljen na 5 podrodov in 2 podrodova še na 4 sekcije:

1. podrod *Proboscidioides* (Rolfe) Christ.
2. podrod *Aphyllae* (Sweet) Christ.
3. podrod *Parishianae* (Sweet) Christ.
4. podrod *Polychilos* (Breda) Christ.
 - 4.1 sekcija *Polychilos* (Breda) Rchb.f.
 - 4.2 sekcija *Fuscatae* Sweet
 - 4.3 sekcija *Amboinenses* Sweet
 - 4.4 sekcija *Zebrinae* Pfitz.
5. podrod *Phalaenopsis*
 - 5.1 sekcija *Phalaenopsis*
 - 5.2 sekcija *Deliciosae* Christ.
 - 5.3 sekcija *Esmeralda* Rchb.f.
 - 5.4 sekcija *Stauroglittis* (Schauer) Benth.

2.3 LASTNOSTI CVETA

Cvet kukavičevk je someren in sestavljen iz šestih cvetnih listov, ki so razvrščeni v dveh vencih. Zunanji je sestavljen iz treh listov ('sepal') in notranji prav tako iz treh listov ('petal'). Cvetovi so praviloma živobarvni, različnih velikosti in oblik ter veliko prispevajo k pestrosti in uspešni oploditvi. So dvostransko somerni in po navpični osi jih lahko razdelimo na dve polovici (Jevšnik, 2006).

Medena ustna ('labellum') je spodnji notranji cvetni list in večinoma najopaznejši del cveta. Po obliki, velikosti in barvi je zelo raznovrsten. Največkrat je to najbolj barvit in značilno oblikovan del cveta in je pogosto cvetni list, na katerega se usedajo žuželke, ki oprahujejo cvetove (Squire, 2005). Medena ustna je navadno podaljšana v ostrogo, v kateri se nahajajo nektarne žleze, ki privlačijo žuželke (Jevšnik, 2006).

Orhideje rodu *Phalaenopsis* so enodomne rastline z dvospolnimi cvetovi, v katerih so tako moški kot ženski organi, združeni v podolgovatem stebričku. Prašnike tvorijo prašnične niti ('filamenti') z lepljivim diskom ('viscidij') in pelodna zrna ('poliniji'). Nahajajo se pod prašnično kapico na vrhu stebrička ('klinandrij'). Ženski spolni organ, imenovan brazda ('stigma'), ločuje od moškega organa posebno tkivo v stebričku ('rostelum') (Kramer, 1997).

2.3.1 Oprašitev

Spolno razmnoževanje je pri cvetnicah odvisno od oprašitve, ki jo predstavlja prenos cvetnega prahu iz prašnika na brazdo pestiča (Moore in sod., 1998). Za uspešno oprašitev mora biti cvet (in v njem spolni organi) dozorel ter pri tujeprašnih rastlinah tudi odprt, da lahko veter oziroma žuželke prenesejo pelod. Cvetovi, ki kratkotrajno cvetijo, se oprašijo v jutranjem obdobju, oziroma takoj, ko se cvet popolnoma odpre. Dolgo cvetoči cvetovi so lahko odprti nekaj dni, teden ali celo več, preden se oprašijo (Hicks, 2000).

Cvetovi kukavičevk so zaradi zanimivih oblik, barv in vonja našim čutilom najbolj opazna podrobnost. S svojo raznolikostjo dražijo tudi čutila opraševalcev in jih privabljajo. To so predvsem čebele, ose, muhe, metulji, molji, mravlje in redkeje ptiči, predvsem kolibriji (Jevšnik, 2006).

Večina orhidej je alogamnih, navzkrižna oprašitev se opravi med dvema rastlinama. Pred oprašitvijo se žuželka po medeni ustni pomika v notranjost cveta in se z različnimi deli telesa, običajno z glavo, dotakne polinijev, ki se nanjo prilepijo. Lepljiv disk (viscidij), ki je na spodnji strani filameta polinijev, se prilepi na glavo žuželke. Ko le-ta odleti s cveta, se postopek v drugem cvetu ponovi, s tem, da na brazdo nevede odloži polinije prvega cveta in pri umiku vzame nove. Kolibriji in nekateri molji nikoli ne pristanejo na cvetu, vendar s kljunom oziroma rilčkom opravijo zgoraj opisan postopek opraševanja (Jevšnik 2006).

Ker so orhideje razvile zelo kompleksne načine razmnoževanja, ki jim zagotavlja tujeprašnost, je to eden izmed razlogov izjemne raznolikosti kukavičevk, ki ni prisotna pri samoprašnih rastlinah (Jevšnik, 2006).

Poleg zgoraj opisane naravne poznamo tudi umetno oziroma ročno oprašitev, ki se opravlja v zaprtih prostorih, po možnosti v izolaciji, ne glede na del dneva, kar je tudi prednost pred oprašitvijo v naravi. Drugače pa sta načina oprašitve enaka. Umetna oprašitev se lahko opravi tudi v naravi, obvezna je izolacija, da se prepreči oprašitev z nezaželenim pelodom. Pri umetni oprašitvi najprej odberemo starševski rastlini. Eno določimo za tvorbo semenske glavice, druga pa je darovalka peloda. Če se rastlini ločita po velikosti cvetov, izberemo za darovalko peloda tisto, ki ima večje cvetove, ker ima večji pelod in posledično oblikuje daljšo pelodno cev. Polinije ročno namestimo na brazdo orhideje, ki bo tvorila semensko glavico. Načrtni izbor starševskih rastlin in umetna oprašitev sta osnova oziroma začetek žlahtnjenja.

2.3.2 Oploditev in razvoj semena

Ko pade pelodno zrno - poliniji na brazdo pestiča, je prišlo do opraitve, nato začne pelod kaliti in oblikuje se pelodna cev, ki prodira po brazdi pestiča do plodnice. Ko pelodna cev s spermalnima celicama prodre v plodnico in se gameti združita v zigoto, ki je zametek za sporofitno generacijo iz katere nastane embrijo, je prišlo do oploditve. Druga spermalna celica propade in posledično tudi sekundarni endosperm potem ne nastane. Seme sestavljata samo embrijo in semenska ovojnica (Arditti, 1992). Pri orhidejah, razen nekaj izjem, med drugimi je tudi rod *Phalaenopsis*, se oploditev začne šele 50 do 80 dni za tem, ko se pelod prenese na lepljivo brazdo. Prva delitev zigote pa se začne šele 2 do 30 dni za tem. Polarizacija embrija na poganjek in korenino nastane zelo zgodaj, takoj po prvi delitvi zigote. Znanih je več načinov oblikovanja in tipov embrija, kar zavisi od rodu in tudi od vrste orhidej (Arditti, 1992).

Večinoma so celice, ki sestavljajo tkivo embrija, na začetku brez funkcij, z zrelostjo embrija pa se celice diferencirajo. Zrel embrijo pri ostalih rastlinah sestavlja primarni endosperm, protoderm, prokambij, bazalni meristem, apikalni meristem in klični list oziroma klična lista. Protoderm se razvije v povrhnjico, prokambij pa v prevajalni sistem. Pri orhidejah ima zrel embrijo še vedno nediferencirano tkivo, s to razliko, da velikost celic zavisi od njihovega nahajališča. Meristem, če je v embriju, sestavljajo manjše celice, velikosti 8 do 10 μm . Celice, ki sestavljajo embrijo, tako meristemske kot ostale, vsebujejo zaloge hrane v obliki lipidov, beljakovinskih in škrobnih teles. Slednjih je malo ali pa so v nekaterih primerih celo odsotna (Arditti, 1992).

Velikost semena je od 0,01 do 0,5 mm in teža od 0,31 do 24 mg ter se razlikujeta glede na rodovno in vrstno pestrost kukavičevk. Značilnost orhidej je tudi oblikovanje velikega števila semen v enem plodu - semenski glavici. Dozorel plod počne po vzdolžnih šivih, kar povzroči postopno sproščanje semen iz njega, ki se razširijo po zraku in vodi tudi zelo daleč. S tem mehanizmom sproščanja semen na dolge razdalje, si je družina orhidej zagotovila obstoj na vseh kontinentih, razen na Antarktiki (Jevšnik, 2006). Testa ali semenska lupina je bolj ali manj prozorna in ima precej večjo prostornino kot embrijo, ki ga ščiti pred poškodbami (Arditti in Ghani, 2000).

2.6 KALITEV

2.6.1 *In vivo* kalitev in mikoriza

Mikoriza je sožitje ali simbioza med rastlinskimi koreninami in glivami. To pomeni, da imata oba organizma medsebojno korist. Mikorizne glive preskrbujejo rastline predvsem z mineralnimi hranili in vodo, iz rastlinskih korenin pa črpajo ogljikove hidrate in druge organske spojine.

Mreža nitastih hif, imenovana micelij, je pomembna tvorba mikoriznih gliv, ki obdaja tudi rastlinske korenine in živi saprofitsko. Poznamo ektotrofno ali zunanjo mikorizo. Pri ektotrofni se hife naselijo na površini korenin in prodrejo v medcelične prostore. Pri endotrofni pa prodrejo hife gliv v celico do plazmaleme, do primarne skorje korenine, vse do endoderma. Slednja mikoriza je značilna predvsem za zelišča in nekatere tropske

lesnate rastline. Deli se na orhidejsko, erikoidno in arbuskularno mikorizo (Sinkovič, 2000).

Značilna za kukavičevke je orhidejska mikoriza. Orhidejska mikoriza se mora vzpostaviti zelo hitro po nabrekanju oziroma začetku kalitve. Vzpostavitev ravnotežja med simbiotsko (mutualistično) in parazitsko naravo odnosa poteka zelo tekoče in se lahko poruši, ko gliva ob spremenjenih rastnih razmerah postane zajedalec (parazit).

Najboljše razmere za razvoj mikorize so na negnojenih tleh. Korenine, ki so v sožitju z glivo, se vilasto razraščajo in nimajo koreninske čepice in koreninskih laskov, saj jih z vodo in mineralnimi snovmi, predvsem z veliko fosforja in dušika, iz tal oskrbujejo prav te simbiotske glive. Med simbiontoma poteka izmenjava hormonov. Gliva sintetizira v večji meri citokinine, ki pospešujejo tvorbo in rast korenin. Slednje pa izločajo citokinine in avksine, ki so potrebni za razvoj micelija in sprejem ionov. Rastline, ki so v simbiozi z glivo, so odpornejše na težke kovine, povzročitelje bolezni in druge okoljske dejavnike, ki povzročajo stres v rastlini (Smith in Read, 1997; Sinkovič, 2000; Vodnik, 2012).

2.6.2 *In vitro* kalitev in mikropropagacija

Phalaenopsis je prva rastlina, ki je bila razmnožena klonsko v *in vitro* razmerah s tehnikami tkivnih kultur, kar je poznano kot mikropropagacija (Yam in Arditti, 1990). Gojenje komercialno zanimivih vrst iz rodu *Phalaenopsis* je skoraj popolnoma klonsko. Optimalno izdelane metode proizvodnje in trženja zahtevajo izenačenost znotraj sorte. Po več desetih letih se je za razmnoževanje orhidej z rodu *Phalaenopsis* razvilo veliko uporabnih tehnik mikropropagacije (Park in sod., 2002; Peak in sod., 2011). Med ostalimi uporabljenimi tehnikami so še: kultura stebelnih nodijev z brsti, izsečki cvetnih stebel, koreninski vršički (Chugh in sod., 2009; Arditti in Ernst, 1993; Park in sod., 1996), listni izsečki (Park in sod., 2002) in kulture tankih rezov (Sinha in sod., 2007).

Rotor (1949) je bil prvi, ki je vzpostavil *in vitro* kulturo cvetnih stebel orhidej iz rodu *Phalaenopsis*. To je z vidika ohranitve matične rastline zelo važno, ko razmnožujemo le eno rastlino ali manjšo skupino rastlin, kar je običajno pri nastajanju nove sorte. V kulturo se kot izhodiščni material da del cvetnega stebela s spečim brstom (Griesbach, 1983). Najbolj odzivni so speči brsti iz sredine stebela (Tanaka in Sakanishi, 1978).

Raziskovalci se vse bolj posvečajo raziskavam kulture celic, protokormov in regeneracijo v tekočih suspenzijah in bioreaktorjih. Uporaba slednjih močno vpliva na porast proizvodnje in zmanjševanje stroškov (Park in sod., 2000). Le en sam izseček potrebujemo za zasnovo kulture, da s serijo razrezovanja in subkultiviranj namnožimo do 4 milijone sadik letno (Tokuhara in Mii, 1993; Ziv, 2005; Chug in sod., 2009; Yan in sod., 2010). Mikropropagacija je dolgoročno pomembna za razmnoževanje izenačenih klonov rastlin, moramo pa somaklonsko variabilnost izločiti iz komercialne mikropropagacije, ki je s povečanjem števila subkultivacij v porastu (Chen in sod. 1998; Vijay in Raina, 2000).

