

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Barbara ZANELLI

**MOŽNOSTI OBARVANJA BELIH CVETOV  
ORHIDEJE (*Phalaenopsis* sp.) Z RAZLIČNIMI  
BARVILI**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Barbara ZANELLI

**MOŽNOSTI OBARVANJA BELIH CVETOV ORHIDEJE  
(*Phalaenopsis* sp.) Z RAZLIČNIMI BARVILI**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij - 2. stopnja

**POSSIBILITIES OF COLORING WHITE ORCHIDS (*Phalaenopsis* sp.)  
WITH DIFFERENT DYES**

M. SC. THESIS  
Master Study Programme

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek Magistrskega študijskega programa 2. stopnje Hortikultura. Delo je bilo opravljeno na Katedri za sadjarstvo, vinogradništvo in vrtnarstvo.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorico magistrskega dela imenovala doc. dr. Valentino SCHMITZER.

Komisija za oceno in zagovor:

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

Članica: doc. dr. Valentina SCHMITZER  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Zlata LUTHAR  
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.

Barbara Zanelli

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ŠD | Du2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| DK | UDK 635.9:582.594:57.018.6:57.086.16(043.2)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| KG | okrasne rastline/ <i>Phalaenopsis</i> /orhideje/barva cvetov/barvanje/sorte/sistemsko barvilo/modro črnilo                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| AV | ZANELLI, Barbara                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| SA | SCHMITZER, Valentina (mentorica)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| KZ | SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| ZA | Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| LI | 2015                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| IN | MOŽNOSTI OBARVANJA BELIH CVETOV ORHIDEJE ( <i>Phalaenopsis</i> sp.) Z RAZLIČNIMI BARVILI                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| TD | Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| OP | IX, 45 str., 1 pregl., 38 sl., 33 vir.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| IJ | sl                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| JI | sl/en                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| AI | <p>Orhideje pripadajo družini kukavičevk (Orchidaceae), ki obsega okoli 750 rodov in 25 000 vrst in podvrst. Rod <i>Phalaenopsis</i> vsebuje okoli 70 vrst. Orhideje <i>Phalaenopsis</i> so nezahtevne za gojenje in so zato ene od najbolj prodajanih in priljubljenih lončnic. Čeprav obstaja veliko raznobarnih hibridov, so trenutno najbolj zanimive modre orhideje <i>Phalaenopsis</i>, ki v naravi ne obstajajo, saj ne vsebujejo pigmentov (glikozidov delfinidina in cianidina) za tvorbo modre barve cvetov. Žlahtniteljski poskusi za pridobivanje modrih cvetov so bili do sedaj manj uspešni, ker se modra barva izrazi le do stopnje vijoličnih odtenkov. Zato so razvili hitrejšo in lažjo metodo injiciranja sistema barvila v cvetno steblo. V magistrskem delu smo poskušali s primerno tehniko pridobiti modre cvetove orhidej <i>Phalaenopsis</i>. V poskus smo vključili dve sorti rodu <i>Phalaenopsis</i> – 'Anthura Bern' in 'Anthura Cambridge', ki imata bele cvetove. Uporabili smo specialno sistemsko sredstvo za barvanje rastlin v prahu Deep Blue A43 Absorbit Stem Dye, preliminarne poskuse pa smo izvedli tudi z barvanjem z modrim črnilom. Slednje se je izkazalo kot neučinkovito, zato smo v nadaljevanju poskusov določili primerno koncentracijo sistema barvila. Za najboljšo se je izkazala 1 % raztopina sistema barvila, ki je bila boljša od priporočene 2 % dobaviteljeve koncentracije. Močnejša 3,4 % koncentracija barvila, je vplivala na temnejšo modro barvo cvetov in hitrejšo maksimalno obarvanost ter slabšo obstojnost cvetov. Na predčasno odpadanje modrih cvetov je vplivalo več parametrov, kot so stres zaradi poškodbe cvetnega stebela in injiciranje sistema barvila. S transportnim sistemom se je barvilo preneslo tudi do listov. Injicirano barvilo je bilo obstojno le do odpadanja obarvanih cvetov, v naslednjem cvetenju pa so bili cvetovi spet beli.</p> |

## KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2

DC UDC 635.9:582.594:57.018.6:57.086.16(043.2)

CX ornamental plants/*Phalaenopsis*/orchids/color flowers/coloring/cultivars/ systemic dye/ blue ink

AU ZANELLI, Barbara

AA SCHMITZER, Valentina (supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy

PY 2015

TY POSSIBILITIES OF COLORING WHITE ORCHIDS (*Phalaenopsis* sp.) WITH DIFFERENT DYES

DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)

NO IX, 45 p., 1 tab., 38 fig., 33 ref.