Generativno razmnoževanje je pomembno pri žlahtnjenju, ko želimo pridobiti nove križance. Zaradi rekombinacij so sejančki med seboj zelo različni. Če želimo pridobiti veliko izenačenih rastlin, potem moramo uporabiti vegetativno razmnoževanje oziroma

mikropropagacijo (Arditti in Ernst, 1993; Thompson 1996).

Semena orhidej kalijo v *in vitro* razmerah zelo različno od 7 do 235 dni po inokulaciji na gojišče. Terminalni del celic začne s hitro delitvijo in tvori se meristem ter lipidi postanejo redkejši in se združujejo. Iz njih nastanejo po nekaj dneh vakuole. Celice pod meristemom se odebelijo. Embrijo je sprva hruškaste oblike, nato pa postane okroglast in se imenuje protokorm. Iz epidermalnih celic protokorma poženejo številni lasasti rizoidi. Na zgornji strani tvorijo celice zametek za list, nasproti temu požene drugi list itd. Prva korenina nastane znotraj protokorma in ga predre na bazalni strani. Razvoj rastlin lahko traja od 50 do 724 dni, za fazo cvetenja je potrebnih še 4 do 30 mesecev, odvisno od vrste (Arditti, 1992).

2.5 RAZKUŽEVANJE SEMEN

Preden semena inokuliramo na gojišče, jih moramo razkužiti in tehnike prilagodimo velikosti semen. Semena orhidej dobro prenašajo površinsko razkuževanje. Za površinsko razkuževanje se pogosto uporabljata raztopina kalcijevega hipoklorita, natrijevega hipoklorita in vodikovega peroksida ter dikloroizocianurne kisline (Hicks, 2000). Zaradi majhnosti semen so se razvile različne tehnike manipulacije v postopku razkuževanja in inokulacije na gojišče (Hicks, 2000).

2.6 SESTAVA GOJIŠČA

Sestava gojišča za uspešno mikropropagacijo orhidej je običajno poslovna skrivnost gojitvenega centra. Knudson je že leta 1922 odkril, da semena orhidej lahko uspešno kalijo na sterilnem gojišču, v odsotnosti gliv, če imajo na voljo ustrezna hranila. Tak postopek se imenuje asimbiotska kalitev. Knudson (1922, 1925, 1943 in 1946 cit. po George, 1993) je bil med prvimi, ki so opisali primerno gojišče in Knudsonovo gojišče iz leta 1946 z ogljikom se še vedno na široko uporablja za kalitev semen tropskih orhidej. Gojišča za asimbiotsko kalitev orhidej so navadno sestavljena iz strjevalca, makro- in mikroelementov, ogljikovih hidratov in organskih snovi. Poleg hormonov se v gojišča dodajajo še pepton (vodotopna beljakovina), korenjev sok, paradižnikov sok, goveji ekstrakt, krompirjev homogenat, najpogostejša dodatka pa sta bananin homogenat in kokosova voda. V novejšem obdobju se v gojišča dodajata MES (2-(N-morfolin) etansulfonska kislina) - puferska raztopina, ki stabilizira pH vrednost gojišča in aktivno rastlinsko oglje. Slednjemu se pripisuje vloga absorbiranja toksičnih snovi, ki so v gojišču ali nastajajo med avtoklaviranjem in tudi v obdobju gojenja. Obstajajo pa tudi starejši viri, ki navajajo, da se iz aktivnega oglja izločajo snovi, ki spodbujajo embriogenezo (Johansson, 1986; Johansson in sod., 1990; George, 1993).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 RASTLINSKI MATERIAL

V poskus smo vključili 16 dozorelih semenskih glavic, ki so bile rezultat uspešnega križanja 5 od 8 komercialnih orhidej rodu *Phalaenopsis*. Orhideje so se med seboj razlikovale po številu cvetnih stebel ter velikosti in barvi cvetov. Ročno smo 14. 3. 2008 oprášili 48 cvetov. Neoplojeni cvetovi so se v nekaj dneh posušili in predčasno odpadli. Semenske glavice so nastale kot rezultat navzkrižnega in recipročnega križanja (preglednici 1 in 3). Pobirali smo jih postopoma, odvisno od dozorevanja. Semena smo zračno posušili pri sobni temperaturi in jih hranili v 1,5 ml mikrocentrifugirkah pri 4 °C do razkuževanja in inokulacije na gojišča.

Semena smo površinsko razkužili in inokulirali na dve vrsti gojišč (preglednica 2) s polno ali polovično koncentracijo hranil v dveh ponovitvah. Od rastline z oznako 2 s svetlo roza cvetovi in rastline z oznako 3 z vijoličnimi cvetovi smo uporabili semena 1 semenske glavice. Rastlina z oznako 6 z belimi cvetovi je oblikovala 6 semenskih glavic in semena iz vseh šestih so bila uporabljena. Rastlina 7, prav tako z belimi cvetovi, je oblikovala 4 semenske glavice in semena vseh so bila vključena v poskus. Rastlina z oznako 8, z rumenimi cvetovi, je oblikovala 4 semenske glavice in semena vseh so bila inokulirana na gojišče (preglednica 3).

Preglednica 1: Opis osmih orhidej *Phalaenopsis*, katerih semena so bila vključena v *in vitro* kalitev

Oznaka orhidej	Velikost in barva cveta	Št. cvetnih stebel
1	srednje velik, temno roza	2
2	srednje velik, svetlo roza	1
3	velik, vijoličen	2
4	velik, vijoličen	2
5	majhen, rumeno zelen z vijol. žilami	2
6	velik, bel	1
7	velik, bel	1
8	majhen, rumen	4
Skupno		15

3.2 RAZKUŽEVANJE SEMEN

Semena smo 18. 2. 2009 površinsko razkužili. Uporabili smo 1,6 % dikloroizocianurno kislino $(C(O)NCl)_2(C(O)NH)$ z močilom Tween 20, oboje od proizvajalca Sigma. Stehtali smo 0,2 g semen in pretresli v 1,5 ml mikrocentrifugirko ter dodali 0,8 ml razkužila in razkuževali 8 minut pri sobni temperaturi in nekajkrat vmes pretresli. Nato smo razkuževanje nadaljevali za 2 minuti pri 4 °C v centrifugi (Beckman J2-HS) pri 5.000

obratih/min (1.900 x g) z namenom nevtralizirati površinsko napetost semen in razrahljati celične stene teste. Nato smo razkužilo odpipetirali z mikropipeto. Dodali smo sterilno (avtoklavirano) bidestilirano vodo in postopek spiranja s centrifugiranjem ponovili še 2-krat. V zadnji, četrti vodi za spiranje smo semena pustili približno 1 uro.

3.3 INOKULACIJA SEMEN NA GOJIŠČE

Skupaj z vodo, v kateri smo semena pustili približno 1 uro po zadnjem spiranju, smo jih z mikropipeto inokulirali na gojišča. Gojišča so bila v petrijevkah premera 9 cm in višine 1,5 cm. Za enakomerno porazdelitev po površini gojišča smo uporabili razkuženo stekleno palčko, ukrivljeno pod kotom 120 °. Celotni postopek razkuževanja in inokulacije je potekal v aseptični komori, kjer smo uporabljene pripomočke za delo razkužili v suhem sterilizatorju pri 815 °C. Po vključitvi komore smo počakali 10 – 15 minut, da je zrak, ki prehaja skozi 0,2 µm filter, izpodrinil prostorskega.

Skupno smo inokulirali semena na gojišče 128 petrijev. Po vsaki razporeditvi semen po gojišču ene petrijevke smo stekleno palčko razkužili v suhem sterilizatorju. V aseptični komori smo petrijevke zaprli s pokrovi in oblepili s parafilmom po celotnem obsegu, da smo pokrov pritrdili na spodnji del petrijevke.

3.4 SESTAVA IN PRIPRAVA GOJIŠČA

Uporabili smo dve vrsti komercialnih gojišč proizvajalca Sigma, in sicer prvo gojišče je imelo oznako 6793 in smo ga poimenovali S1, drugo gojišče je imelo oznako 1056 in smo ga poimenovali S2. Obe gojišči smo pripravili s polno in polovično koncentracijo hranil.

Količina in oblika dodanih makro- in mikroelementov je bila v obeh gojiščih enaka. Gojišči sta vsebovali 5 makroelementov: dušik (N) v obliki amonijevega in kalijevega nitrata, fosfor (P) v obliki kalijevega hidrogen fosfata, kalij (K) v obliki kalijevega hidrogen fosfata in kalijevega jodida, kalcij (Ca) v obliki kalcijevega klorida ter magnezij (Mg) v obliki magnezijevega sulfata ter 7 mikroelementov: bor (B) v obliki borove kisline, cink (Zn) v obliki cinkovega sulfata, mangan (Mn) v obliki manganovega sulfata, baker (Cu) v obliki bakrovega sulfata, kobalt (Co) v obliki kobaltovega klorida, molibden (Mo) v obliki dinatrijevega molibdata, železo (Fe) v obliki železovega sulfata in železo-dinatrijeve soli etilendiaminotetraocetne kisline v dihidratni obliki (2H₂O) (preglednica 2).

Vsebnost saharoze je bila v obeh gojiščih enaka. Glede organskih sestavin sta obe gojišči vsebovali enako količina inozitola, peptona in pufru MES (2-(N-morfolin) etansulfonska kislina. Gojišče S1 je vsebovalo 2 hormona: α-naftalen očetno kislino (NAA) in 6-benzil aminopurin (BAP), ki ju gojišče S2 ni vsebovalo. Gojišče S2 je vsebovalo oglje in bananin prašek, ki ju gojišče S1 ni vsebovalo. Piridoksin – HCl, tiamin – HCl in nikotinsko kislino sta obe gojišči vsebovali v različnih koncentracijah, in sicer gojišče S2 je vsebovalo višjo koncentracijo le-teh (preglednica 2).

Uporabili smo enako količino strjevalca Gellan gum in prav tako je bila pH vrednost v obeh gojiščih enaka (preglednica 2).

Gojišči S1 in S2 smo pripravili tako, da smo stehali potrebno količino kompleksnega gojišča s celotno in polovično koncentracijo hranil. Vsakega posebej smo pretresli v čašo ter dodali bidestilirano vodo. Sestavine smo raztopili z mešanjem s teflonskim magnetom na električnem mešalniku. Umerili smo končni volumen in s pH metrom uravnali pH vrednost z 1 N KOH oziroma 1 N HCl. Pred avtoklaviranjem smo dodali še strjevalec Gellan gum. Gojišče smo avtoklavirali 20 minut pri 121 °C in tlaku 1,1 bar. Avtoklavirano gojišče smo v brezprašni komori približno po 25 ml prelili v petrijevke in jih pustili, da se je gojišče strdilo.

Preglednica 2: Sestava S1 in S2 gojišča za kalitev in razvoj do drugega pravega lista orhidej *Phalaenopsis*

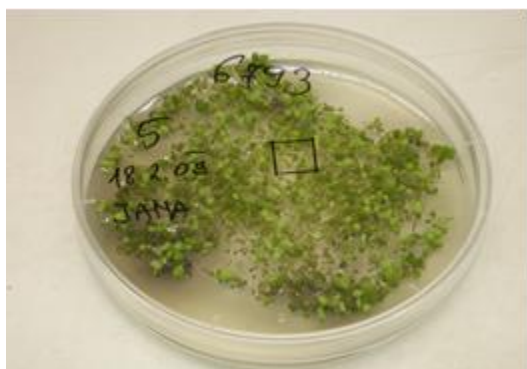
Sestavine	Gojišče	
	S1 (6793)	S2 (1056)
Makroelementi (mg/l)		
KH ₂ PO ₄	85	85
NH ₄ NO ₃	825	825
KNO ₃	950	950
CaCl ₂	166	166
MgSO ₄ x 7H ₂ O	90,35	90,35
Mikroelementi (mg/l)		
H ₃ BO ₄	3,1	3,1
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	5,3	5,3
MnSO ₄ x H ₂ O	8,45	8,45
KJ	0,415	0,415
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,0125	0,0125
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,0125	0,0125
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,125	0,125
FeSO ₄ x 7H ₂ O	27,85	27,85
Fe-Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	37,24	37,24
OGLJIKOV HIDRAT (g/l)		
Saharoza	20	20
Organske sestavine in vitamini (% , mg/l)		
Inozitol	100	100
Pepton	2000	2000
Bananin prašek, 50% maltodekstrin	-	30000
Oglje	-	2000
MES	1000	1000
Piridoksin - HCl	0,5	1
Tiamin - HCl	1	10
Nikotinska kislina	0,5	1
α-naftalen očetna kislina (NAA)	0,5	-
6-benzil aminopurin (BAP)	2	-
Strjevalec (g/l) in pH vrednost		
Gellan gum	2,6	2,6
pH gojišča	5,4	5,4

3.5 KALITEV *IN VITRO*

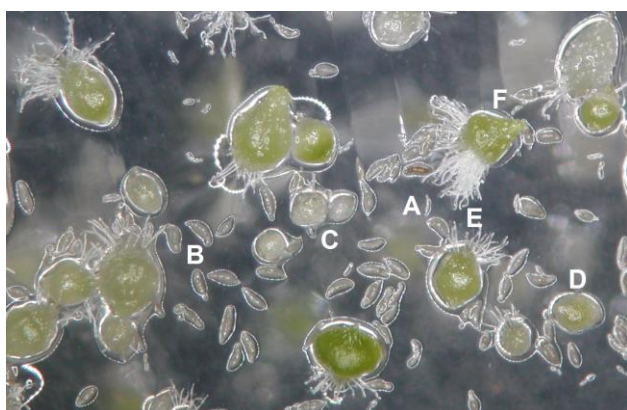
Petrijevke z gojišči in inokuliranimi semeni smo dali v rastno komoro, kjer smo simulirali kalitvene razmere s fotoperiodo 16/8 h (16 ur svetloba, 8 ur tema), s temperaturo 23 °C in z osvetlitvijo 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

3.6 SPREMLJANJE KALIVOSTI IN RAZVOJNIH FAZ

Glede na kombinacijo križanja smo pri eni ponovitvi in vsakem gojišču s polno in polovično koncentracijo hranil, na naključno izbranem mestu, na pokrovu petrijevke, označili površino 1 cm^2 in znotraj te opravljali bonitiranja (slika 1). Z bonitiranjem smo začeli en teden po inokulaciji in 1-krat tedensko nadaljevali do devetega tedna. Nato smo 12. teden opravili zadnje bonitiranje s štetjem posameznih razvojnih faz znotraj naključno označenega 1 cm^2 . Opravili smo 9 bonitiranj, v katerih smo spremljali nabrekanje semen, kalitev in razvojne faze do drugega lista in pojava korenin. Pri opazovanju smo uporabljali stereomikroskop pri 20-kratni povečavi. Vsak teden smo rezultate tudi fotografirali (slika 2).



Slika 1: Naključno izbrana površina 1 cm^2 na pokrovu petrijevke, znotraj katere smo opravljali tedenska bonitiranja



Slika 2: Razvojne faze od nabrekanja semen do formiranja listov: A – nenabreklo seme; B – nabreklo seme; C – beli protokorm; D – zeleni protokorm; E – protokorm z rizoidi; F – protokorm z zametkom za list

Tri tedne po inokulaciji semen na gojišča smo spremljali razvojne faze: nabreklo seme (NS), protokorm (P) in rizoid (R) ter jih opisno predstavili z oznakami: + majhna prisotnost in nabreklost, ++ srednja prisotnost in nabreklost, +++ velika prisotnost in nabreklost, - odsotnost, ± rahlo opazna sprememba (slika 2).

3.7 STATISTIČNA ANALIZA

Dvanajst tednov po inokulaciji semen na gojišča smo na površini naključno označenega 1 cm² zbrali številčne podatke (slika 1) in jih obdelali s programom Statgraphics XV z enosmerno analizo variance skupin in z Duncan-ovim testom potrdili statistično značilne razlike v razvojnih fazah med gojišči.

Pri analizi variance smo upoštevali p vrednost, če je bila ta manjša ali enaka 0,05, obstajajo statistično značilne razlike med opazovanimi povprečji in zastavljeno ničelno hipotezo zavrnemo.

H₀: med uporabljenimi gojišči ne obstajajo razlike v povprečnem št. vitalnih in propadlih protokormov ter nabreklih in nekalivih semenih

Za potrditev statističnih razlik smo upoštevali p vrednost, ki izraža skladnost dobljenih podatkov z zastavljeno ničelno hipotezo. Če je vrednost $p \leq 0,05$, ničelno hipotezo zavrnemo, če je vrednost $p \geq 0,05$, pa ničelno hipotezo obdržimo. Statistično značilnost smo označili z zvezdicami: *** pri stopnji tveganja 0,001, ** pri 0,01 in * pri 0,05. Statistično značilne razlike med proučevanimi razvojnimi fazami smo testirali z Duncan-ovim testom in jih v preglednicah in grafih označili z različnimi črkami.

4 REZULTATI

4.1 OPRAŠITEV IN RAZVOJ SEMENSKIH GLAVIC

Preglednica 3: Število oprasnih cvetov osmih orhidej *Phalaenopsis* in nastalih semenskih glavic s semeni, primernimi za *in vitro* kalitev

Oznaka orhideje	Število		
	oprašenih cvetov	nastalih glavic	glavic v <i>in vitro</i> kalitvi
1	7	4	0
2	3	2	1
3	7	2	1
4	7	5	0
5	8	7	0
6	8	7	6
7	5	5	4
8	8	5	4
Skupno	48	32	16

Na osmih orhidejah smo skupno opravili 48 ročnih križanj oziroma oprasnih cvetov, od katerih je nastalo 32 semenskih glavic. Samo 16 semenskih glavic je imelo uporabna semena za inokulacijo na gojišča. Ostalih 16 semenskih glavic je bilo izločenih iz poskusa. Razlogi za izločitev so bili v premalo nastalih ali veliko praznih semenih (brez embrija) v semenski glavici za inokulacijo na 4 gojišča v dveh ponovitvah. Kar 3 orhideje z oznakami 1, 4 in 5 so tvorile prazne semenske glavice oziroma glavice brez semen. Samo po ena semenska glavica z dovolj semeni je nastala na orhidejah z oznako 2 in 3. Orhideji z oznako 7 in 8 sta oblikovali po 4 semenske glavice in na orhideji z oznako 6 je nastalo največ, kar 6 semenskih glavic (preglednica 1 in 3).

4.2 ASEPTIČNOST *IN VITRO* KULTURE

Že en teden po inokulaciji smo izločili 7 petrijevok s semeni, okuženimi s plesnijo. Petrijevko z oznako 8 s polno koncentracijo hranil S1 in 3 petrijevke z oznako 1, 15 in 16 s polno koncentracijo hranil S2 ter 3 petrijevke z oznako 10, 14 in 16 s polovično koncentracijo hranil S2. Dva tedna po inokulaciji ni bilo novih okužb. Tri tedne po inokulaciji, 12. 3. 2009, smo izločili še dve petrijevki, okuženi s plesnijo. Petrijevko z oznako 5 s polno koncentracijo hranil S1 in z oznako 11 s polno koncentracijo hranil S2. Med četrtem in dvanajstim tednom po inokulaciji semen na gojišča ni bilo novih okužb. Po dvanajstih tednih, 12. 5. 2009, smo izločili še tri petrijevke, ki so bile prav tako okužene s plesnijo. Ena petrijevko z oznako 5 s polno koncentracijo hranil S2 in petrijevki z oznako 12 in 13 s polovično koncentracijo hranil S2. Z razkuževanjem smo dosegli 90,6 % aseptično kulturo. Vzrok okužbe je bila samo plesen v 12-ih petrijevkah od 128, kar je predstavljalo 9,4 % izločenih petrijevok z okuženimi semeni (preglednica 4).

Preglednica 4: Okuženost kulture en, tri in dvanajst tednov po inokulaciji semen orhidej *Phalaenopsis* na štirih različnih gojiščih

Oznaka petrijevke, semenske glavice	Oznaka orhideje	Oznaka in koncentracija gojišča	Povzročitelj okužbe
Okuženost semen en teden po inokulaciji			
1	2	S2 polna	plesen
8	6	S1 polna	plesen
10	7	S2 polovična	plesen
14	8	S2 polovična	plesen
15	8	S2 polna	plesen
16	8	S2 polovična	plesen
16	8	S2 polna	plesen
Okuženost semen tri tedne po inokulaciji			
5	6	S1 polna	plesen
11	7	S2 polna	plesen
Okuženost semen dvanajst tednov po inokulaciji			
5	6	S2 polna	plesen
12	7	S2 polovična	plesen
13	8	S2 polovična	plesen

4.3. VPLIV GOJIŠČA NA KALITEV IN RAZVOJ SEJANČKOV

4.3.1 En teden po inokulaciji semen

En teden po inokulaciji semen na gojišča smo opazili že prvo fazo kalitve, nabrekanje. Nabreklost oziroma sprejem vode v semena je bila edina sprememba, ki je bila prisotna v tem obdobju. Na gojišču S2 s polno in polovično koncentracijo hranil je bilo več nabreklih semen in tudi večja so bila v primerjavi z gojiščem S1. Opazili smo, da sprejem vode v semena ni bil enakomeren na vseh štirih gojiščih (slika 2B).

4.3.2 Dva tedna po inokulaciji semen

Dva tedna po inokulaciji semen se je pojavila že druga razvojna faza kalitve, protokorm. To je povečan embrijo, podolgovate do okroglaste strukture, ki je prisoten samo pri kalitvi orhidej, pri ostalih cvetnicah te razvojne faze ni. Protokormi so bili na začetku, ko so zapustili testo, beli, nato pa so postali zeleni. Semena orhidej jih oblikujejo z namenom povečanja površine, da omogočijo mikoriznim glivam lažji vstop in simbiozo. V dveh tednih je bilo nabreklih semen več in v povprečju so bila večja kot pred enim tednom. Na protokormih so se začeli pojavljati redki, tanki rizoidi. Rizoidi so podaljški epidermalnih celic, na začetku so enocelični, nato pa postanejo večcelični. Njihova funkcija je podobna kot funkcija protokormov, povečanje površine za mikorizne glive (slika 2B – E).

4.3.3 Tri tedne po inokulaciji semen

Tri tedne po inokulaciji so bile opazne spremembe v velikosti semen in prisotnost različnih razvojnih faz, glede na kombinacijo gojišča in križanja. Največji protokormi so bili na gojišču S1 s polno koncentracijo hranil pri semenih, nastalih po križanjih z oznako 1 – 8, 10 in 12, pri ostalih kombinacijah pa manjši. Pri večini protokormov so bili prisotni rizoidi. Protokormi na gojišču S1 s polovično koncentracijo hranil so bili intenzivno zeleni. Na gojišču S2 s polno koncentracijo hranil so semena z oznako 8, 9, 13 – 16 zelo slabo nabrekla, oziroma ni bilo bistvenih razlik kot pred tremi tedni, ko so bila semena inokulirana na gojišče. Ne glede na gojišče, je bila nabreklost semen, prisotnost protokormov in rizoidov največja pri semenih z oznako 1 – 7. Semena z oznako 14 so zelo slabo sprejemala vodo in se razvijala na gojišču S1 s polovično koncentracijo hranil, na ostalih gojiščih pa v treh tednih ni bilo opaznih sprememb. Prav tako na gojišču S2 s polno koncentracijo hranil, semena z oznako 14 – 16 niso kalila oziroma nismo opazili sprememb (preglednica 5, slika 3).

Preglednica 5: Nabreklost semen, prisotnost protokormov in rizoidov tri tedne po inokulaciji na gojiščih S1 in S2 s polno in polovično koncentracijo hranil

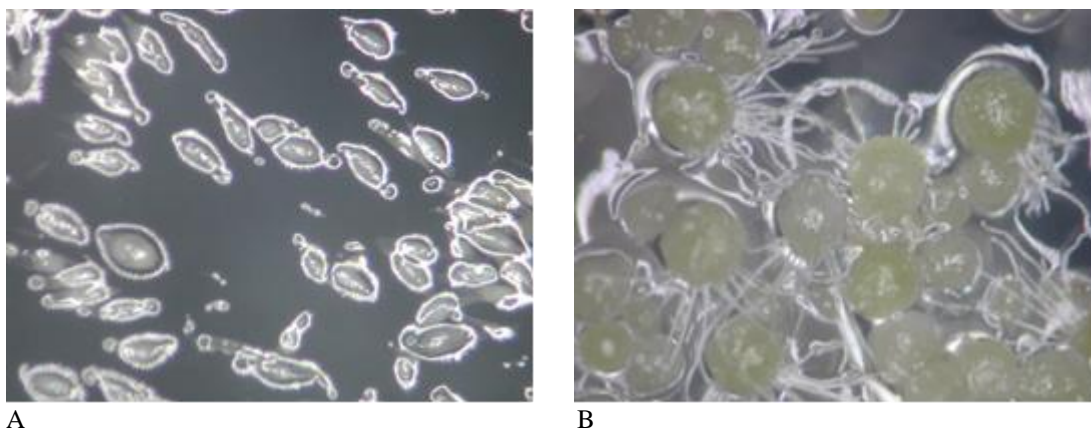
Ozn. semen. glavice	Oznaka in koncentracija gojišča											
	S1 polna			S1 polovična			S2 polna			S2 polovična		
	NS	P	R	NS	P	R	NS	P	R	NS	P	R
1	+++	+++	++	+++	++	++	+	+	+	+++	+++	++
2	+++	+++	++	+++	+++	++	++	+	+	+++	+++	++
3	+++	+	++	+++	+	++	++	+	++	+++	++	++
4	+++	+	++	+++	+++	++	++	+	++	+++	++	++
5	+++	+	++	+++	+	++	++	+	++	+++	+	++
6	+++	+++	+	+++	+++	+	+	+	+	+++	+++	+
7	+++	+++	+	+++	+++	+	++	+	++	+++	++	+
8	+++	+	+++	+++	+++	+	-	-	-	+++	+	++
9	+	+	+	+	+	+	-	-	-	±	+	+
10	+++	+++	+	+++	+++	++	±	-	-	+	+	+
11	++	++	++	+++	+	+	+++	-	-	+++	-	-
12	+++	+	+	+++	+	+	+++	-	-	-	-	-
13	++	+	+	++	+	+	-	-	-	++	+	+
14	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
15	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
16	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

Legenda:

NS nabreklo seme, P protokorm, R rizoid

± rahlo opazna sprememba; + majhna prisotnost in nabreklost; ++ srednja prisotnost in nabreklost,

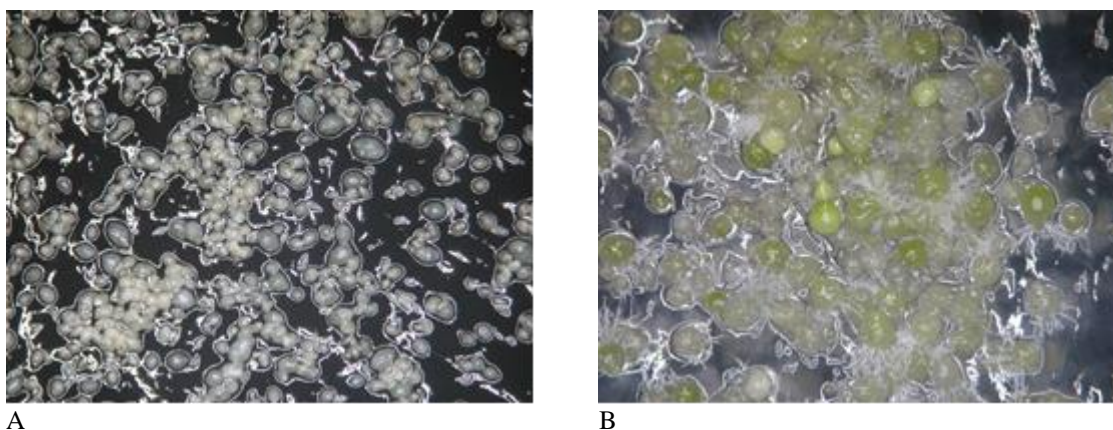
+++ velika prisotnost in nabreklost; - odsotnost



Slika 3: Semena orhidej *Phalaenopsis* tri tedne po inokulaciji na gojišče: A – kaliva in nekaliva semena; B – protokormi z rizoidi

4.3.4 Štiri tedne po inokulaciji semen

Štiri tedne po inokulaciji semen na gojišča pri večini semen ni bilo bistvenih sprememb v razvojnih fazah, razen, da so se protokormi povečali v primerjavi s prejšnjim tednom. Na gojišču S1 s polovično koncentracijo hranil so se protokormi podaljšali in imeli steklast videz. Na gojišču S2 s polovično koncentracijo hranil so bili pri oznaki 10 lepo vidni rizoidi. Pri oznakah semen 8, 9, 10 in 13 so se pri polni koncentraciji istega gojišča pojavili posamezni protokormi. Pri oznakah semen 12, 14 in 15 na gojišču S2 pri polni koncentraciji hranil se protokormi v tem obdobju še niso pojavili (slika 4).

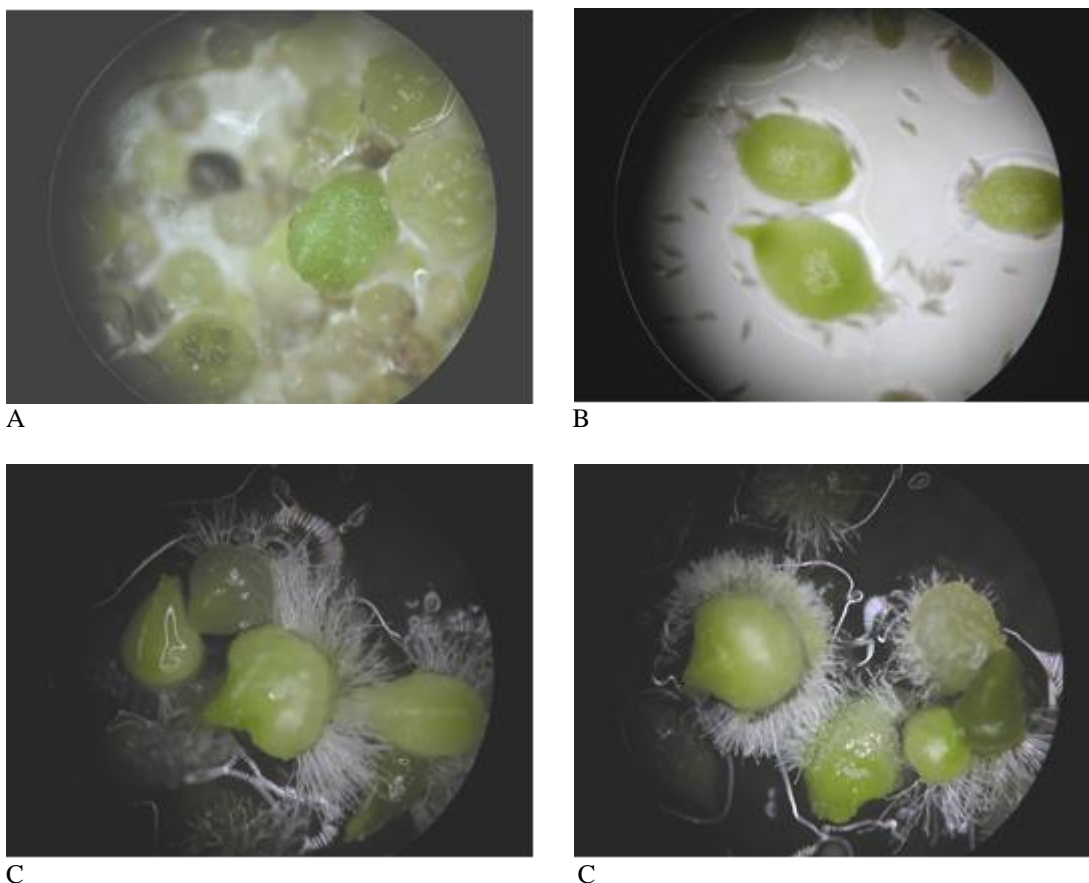


Slika 4: Semena orhidej *Phalaenopsis* štiri tedne po inokulaciji na gojišče: A – kaliva in nekaliva semena ter pojav protokormov; B – protokormi z gostejšimi rizoidi

4.3.5 Pet tednov po inokulaciji semen

Pet tednov po inokulaciji semen na gojišče S1 s polno koncentracijo hranil, so začeli protokormi z oznakami 1 – 11 propadati. Pojavile so se nekroze v obliki razbarvanja protokormov. Na začetku, ko je prišlo do razpada klorofila, so postali protokormi rumeni, nato rjavi in na koncu črni (slika 5A). Nepropadli protokormi so se v tem obdobju povečali

in pojavili so se zametki za list (slika 2D, 5A in B). Na gojišču S1 s polovično koncentracijo hranil se je pri oznakah 2 – 6 pojavila naslednja razvojna faza, protokorm z rizoidi (slika 2E). Pri oznakah 1 in 2 so se pojavili zametki prvih pravih listov (slika 2F in 5C). Na gojišču S2 s polno koncentracijo hranil so se pri semenih z oznako 12, 13, 15 in 16 pojavili prvi protokormi (slika 2C in D). Semena z oznako 9, 12, 13, 14 in 15 po petih tednih na gojišču S2 s polno koncentracijo hranil, še niso kalila (slika 2A). Pri križanju z oznako 16 so se pojavili posamezni protokormi in pri 1 – 8 so se protokormi povečali. Pri oznakah semen 3, 9, 10 in 12 so se začeli pojavljati protokormi in nekateri so ozeleneli (slika 2C, D in 5B). Pri 12 so bili prisotni posamezni protokormi s številnimi rizoidi (slika 2E in 5C). Pri 13 – 16 so se začeli pojavljati protokormi (slika 2C). Pri oznaki semen 13 so bili prisotni protokormi s številnimi rizoidi (slika 2E). Na gojišču S2 s polovično koncentracijo hranil so se pojavili protokormi, nekateri od njih so imeli številne rizoide, razen pri oznaki semen 14 (slika 5C).



Slika 5: Semena orhidej *Phalaenopsis* pet tednov po inokulaciji na gojišče: A – propadanje protokormov; B – razlika v velikosti med nekalivimi semeni in protokormi z zametkom za list; C – protokormi z rizoidi in zametki za list

4.3.6 Šest tednov po inokulaciji semen

Šest tednov po inokulaciji na gojišče S1 s polno koncentracijo hranil je večina semen z oznakami 1 – 7 zastala v razvoju. Nabrekla semena in protokormi so začeli propadati.

Propad je bil najbolj opazen pri semenih 1 in 11. Poleg propadlih, se je večina protokormov povečala in pri oznakah 2 – 8 so se pojavili zametki za liste (slika F2). Pri oznakah 12 – 16 je bil opazen zaostanek v razvoju oz. ni bilo opazne spremembe v primerjavi pred enim tednom. Pri polovični koncentraciji gojišča S1 je večina protokormov z oznakami 1, 2, 3, 7 in 8 imela zametke za liste (slika 2F). Majhni, zeleni protokormi so bili prisotni pri oznakah 12 – 16 (slika 2D), pri 14 so bili protokormi šele v fazi nastanka (slika 2C). Na gojišču S2 s polno koncentracijo hranil smo šest tednov po inokulaciji semen opazili propadanje nabreklih semen oz. v fazi nastanka protokormov pri oznakah 1, 4, 5 in 7. Semena z oznakami 9, 12 - 16 v obdobju šestih tednov niso sprejela vode oz. se niso povečala (slika 2A). Pri oznaki 2 so bili protokormi zelo veliki. Pri oznaki 4 je bila opažena zelo dobra rast protokormov in pojav prvih listov. Pri oznakah 1, 2, 3, 5 – 8 so imeli protokormi veliko rizoidov (slika 2F), a brez zametkov za prve liste. Na S2 gojišču s polovično koncentracijo hranil so se zametki prvih listov pojavili pri oznakah 2, 3 in 7 ter prav tako so bili pri teh kombinacijah križanj posamezni protokormi z največjimi listi. Oznake 9, 12 - 16 so bile v razvojni fazi, pojav protokormov in zeleni protokormi (slika 2C in D). Pri ostalih kombinacijah križanj z oznako 1, 4, 5, 6, 8, 10 in 11 so imeli protokormi številne rizoidne (slika 2E).

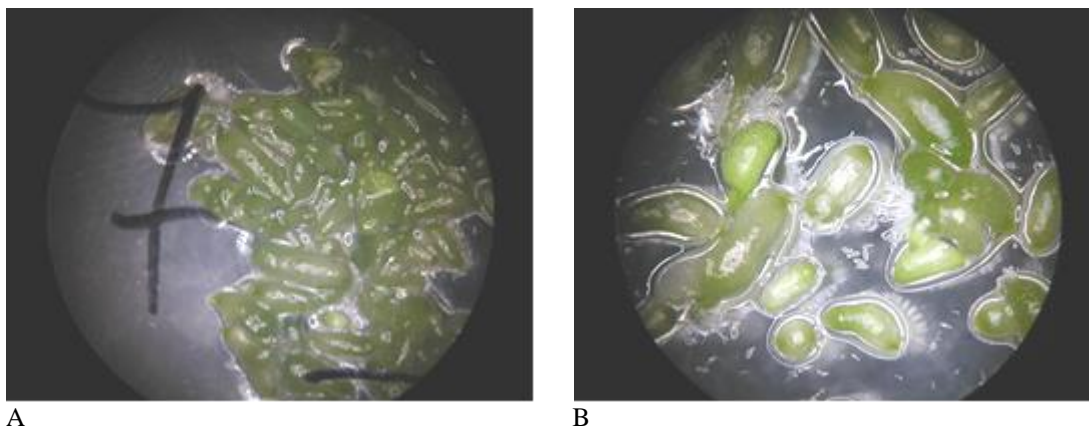
4.3.7 Sedem tednov po inokulaciji semen

Sedem tednov po inokulaciji semen na gojišče S1 s polno koncentracijo hranil je skoraj vso seme z oznakami 1 in 3 propadlo, pri ostalih ni bilo vidnih sprememb. Razen pri oznakah 4 in 7 so se pojavili podolgovati protokormi (slika 6A). Nekateri od njih so bili zašiljeni v špičko (zametek za list) in svetleče prozorni – vitrificirani (slika 6A in B). Na gojišču S1 s polovično koncentracijo hranil so začeli protokormi propadati in sicer pri semenih z oznakami 5, 6, 9 in 11 – 15 (slika 7A). Na gojišču S2 s polno koncentracijo hranil je bil opazen pojav propadanja semen pri oznakah 3 in 4, pri 9 je propadel samo en protokorm, ostali so bili še vitalni. Protokormi, ki so propadali, so začeli postopoma rumeneti, kar je kazalo na razpad klorofila (slika 7A). Pri oznakah 14, 15 in 16 so semena samo nabreкла. Na gojišču S2 s polovično koncentracijo hranil so bili pri oznakah 1 – 7 lepi, veliki protokormi v fazi zametka za liste s številnimi rizoidi (slika 7B). V tem obdobju smo opazili pomembno razliko v obliki protokormov. Na gojišču S1 ne glede na koncentracijo hranil so se daljšali in prisotnih je bilo manj rizoidov. Na gojišču S2 so se večali enakomerno in imeli so veliko rizoidov (slika 6A in 7A).

4.3.8 Osem tednov po inokulaciji semen

Osem tednov po inokulaciji semen na gojišče S1 s polno koncentracijo hranil je bila pri oznakah 1 – 5 prisotna faza protokorm z rizoidi in listi (slika 2E in F) ter so v enem tednu skoraj vsi propadli. Pri 6 je imela večina protokormov že list. Pri 7 so bili protokormi veliki, nekateri okrogle, nekateri pa podolgovate oblike. Pri 8 so bili protokormi podolgovati in zašiljeni v špičko. Pri oznakah 9 – 12 sta bili prisotni razvojna faza zeleni protokorm in protokorm z rizoidi ter pri 10, 11 in 12 so imeli protokormi že liste (slika 2D, E in F). Pri oznakah 13, 14, 15 in 16 so bili prisotni beli in zeleni protokormi (slika 2C in D). Na gojišču S1 s polovično koncentracijo hranil je bil rezultat pri oznakah 1 – 4 zelo podoben kot pri gojišču S1 s polno koncentracijo hranil, skoraj vsi protokormi so propadli. Pri oznakah 5 – 9 in 13 so bili prisotni protokormi z rizoidi (slika 2E), pri oznaki 7 pa

zeleni protokormi (slika 2D). Pri oznakah 10 in 14 je bila prisotna faza protokorm in protokorm z rizoidi ter tudi z listi. Pri oznakah 12 in 13 je bil prisoten samo po en protokorm. Pri polni koncentraciji gojišča S2 pri oznakah 1, 2, 10, 13 in 14 je skoraj vso nabreklo seme propadlo, prav tako protokormi z rizoidi pri oznakah 15 in 16. Pri oznaki 3 – 7 je bila večina protokormov z rizoidi. Pri oznaki 4 je bilo mnogo velikih protokormov. Pri oznakah 6 in 7 so imeli protokormi veliko rizoidov. Pri 7 so bili protokormi večji in številčnejši z daljšimi rizoidi. Pri 8, 9 in 11 – 13 je bilo le nekaj protokormov in ti so začeli propadati. Na polovični koncentraciji gojišča S2 je v obdobju osmih tednov, kar je nastalo, propadlo. Pri oznakah 3 in 4 so prevladovali protokormi z rizoidi. Pri oznaki 4 so bili protokormi največji od vseh kombinacij in imeli so največ rizoidov. Pri oznakah 5 – 8, 10, 11 – 15 in 16 je bilo prisotnih veliko protokormov s številnimi rizoidi. Pri oznaki 9 so se pojavili posamezni protokormi s številnimi rizoidi.



Slika 6: Podolgovati vitrificirani protokormi orhidej *Phalaenopsis*: A – na gojišču S1 pri oznaki 7; B – na gojišču S1 pri oznaki 4



Slika 7: Začetek propadanja protokormov sedem tednov po inokulaciji semen orhidej *Phalaenopsis* na gojišča

4.3.9 Devet tednov po inokulaciji semen

Devet tednov po inokulaciji semen na gojišče S1 s polno koncentracijo hranil je pri oznakah 1 in 3 skoraj vse propadlo. Pri 12 in 13 so bili protokormi v začetnih fazah (slika 2C in D), pri oznaki 2 so imeli protokormi rizoide (slika 2E). Pri oznaki 4, 5 in 7 so bili protokormi podolgovati in nekaj jih je propadlo, večina vitalnih protokormov je imela že zametek za list (slika 2F). Pri 8 in 11 so bili protokormi v različnih fazah razvoja (slika 2C do F). Pri 9, 10, 13 in 14 so se pri nekaterih protokormih pojavili črni, propadli rizoidi. Pri 15 so se pojavili posamezni protokormi z rizoidi in pri 16 ni bilo sprememb glede na prejšnji teden, najštevilčnejša je bila faza nabreklo seme in beli protokorm (slika 2B in C).

Na gojišču S1 s polovično koncentracijo hranil so se pri oznaki 1 pojavile nekroze protokormov. Pri oznaki 4 in 7 so se nekateri protokormi povečali in nastali so rizoidi, večina je stagnirala v razvoju. Pri oznaki 5 in 6 so imeli protokormi rizoide (slika 2E) in pojavilo se je odmiranje protokormov. Pri 8, 9 in 10 so imeli protokormi zametke za liste (slika 2F), pri 8 so se pojavili zametki za drugi list in prve korenine. Pri oznaki 11 so protokormi začeli propadati. Pri oznakah 12, 14 in 15 so bili protokormi v različnih fazah razvoja, beli in zeleni tudi z rizoidi (slika 2C, D in E) ter pojavilo se je odmiranje protokormov. Pri oznaki 13 in 16 so bili protokormi v fazah zeleni protokorm in protokorm z rizoidi, pri oznaki 13 so začeli propadati.

Na gojišču S2 s polno koncentracijo hranil so pri oznakah 1, 3 in 12 imeli protokormi rizoide (slika 2E). Pri oznaki 1 so se pojavljali posamezni protokormi, pri oznaki 3, 5 in 7 pa so bili prisotni zelo veliki protokormi, ki so začeli propadati. Pri oznakah 6, 8 in 11 so bili prisotni posamezni protokormi z rizoidi. Pri 9, 10, 13 in 14 je bil prisoten samo po en protokorm, ki je začel propadati. Pri 15 so se začeli pojavljati posamezni protokormi in nabrekla semena so začela propadati. Prav tako so se pri oznaki 16 začeli pojavljati protokormi.

Na gojišču S2 s polovično koncentracijo hranil so imeli posamezni protokormi rizoide. Pri oznakah 2, 3 – 8 in 10 – 11 so imeli protokormi prvi list in večina je imela viden drugi list ter prve korenine. Pri 5 in 6 so bili protokormi zelo veliki. Pri 3 so bili protokormi zelo veliki in podolgovati, imeli so številne rizoide in viden drugi list ter prve korenine. Pri oznaki 9, 11, 12 in 14 – 16 so bili protokormi v fazi z rizoidi in brez rizoidov.

4.3.10 Dvanajst tednov po inokulaciji semen

Dvanajsti teden pred zaključkom poskusa smo na označeni površini ene ponovitve petrijevk prešteli število vitalnih in propadlih protokormov ter nabreklih in nekalivih semen (preglednica 6 in 7).

Preglednica 6: Število vitalnih in propadlih protokormov ter nabreklih in nekalivih semen orhidej *Phalaenopsis*, inokuliranih na gojišče S1 s polno in polovično koncentracijo hranil iz 16 semenskih glavice

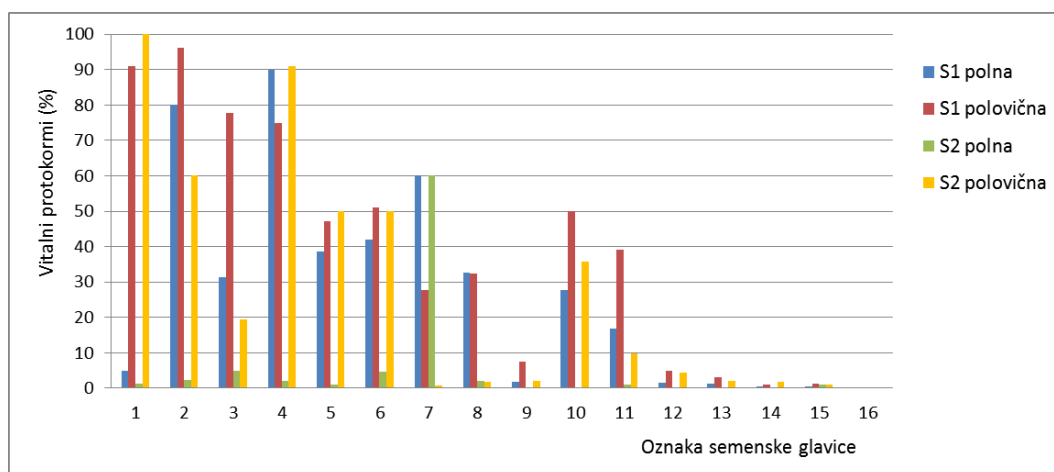
Oznaka semen. glavice	Gojišče S1							
	polna koncentracija hranil				polovična koncentracija hranil			
	vitalni protok.	propadli protok.	nabrekla semena	nekaliva semena	vitalni protok.	propadli protok.	nabrekla semena	nekaliva semena
1	4	76	0	0	20	2	0	0
2	16	0	4	0	50	0	0	2
3	15	3	30	0	70	0	20	0
4	9	1	0	0	30	0	10	0
5	22	15	0	20	40	5	0	40
6	18	5	0	20	25	4	0	20
7	30	5	0	15	10	1	0	25
8	15	11	0	20	12	0	25	0
9	1	4	0	50	6	5	0	70
10	10	6	0	20	8	1	0	7
11	6	5	0	25	20	1	0	30
12	1	2	0	70	8	3	0	150
13	1	4	0	70	4	2	0	120
14	1	1	0	200	1	0	0	90
15	1	5	0	200	1	3	0	70
16	0	1	0	250	0	1	0	100

Preglednica 7: Število vitalnih in propadlih protokormov ter nabreklih in nekalivih semen orhidej *Phalaenopsis*, inokuliranih na gojišče S2 s polno in polovično koncentracijo hranil iz 16 semenskih glavice

Oznaka semen. glavice	Gojišče S2							
	polna koncentracija hranil				polovična koncentracija hranil			
	vitalni protok.	propadli protok.	nabrekla semena	nekaliva semena	vitalni protok.	propadli protok.	nabrekla semena	nekaliva semena
1	3	160	0	67	20	0	0	0
2	2	1	0	80	9	1	5	0
3	4	30	0	50	8	3	0	30
4	3	40	0	100	10	0	0	1
5	1	50	60	0	10	5	0	5
6	6	20	0	100	10	0	0	10
7	30	5	0	15	1	50	0	70
8	2	10	0	80	2	1	100	0
9	0	0	100	0	1	0	45	0

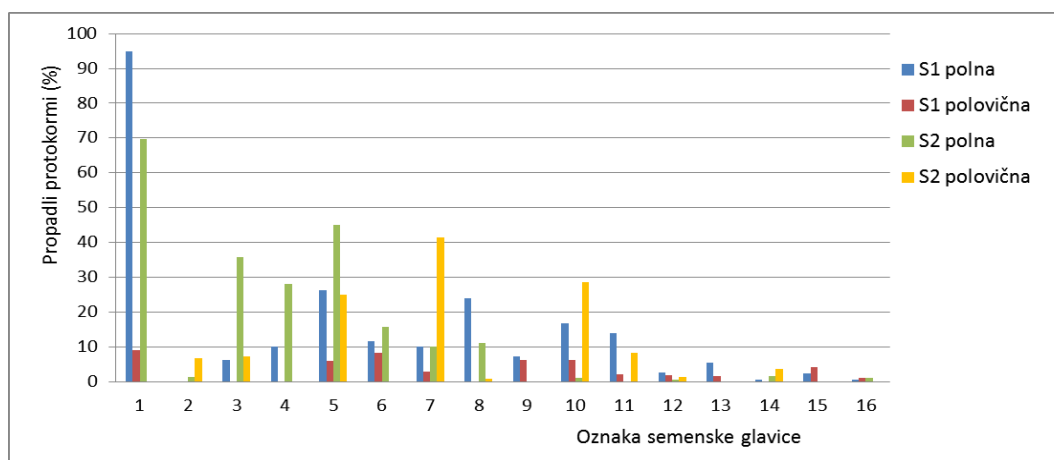
se nadaljuje

									nadaljevanje
10	0	1	100	0	5	4	0	5	
11	1	0	90	2	6	5	50	0	
12	0	1	250	0	9	3	0	200	
13	0	0	110	10	1	0	50	0	
14	0	2	120	0	2	4	50	50	
15	1	0	80	30	1	0	90	10	
16	0	1	0	100	0	0	90	20	



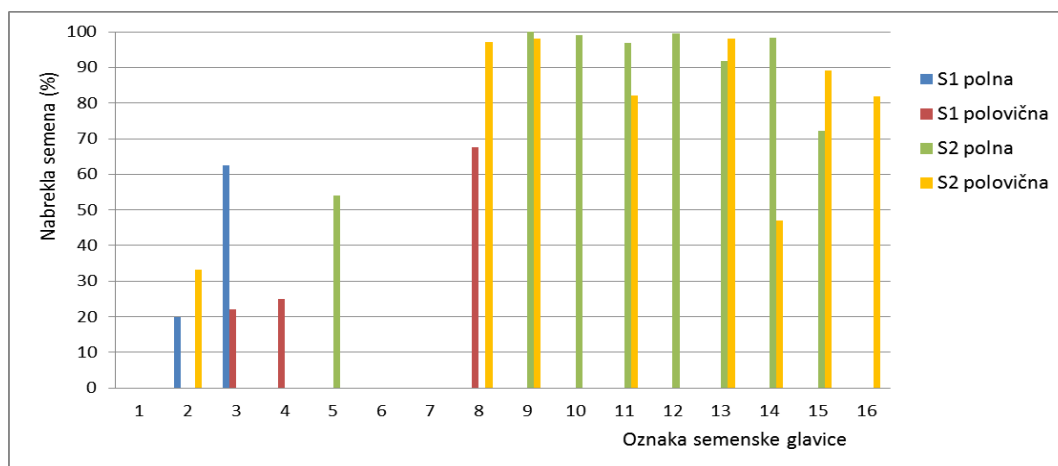
Slika 8: Odstotek vitalnih protokormov iz 16 semenskih glavice orhidej *Phalaenopsis* na štirih različnih gojiščih

Odstotek vitalnih protokormov je bil večji na gojiščih s polovično koncentracijo hranil, medtem ko je na gojiščih s polno koncentracijo hranil, predvsem pri gojišču S2, bil manjši. Opazne so bile tudi razlike med nastalimi protokormi iz različnih semenskih glavice. Iz semen z oznakami 1 – 8, 10 in 11 je nastalo bistveno več vitalnih protokormov, v primerjavi z oznakami 9 in 12 – 16 (preglednica 6, 7 in slika 8).



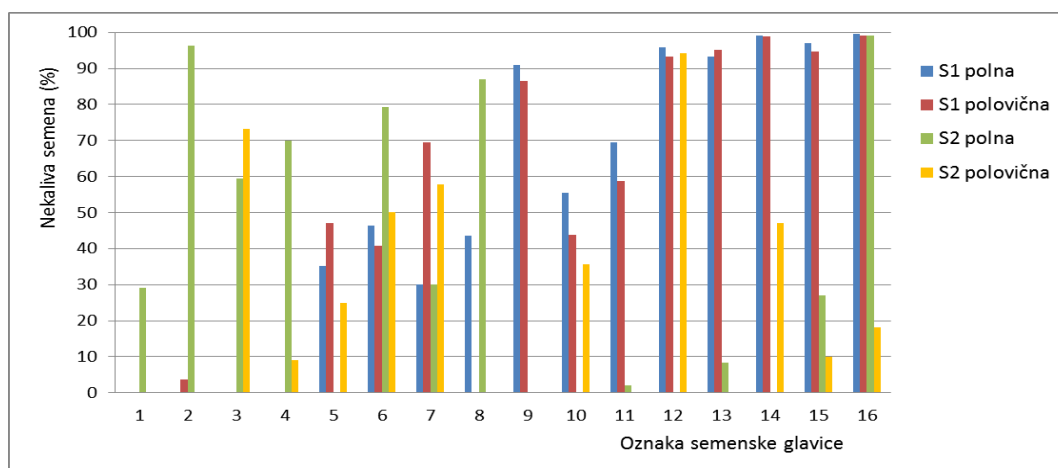
Slika 9: Odstotek propadlih protokormov iz 16 semenskih glavice orhidej *Phalaenopsis* na štirih različnih gojiščih

Veliko protokormov z oznako 1 je propadlo na obeh gojiščih s polno koncentracijo hranil in sicer 95 % na gojišču S1 in 69,6 % na gojišču S2. Protokormov, nastalih iz ostalih semenskih glavic, je propadlo 46 % in manj (preglednica 6, 7 in slika 9).



Slika 10: Odstotek nabreklih semen iz 16 semenskih glavic orhidej *Phalaenopsis* na štirih različnih gojiščih

Dvanajst tednov po inokulaciji semen na gojišča je ostalo nabreklih semen iz semenskih glavic z oznako 3, 5 in 8 – 16 od 54 % in več. V tej fazi so stagnirali in se niso razvijali v naslednjo fazo protokorm oziroma so počasi sprejemali vodo. Faza nabreklo seme je bila zelo močno prisotna na gojišču S2 s polno in polovično koncentracijo hranil pri semenih z oznako 8 – 16 (preglednica 6, 7 in slika 10).



Slika 11: Odstotek nekalivih semen iz 16 semenskih glavic orhidej *Phalaenopsis* na štirih različnih gojiščih

Odstotek nekalivih semen je bil od 0 % pri oznakah semen 1 – 4 in 8 – 14 na posameznih gojiščih, medtem ko je pri oznakah semen 2 in 12 – 16 bil večji od 90 % (preglednica 6, 7 in slika 11).

4.4 ANALIZA RAZVOJNIH FAZ

Dvanajsti teden po inokulaciji semen iz 16 semenskih glavic na štiri gojišča smo zbrali številčne podatke ene ponovitve o posameznih razvojnih fazah in jih statistično obdelali ter na podlagi dobljenih rezultatov in zastavljene ničelne hipoteze podajamo naslednje ugotovitve.

4.4.1 Analiza vitalnih protokormov

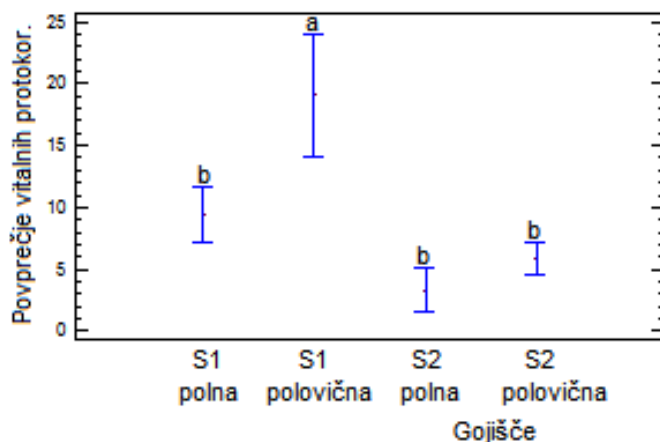
Preglednica 8: Analiza variance števila vitalnih protokormov orhidej *Phalaenopsis* po dvanajstih tednih inokulacije semen na štirih različnih gojiščih

Vir variabilnosti	VKO	SP	SKO	F-vrednost	p-vrednost
Med gojišči	2278,55	3	759,516	5,41	0,0023 **
Znotraj gojišč	8423,06	60	140,384		
Ostane	10701,61	63			

Pri številu vitalnih protokormov smo dobili statistično značilne ($p = 0,0023$) razlike med gojišči, in sicer je v povprečju največ, 19,1 protokormov nastalo na gojišču S1 s polovično koncentracijo hranil. Med ostalimi tremi gojišči S1 s polno koncentracijo hranil ter S2 s polno in polovično koncentracijo hranil ni bilo statistično značilnih razlik v številu vitalnih protokormov (preglednica 8, 9 in slika 12).

Preglednica 9: Duncan-ov test razlik v povprečnem številu vitalnih protokormov orhidej *Phalaenopsis* po dvanajstih tednih inokulacije semen na štirih različnih gojiščih

Gojišče/konc.hranil	Skupno	Povprečno št. vitalnih protokormov	Homogene skupine
S1 polovična	16	19,1	a
S1 polna	16	9,4	b
S2 polovična	16	5,9	b
S2 polna	16	3,3	b



Slika 12: Povprečno število vitalnih protokormov z mejami zaupanja orhidej *Phalaenopsis* po dvanajstih tednih inokulacije semen na štirih različnih gojiščih

4.4.2 Analiza propadlih protokormov

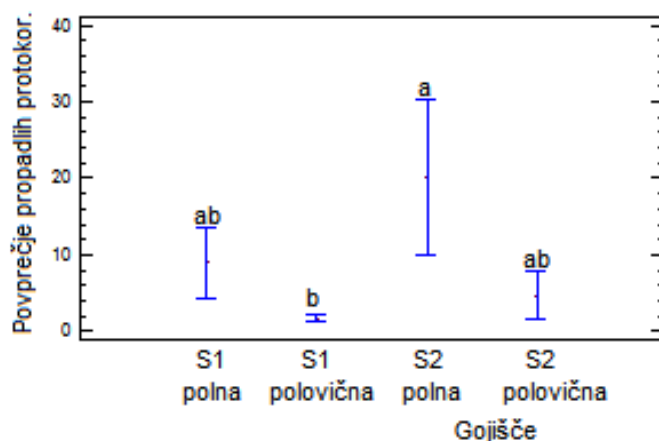
Preglednica 10: Analiza variance števila propadlih protokormov orhidej *Phalaenopsis* po dvanajstih tednih inokulacije semen na štirih različnih gojiščih

Vir variabilnosti	VKO	SP	SKO	F-vrednost	P-vrednost
Med gojišči	3087,3	3	1029,1	1,93	0,0491*
Znotraj gojišč	31990,9	60	533,2		
Ostane	35078,2	63			

Prav tako smo potrdili statistično značilne razlike v propadlih protokormih med gojišči ($p = 0.0491$), ki pa niso tako izrazite kot pri vitalnih protokormih. Največ, v povprečju 20,1, protokormov je propadlo na gojišču S2 s polno koncentracijo hranil, značilno najmanj, v povprečju 1,7 protokorma, je propadlo na gojišču S1 s polovično koncentracijo hranil. Med tema dva gojiščema obstajajo značilne razlike v prid gojišču S1 s polovično koncentracijo hranil (preglednica 10, 11 in slika 13).

Preglednica 11: Duncan-ov test razlik v povprečnem številu propadlih protokormov orhidej *Phalaenopsis* po dvanajstih tednih inokulacije semen na štirih različnih gojiščih

Gojišče/konc.hranil	Skupno	Povprečno št. propadlih protokormov	Homogene skupine
S2 polna	16	20,1	a
S1 polna	16	9,0	ab
S2 polovična	16	4,7	ab
S1 polovična	16	1,7	b



Slika 13: Povprečno število propadlih protokormov z mejami zaupanja orhidej *Phalaenopsis* po dvanajstih tednih inokulacije semen na štirih različnih gojiščih

4.4.3 Analiza nabreklih semen

Dvanajst tednov po inokulaciji semen na gojišča je bilo še vedno nekaj semen v fazi nabreklo seme. Ugotovljene so bile statistično značilne razlike ($p = 0,0007$) v številu nabreklih semen med uporabljenimi gojišči. V povprečju največ (56,8) nabreklih semen je

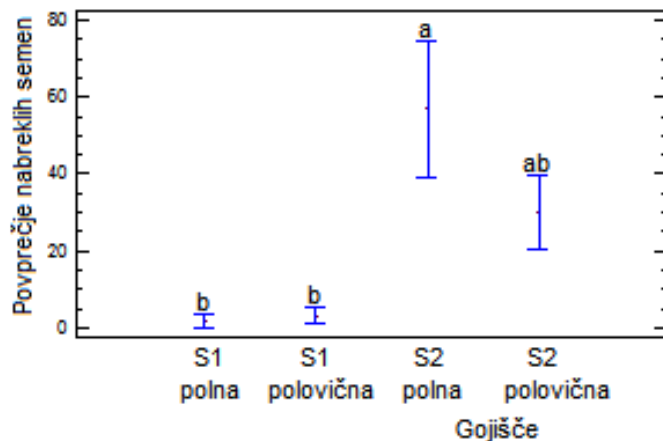
bilo na gojišču S2 s polno koncentracijo hranil in to gojišče se je statistično značilno razlikovalo od gojišča S1 s polovično koncentracijo hranil (v povprečju 3,4) in polno koncentracijo (v povprečju 2,1) (preglednica 12, 13 in slika 14).

Preglednica 12: Analiza variance števila nabreklih semena orhidej *Phalaenopsis* po dvanajstih tednih inokulacije na štirih različnih gojiščih

Vir variabilnosti	VKO	SP	SKO	F-vrednost	P-vrednost
Med gojišči	32238,8	3	10746,3	6,55	0,0007 ***
Znotraj gojišč	98473,4	60	1641,22		
Ostane	130712,2	63			

Preglednica 13: Duncan-ov test razlik v povprečnem številu nabreklih semen orhidej *Phalaenopsis* po dvanajstih tednih inokulacije na štirih različnih gojiščih

Gojišče/konc.hranil	Skupno	Povprečno št. nabreklih semen	Homogene skupine
S2 polna	16	56,8	a
S2 polovična	16	30,0	ab
S1 polovična	16	3,4	b
S1 polna	16	2,1	b



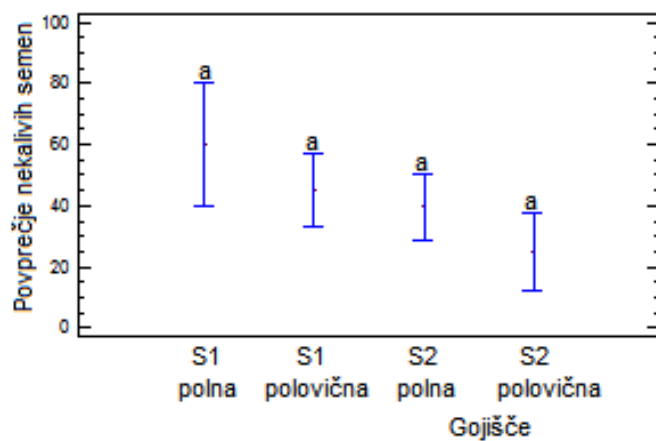
Slika 14: Povprečno število nabreklih semen z mejami zaupanja orhidej *Phalaenopsis* po dvanajstih tednih inokulacije na štirih različnih gojiščih

4.4.4 Analiza nekalivih semen

Preglednica 14: Analiza variance števila nekalivih semen orhidej *Phalaenopsis* po dvanajstih tednih inokulacije na štirih različnih gojiščih

Vir variabilnosti	VKOs	SP	SKO	F-vrednost	P-vrednost
Med gojišči	10018,3	3	3339,43	1,00	0,3985
Znotraj gojišč	200064,0	60	3334,39		
Ostane	210082,3	63			

Dvanajst tednov po inokulaciji semen na gojišča jih nekaj še vedno ni kalilo. S statistično analizo med gojišči nismo zasledili razlik ($p = 0,3985$), zato nismo opravili Duncan-ovega testa razlik. Razpon števila nekalivih semen je bil od povprečno 25 na gojišču S2 s polovično koncentracijo hranil do 60 na gojišču S1 s polno koncentracijo hranil (preglednica 14 in slika 15).



Slika 15: Povprečno število nekalivih semen z mejami zaupanja orhidej *Phalaenopsis* po dvanajstih tednih inokulacije na štirih različnih gojiščih

5 RAZPRAVA

Asimbiotsko kalitev orhidej iz rodu *Phalaenopsis* smo proučevali tako, da smo v poskus vključili 16 semenskih glavic 8-ih orhidej *Phalaenopsis*. Med seboj so se razlikovale po barvi in velikosti cvetov, številu cvetnih stebel ter številu nastalih semenskih glavic z viabilnimi semeni po opravljenem križanju (preglednici 1 in 2).

5.1 RASTLINSKI MATERIAL

Kot rezultat navzkrižnega in recipročnega križanja smo dobili semenske glavice na 8-ih rastlinah. Iz uspešno oplojenih cvetov smo postopoma pobirali semenske glavice. Neuspešno oplojeni cvetovi so predčasno odpadli. Inkompatibilnost kot posledica neustrezne kombinacije križanja je bila vzrok neuspešne oploditve in odpadanja cvetov ter nerazvitih semenskih glavic. Dozorelo je 32 semenskih glavic, kar polovica (16) jih je bila izločenih zaradi premalo semen ali semena niso vsebovala embrija, na kar lahko vplivajo različni dejavniki. Pri novejših komercialnih sortah je izbira starševskih rastlin zelo pomembna za pridobitev viabilnih semen. Tang in Chen (2007) sta križala diploidno orhidejo *Phalaenopsis equestris* s tetraploidnim komercialnim križancem in dobila 50 - 57 % viabilnih semen, če je bila *Phalaenopsis equestris* izbrana kot moška rastlina. Ko je bila izbrana kot ženska rastlina, viabilnih semen ni bilo. V tem primeru gre za triploidne križance, ki so večinoma sterilni (Christenson, 2001). Pri navzkrižnem in recipročnem križanju komercialnih sort *Phalaenopsis* Lesar in sod. (2012) poročajo, da je 76,7 % oprasnih cvetov razvilo semenske glavice in viabilna semena so bila v 82,6 % semenskih glavic. Ostale semenske glavice so predčasno odpadle ali pa so bile prazne, brez semen. V našem primeru je samo 50 % oprasnih cvetov razvilo semenske glavice, ki so bile vključene v poskus. Hicks (2000) izpostavlja, da bi pri križanjih morali izbrati rastlino z manjšimi cvetovi kot žensko rastlino in rastlino z večjimi cvetovi kot moško rastlino. Po kalitvi na brazdi pelod manjših cvetov ni sposoben razviti dovolj dolge pelodne cevi, ki bi dosegla jajčno celico v plodnici večjega cveta. V našem primeru smo imeli 8 rastlin, od katerih so imele štiri rastline velike cvetove, dve rastlini srednje velike in dve rastlini majhne cvetove. Ker smo izvedli navzkrižno in recipročno križanje oziroma prenos peloda je vsak cvet imel vlogo matere in tudi očeta.

5.2 RAZKUŽEVANJE SEMEN

Izbrani način razkuževanja in uporabljeno sredstvo, 1,6 % dikloroizocianurna kislina z dodatkom močila Tween 20, sta ugodno vplivala na uspešno razkuževanje semen, saj smo dosegli 90,6 % sterilnost kulture. Hicks (2000) navaja kot najuspešnejše sredstvo za razkuževanje semen kalcijev hipoklorit, ki ga v našem poskusu nismo uporabili. Pomembno je na uspeh razkuževanja vplivalo tudi centrifugiranje pri 5.000 obratih/min in 4 °C. S centrifugiranjem smo izničili površinsko napetost semen in tako je tekočina za razkuževanje bolje razkužila semena. Vzrok za pojav okužb pri 9,6 % petrijevok je bila plesen in te petrijevke so bile izločene. O nekoliko večji 23,7 % okužbi pri semenih orhideje *Phalaenopsis* poroča Čeranič (2010), medtem ko Kreft (2014) navaja pri orhideji *Bletilla striata*, da je dosegla 100 % aseptično kulturo pri enakem načinu razkuževanja semen, kot smo ga uporabljali v našem poskusu.

5.3 VPLIV GOJIŠČA NA KALITEV IN RAZVOJ SEJANČKOV

Gojišči S1 in S2 sta vsebovali enako količino makro- in mikroelementov, strjevalca ter imela enako pH vrednost. Gojišče S2 je vsebovalo še bananin prašek in oglje ter večje koncentracije vitaminov, gojišče S1 pa je vsebovalo hormona α -naftalen očetno kislino 0,5 mg/l in 6-benzil aminopurin 2 mg/l. V poskus smo vključili polno in polovično koncentracijo obeh gojišč.

Semena smo pred inokulacijo namakali v sterilni vodi 1 uro pri sobni temperaturi. O ugodnem vplivu kratkotrajnega namakanja semen poroča Arditti (1992). Navaja, da je zunanja plast teste pri zrelih semenih zelo otrdela in slabo prepustna za vodo. Zato smo jo poskušali s hladnim centrifugiranjem pri 4 °C razrahljati in z 1 urnim predhodnim namakanjem omogočiti dostop vode v notranjost pred inokulacijo semen na gojišče.

En teden po inokulaciji so semena sprejela vodo iz gojišča, kar smo opazili kot povečanje oziroma nabrekanje. Dva tedna po inokulaciji so se embriji še povečali in pojavljati so se začeli protokormi. Tretji teden so protokormi ozeleneli in se v naslednjem tednu povečali. Peti teden so se začeli na protokormih pojavljati rizoidi in začelo se je tudi propadanje protokormov. Največ protokormov je propadlo na gojišču S2 s polno koncentracijo hranil in statistično značilno ($p = 0.0491$) manj propadlih je bilo na gojišču S1 s polovično koncentracijo hranil. Šesti teden so se rizoidi podaljšali in tudi zgostili. V sedmem in osmem tednu so se pojavili zametki za liste. V devetem tednu so se pojavili na gojišču S1 s polovično koncentracijo hranil tudi zametki za drugi list in korenine ter sejanci so na tem gojišču ostali vitalni, brez znakov nekroz. Prve rastline z dvema listoma in eno ali dvema koreninama smo na tem gojišču dobili že 12. teden oziroma 84 dni po inokulaciji semen. Hinnen in sod. (1989) poročajo o pomembnosti dušika in da močna rast poganjka lahko negativno vpliva na formiranje in rast korenin. Arditti (1992) poroča, da razvoj sejancev *in vitro* lahko traja od 7 do 100 tednov, kar je odvisno od genotipa in od *in vitro* razmer.

Dvanajst tednov po inokulaciji semen na gojišča je nekaj nabreklih semen obstalo v razvoju oziroma so počasi sprejemala vodo in v njej raztopljena hranila. Ugotovili smo značilne razlike ($p = 0,0007$) v uporabljenih gojiščih. V povprečju je bilo največ, kar 56,8, nabreklih semen na gojišču S2 s polno koncentracijo hranil in to gojišče se je statistično značilno razlikovalo od gojišča S1 s polovično koncentracijo hranil, kjer je bilo v povprečju nabreklih semen 3,4 in na gojišču S1 s polno koncentracijo hranil samo 2,1.

Nekaj semen ni kalilo in nismo potrdili značilnih razlik med gojišči ($p = 0,3985$). V povprečju je bilo najmanj nekalivih semen (25) na gojišču S2 s polovično koncentracijo hranil in največ (60) na gojišču S1 s polno koncentracijo hranil. Nekaj od nekalivih semen je bilo brez embrija, kar nismo temeljito preverjali. Kreft (2014) navaja za orhidejo *Bletilla striata* za semena, pridobljena v dveh letih iz iste rastline, da je bilo v povprečju 27,9 % semen brez embrija.

6 SKLEPI

Iz 8 rastlin *Phalaenopsis* smo dobili 16 semenskih glavic, katerih semena smo uporabili za ugotavljanje njihove asimbiotske kalitve in razvoja do drugega pravega lista.

Izbira gojišča s strjevalcem Gellan gum in ostalimi sestavinami je na splošno dobro vplivala na kalitev in razvoj do drugega pravega lista.

Način razkuževanja in uporaba 1,6 % dikloroizocianurne kisline sta bila zelo učinkovita, saj smo dobili 90,6 % aseptično kulturo, v 9,4 % petrijevk s semeni pa se je pojavila okužba s plesnijo.

Kombinacija hormonov NAA in BAP v gojišču S1 je vplivala na nastanek podolgovatih protokormov s steklastim videzom in redkimi rizoidi, medtem ko sta oglje in bananin prašek v gojišču S2 vplivala na nastanek velikih, okroglih protokormov s številnimi rizoidi.

V obdobju 12 tednov se je pojavilo vseh 5 razvojnih faz kalitve: nabreklo seme, protokorm, protokorm z rizoidi, protokorm s prvim pravim listom in protokorm z dvema pravima listoma ter korenino.

Tri tedne po inokulaciji so se protokorni povečali in imeli so že veliko rizoidov. Največ vitalnih protokormov je nastalo na gojišču S1 s polovično koncentracijo hranil. Bile so že opazne razlike pri rasti in razvoju med gojiščema S1 in S2 ter koncentracijo hranil. Prisoten je bil tudi vpliv ustreznih oziroma neustreznih kombinacij križanj. Ustrezne kombinacije križanj z viabilnimi semeni so imele oznake 1 – 8, 10 in 11.

Pet tednov po inokulaciji so se pojavile nekroze semen in protokormov, predvsem na gojišču S2 s polno koncentracijo hranil.

Dvanajst tednov po inokulaciji se je začel pojavljati drugi list in prve korenine na gojišču S1 in S2 s polovično koncentracijo hranil.

Upoštevajoč vse razvojne faze v obdobju 12 tednov lahko potrdimo, da so bile najuspešnejše kombinacije križanj 1 – 8, srednje uspešne 9 – 11 in neuspešne 12 – 16.

Gojišči S1 in S2 s polovično koncentracijo hranil sta primernejši za kalitev in razvoj orhidej *Phalaenopsis*.

7 POVZETEK

Ročno smo 14. 3. 2008 oprášili 48 cvetov. Od teh se 16 cvetov ni oplodilo in so predčasno odpadli. Semenske glavice so nastale kot rezultat navzkrižnega in recipročnega križanja. V poskus asimbiotske kalitve smo vključili 16 dozorelih semenskih glavic, ki so bile rezultat uspešnega križanja 5 od 8 komercialnih orhidej rodu *Phalaenopsis*. Orhideje so se med seboj razlikovale po številu cvetnih stebel ter velikosti in barvi cvetov.

Semena smo 18. 2. 2009 površinsko razkužili z 1,6 % dikloroizocianurno kislino in inokulirali na dve vrsti gojišč S1 in S2 (preglednica 2) s polno in polovično koncentracijo hranil v dveh ponovitvah. Skupno smo inokulirali semena na gojišča 128 petrijevk. Dosegli smo 90,6 % aseptično kulturo. Vir okužbe v 9,4 % petrijevk s semeni je bila plesen. Kulturo semen smo gojili v rastni komori pri fotoperiodi 16 ur svetloba in 8 ur tema, temperaturi 23 °C in osvetlitvi 40 μ mol m⁻² s⁻¹.

Pri eni ponovitvi za vsako obravnavanje smo na naključno izbranem mestu, na pokrovu petrijevke, označili površino 1 cm² in znotraj te opravljali bonitiranja (slika 1). Z bonitiranjem smo začeli en teden po inokulaciji in 1-krat tedensko nadaljevali do devetega tedna. Nato smo 12. teden opravili zadnje bonitiranje s štetjem posameznih razvojnih faz znotraj naključno označene površine. Opravili smo 9 bonitiranj, v katerih smo spremljali nabrekanje semen, kalitev in razvojne faze do drugega lista in pojava korenin. Pri opazovanju smo uporabljali stereomikroskop pri 20-kratni povečavi.

Zbrane številčne podatke smo obdelali z analizo variance skupin in statistično značilne razlike v razvojnih fazah med gojišči potrdili z Duncan-ovim testom razlik s programom Statgraphics XV. Zastavili smo si ničelno hipotezo - H₀, da med uporabljenimi gojišči ne obstajajo razlike v povprečnem številu vitalnih in propadlih protokormov ter v številu nabreklih in nekalivih semen.

Odstotek vitalnih protokormov je bil večji na gojiščih s polovično koncentracijo hranil, medtem ko je na gojiščih s polno koncentracijo hranil, predvsem na gojišču S2, bil manjši. Opazne so bile tudi razlike med nastalimi protokormi iz različnih semenskih glavic, ki so nastale kot rezultat različnih križanj. Iz semen z oznakami 1 – 8, 10 in 11 je nastalo bistveno več vitalnih protokormov, v primerjavi z oznakami 9 in 12 – 16 (preglednica 6, 7 in slika 8). Veliko protokormov z oznako 1 je propadlo na obeh gojiščih s polno koncentracijo hranil in sicer 95 % na gojišču S1 in 69,6 % na gojišču S2. Protokormov iz ostalih semenskih glavic je propadlo 46 % in manj (preglednica 6, 7 in slika 9). Iz semenskih glavic z oznako 3, 5 in 8 – 16 je ostalo v fazi nabreklo seme 54 % in več semen. Z ostankom nabreklih semen je izstopalo gojišče S2 s polno in polovično koncentracijo hranil pri oznakah 8 – 16 (preglednica 6, 7 in slika 10). Odstotek nekalivih semen je bil od 0 % pri oznakah 1 – 4 in 8 – 14 na posameznih gojiščih, medtem ko je bil pri oznakah semen 2 in 12 – 16 večji od 90 % (preglednica 6, 7 in slika 11).

Z analizo variance in Duncan-ovim testom razlik smo pri vitalnih protokormih dobili statistično značilne ($p = 0,0023$) razlike med gojišči, in sicer je v povprečju največ 19,1 protokormov nastalo na gojišču S1 s polovično koncentracijo hranil, medtem ko pri ostalih treh gojiščih ni bilo značilnih razlik (preglednica 8, 9 in slika 12). Prav tako smo dobili

značilne razlike med gojišči v propadlih protokormih ($p = 0.0491$). Največ, v povprečju 20,1, protokormov je propadlo na gojišču S2 s polno koncentracijo hranil, značilno najmanj, v povprečju 1,7, protokormov je propadlo na gojišču S1 s polovično koncentracijo hranil. Med tema dva gojiščema obstajajo značilne razlike, medtem ko pri ostalih dveh ni značilnih razlik (preglednica 10, 11 in slika 13). Nekatera semena so stagnirala v fazi nabreklo seme oziroma so zelo počasi sprejemala vodo. Tudi tu so bile ugotovljene značilne razlike ($p = 0,0007$) glede na gojišče. V povprečju največ (56,8) nabreklih semen je bilo na gojišču S2 s polno koncentracijo hranil in to gojišče se je statistično značilno razlikovalo od gojišča S1 s polovično (v povprečju 3,4 nabreklih semen) in polno koncentracijo hranil (v povprečju 2,1) (preglednica 12, 13 in slika 14). Nekaj semen ni kalilo. Med gojišči nismo potrdili značilnih razlik ($p = 0,3985$) oziroma gojišče ni imelo vpliva na slabo kalitev semen (preglednica 14 in slika 15).

Zastavljeno ničelno hipotezo, da med uporabljenimi gojišči ne obstajajo razlike v povprečnem številu vitalnih in propadlih protokormov ter nabreklih in nekalivih semenih lahko zavrnamo in sprejmemo alternativo, da ima gojišče vpliv na opazovane lastnosti, razen v primeru kalitve semen, kjer nismo potrdili statistično značilnih razlik med gojišči.

8 VIRI

- Arditti J. 1992. *Fundamentals of Orchid Biology*. New York, John Willey & Sons: 712 str.
- Arditti J., Ernst R. 1993. *Micropropagation of orchids*. New York, John Wiley & Sons, ZDA: 682 str.
- Arditti J., Ghani A.K.A. 2000. Numerical and physical properties of orchid seed and their biological implications. *Tansley Review*, 145: 367-421
- Bremer B., Bremer K., Chase m. W., Fay m. F., Reveal J.L., Soltis D.E., Soltis P., Stevens P.F. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161: 105-121
- Chase M. 2005. Classification of Orchidaceae in the age of DNA data. *Curtis's Botanical Magazine*, 22: 2-7
- Chen W.H., Chen T.M., Fu Y.M., Hsieh R.M., Chen W.S. 1998. Studies on somaclonal variation in *Phalaenopsis*. *Plant Cell Reports*, 18: 7-13
- Christenson E.A. 2001. *Phalaenopsis: a monograph*. Portland, Timber Press, Oregon, ZDA: 330 str.
- Chugh S., Guha S., Rao I.U. 2009. Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants. *Scientia Horticulturae*, 122: 507-520
- Čeranič N. 2010. Generativno razmnoževanje orhidej *Phalaenopsis* v *in vitro* razmerah. Diplomsko delo. Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 40 str.
- Dolar B. 2015. *Kukavičevke v Sloveniji*. Dobrova, Pipinova knjiga: 184 str.
- Dressler R.L. 1981. *The orchids: natural history and classification*. Cambridge, Massachusetts, Harvard University Press: 332 str.
- George E.F. 1993. *The propagation of orchids. V: Training manual for short course in orchids culture*. Lubag A.M. (ur.). Los banos, University of the Philippines, Ornamental Crops Division: 917-922
- Griesbach R.J. 1983. The use of indoleacetyl amino acid in the *in vitro* propagation of *Phalaenopsis* orchids. *Scientia Horticulturae*, 19: 363-366
- Hicks A.J. 2000. *Asymbiotic Technique of Orchid Seed Germination*. Chandler, The Orchid Seedbank Project: 134 str.

- Hinnen M.G.J., Pierik R.L.M., Bronsema F.B.F. 1989. The influence of *macronutrients* and some other factors on growth of *Phalaenopsis* hybrid seedlings *in vitro*. *Scientia Horticulturae*, 41: 105-116
- Jevšnik T. 2006. Orhideje: gojenje tropskih orhidej. Dobrovnik: Ocean Orchids: 149 str.
- Johansson L.B. 1986. Improved methods for induction of embryogenesis in anther cultures of *Solanum tuberosum*. *Potato Research*, 29: 179-190
- Johansson L.B., Calleberg E., Gedin A. 1990. Correlations between activated charcoal, Fe-EDTA and other organic media ingredients in cultured anthers of *Anemone canadensis*. *Physiologia Plantarum*, 80: 243-249
- Kramer J. 1997. *Orchids for everyone*. London, Salamander Books Limited: 208 str.
- Kreft P. 2014. Asimbiotska kalitev semen orhideje *Bletilla striata* (Thunb.) po hladnem centrifugiranju. Diplomsko delo. Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 35 str.
- Lesar H., Čeranič N., Kastelec D., Luthar Z. 2012. Asymbiotic seed germination of *Phalaenopsis* orchids after hand pollination. *Acta agriculturae Slovenica*, 99-1: 5-11
- Moore R. Clark W.D., Vodopich D.S. 1998. *Botany*. Boston, The McGraw-Hill Companies: 920 str.
- Paek K.Y., Hahn E.J., Park, S.Y. 2011. Micropropagation of *Phalaenopsis* Orchids via Protocorms and Protocorm – Like Bodies. Article in *Methods in Molecular Biology*, 710: 293-306
- Park Y.S., Kakuta S., Kano A., Okabe M. 1996. Efficient propagation of protocorm-like bodies of *Phalaenopsis* in liquid medium. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 45: 79-85
- Park S.Y., Murthy H.N., Paek K.Y. 2002. Rapid propagation of *Phalaenopsis* from floral stalk-derived leaves. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 38: 168-172
- Plant novelties: *Bletilla striata*. 2000
<http://www.botgard.ucla.edu/html/MEMBGNewsletter/Volume3number2/Bletilla.html>
(16.6.2016)
- Pridgeon A. 1999. *The Illustrated Encyclopedia of Orchids*. The Rocks, Landsowne Publishing Pty Ltd: 304 str.
- Ravnik V. 2002. *Orhideje Slovenije*. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 192 str.
- Rittershausen S., Pilcher M. 2000. *A Gardner`s Guide to Orchids and Bromeliads*. London, Merhurst Ltd: 96 str.

- Rotor G. 1949. A method of vegetative propagation of *Phalaenopsis* species and hybrids. American Orchid Society Bulletin, 18: 738-739
- 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: 9-15
- Sinkovič T. 2000. Uvod v botaniko – za študente visokošolskega strokovnega študija kmetijstva – agronomija in hortikultura. Ljubljana. Oddelek za agronomijo Biotehniške fakultete: 176 str.
- Smith S., Read D.J. 1997. Mycorrhizal symbiosis. London, Academic Press Ltd: 605 str.
- Squire D. 2005. The orchid specialist 2005. New Holland Publishers (UK) Ltd.: 80 str.
- Sweet H.R. 1980. The genus *Phalaenopsis*. Laguna Niguel, Orchid Digest Corporation, CA, ZDA: 128 str.
- Tanaka M., Sakanishi Y. 1978. Factors affecting the growth of in vitro cultured buds from *Phalaenopsis* flower stalks. Scientia Horticulturae, 8: 169-178
- Tang C.Y., Chen W.H. 2007. Breeding and Development of new varieties in *Phalaenopsis*. V: Orchids Biotechnology. Chen, W.H., Chen, H.H. (eds.). Singapur, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapur: 1-22
- Thompson P.A. 1996. Orchids from Seed. Kew, Royal Botanical Gardens: 29 str.
- Tokuhara K., Mii M. 1993. Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by culturing shoot tips of flower stalk buds. Plant Cell Reports, 13: 7-11
- Vijay R., Raina S. 2000. Genetic fidelity of organized meristem-derived micropropagated plants: a critical reappraisal. In Vitro Cellular and Developmental Biology, 36: 319-330
- Vodnik D. 2012. Osnove fiziologije rastlin. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 141 str.
- Yam T.W., Arditti J. 1990. Orchid seed germination and micropropagation: a short history. Malayan Orchid Review, 24: 38-47
- Yan J.F., Piao X.C., Sun D., Liana M.L. 2010. Production of protocorm-like bodies with bioreactor and regeneration in vitro of *Oncidium* 'Sugar Sweet'. Scientia Horticulturae, 125: 712-717
- Ziv M. 2005. Simple bioreactors for mass propagation of plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 81: 277-285

ZAHVALA

Najlepša hvala moji mentorici,izr. prof. dr. Zlati LUTHAR, za vso strokovno pomoč in moralno podporo ter ves vložen trud pri izvedbi diplomskega dela. Prav tako se najlepše zahvaljujem za pregled naloge recenzentki doc. dr. Jani MUROVEC in predsedniku komisije za zagovor prof. dr. Gregorju OSTERCU.

Hvala vsem zaposlenim na Oddelku za agronomijo, ki so pripomogli k dokončanju mojega študija.

Zahvaljujem se svojim najbližjim, družini in prijateljem, ki so me tekom študija podpirali in mi kakorkoli pomagali.

Hvala mojemu očetu Francu, ki mi je pomagal na začetku moje študijske poti.

Še posebej se zahvaljujem svoji mami Ireni za vso moralno in finančno podporo tekom študija do diplomiranja.

Hvala mojemu fantu Gregorju za vso pomoč in da mi je stal ob strani.

Hvala Damjani in Poloni za lektoriranje angleškega izvlečka.

Iskrena hvala vsem, ki so mi tekom študijskih let in pri izvedbi diplomskega dela kakorkoli pomagali.