LA sl

Al sl/en

AB Orchids belong to the orchid family (Orchidaceae), which includes 750 genera and 25 000 species and subspecies. The *Phalaenopsis* genus contains approx. 70 orchid species. *Phalaenopsis* orchids are simple to cultivate and are therefore one of the best-selling and favorite house plants. Even though there are lot of different-colored hybrids on the market, blue colored flowers of the *Phalaenopsis* genus do not exist because the species lacks the appropriate pigments (glucosides of delphinidin and cyanidin) which provide blue hues. Genetic manipulations aimed at producing blue flowering *Phalaenopsis* did not prove successful and the blue color has only expressed in violet hues. That is the reason for the development of a faster and easier method of synthetic dye injection into the flowering stem. In this master thesis we tried to produce blue flowers of *Phalaenopsis* orchid using an appropriate technique. Two white flowering varieties of the *Phalaenopsis* genus were included in the experiment - 'Anthura Bern' and 'Anthura Cambridge'. A special systemic powdered dye Deep Blue A43 Absorbit Stem Dye was used for injection and the preliminary tests were performed by coloring the stems with blue ink. The latter has shown ineffective; therefore, the appropriate concentration of the systemic colorant was determined in experiments on detached *Phalaenopsis* flowers. 1% solution of the systemic dye proved to be better than 2% solution, recommended by the supplier. The more intense, 3.4% solution of the dye caused darker blue color and faster maximal coloration of the flowers as well as weaker durability of flowers. The premature wilting and drop of blue flowers was ascribed to a number of parameters such as stress after damaging the flowering stem and the injection of systemic colorant. The dye was also transferred to the leaves via the transport system. The blue color of the flowers was only present until the drop of the affected flowers and the flowers bloomed white in the next flowering, suggesting that the dye does not stay in the plant system.

## KAZALO VSEBINE

|                                                                                              | Str. |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA                                                          | III  |
| KEY WORDS DOCUMENTATION                                                                      | IV   |
| KAZALO VSEBINE                                                                               | V    |
| KAZALO PREGLEDNIC                                                                            | VII  |
| KAZALO SLIK                                                                                  | VIII |
| <b>1 UVOD</b>                                                                                | 1    |
| 1.1 VZROK ZA RAZISKAVO                                                                       | 1    |
| 1.2 NAMEN RAZISKAVE                                                                          | 2    |
| 1.3 DELOVNA HIPOTEZA                                                                         | 2    |
| <b>2 PREGLED OBJAV</b>                                                                       | 3    |
| 2.1 ENOKALIČNICE                                                                             | 4    |
| 2.1.1 Listi                                                                                  | 4    |
| 2.1.2 Steblo                                                                                 | 6    |
| 2.1.3 Transport barvila do cveta                                                             | 7    |
| 2.2 DRUŽINA ORCHIDACEAE - KUKAVIČEVKE                                                        | 8    |
| 2.2.1 Razširjenost orhidej                                                                   | 10   |
| 2.2.2 Morfologija orhidej                                                                    | 10   |
| 2.2.2.1 Cvet                                                                                 | 10   |
| 2.2.2.2 Cvetno steblo                                                                        | 11   |
| 2.2.2.3 Nadzemni deli                                                                        | 11   |
| 2.2.2.4 Korenine                                                                             | 12   |
| 2.3 ROD <i>PHALAENOPSIS</i>                                                                  | 14   |
| 2.3.1 Opis                                                                                   | 15   |
| 2.4 TEHNIKE BARVANJA RASTLIN                                                                 | 16   |
| 2.4.1 Genetska sprememba barve                                                               | 17   |
| 2.4.2 Sprememba barve s dodajanjem barvil                                                    | 18   |
| <b>3 MATERIAL IN METODE DE LA</b>                                                            | 20   |
| 3.1 MATERIAL ZA POSKUS                                                                       | 20   |
| 3.1.1 Rastlinski material                                                                    | 20   |
| 3.1.2 Sredstvo za barvanje cvetov                                                            | 21   |
| 3.1.3 Drugi uporabljeni materiali v poskusu                                                  | 21   |
| 3.2 METODE DE LA                                                                             | 21   |
| 3.2.1 Primerjava komercialno obarvane orhideje z našo metodo barvanja                        | 22   |
| 3.2.2 Testiranje časa barvanja in koncentracije dveh barvil s posameznimi odrezanimi cvetovi | 23   |
| 3.2.3 Poskus priporočene 2 % koncentracije sistemskega barvila z injekcijo                   |      |

|              |                                                                                               |    |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|              | <b>in infuzijo</b>                                                                            | 23 |
| <b>3.2.4</b> | <b>Poskus različnih koncentracij systemskega barvila pri injiciranju v steblo</b>             | 24 |
| <b>3.2.5</b> | <b>Poskus barvanja cvetov z injiciranjem modrega črnila v cvetno steblo</b>                   | 25 |
| <b>3.2.6</b> | <b>Poskus dolgoživosti obarvanih in neobarvanih stebel</b>                                    | 25 |
| <b>3.2.7</b> | <b>Grafični prikaz podatkov</b>                                                               | 25 |
| <b>4</b>     | <b>REZULTATI</b>                                                                              | 26 |
| <b>4.1</b>   | <b>PROUČEVANJE KOMERCIALNO OBARVANE ORHIDEJE</b>                                              | 26 |
| <b>4.1.1</b> | <b>Prečni prerez cvetnega stebela</b>                                                         | 26 |
| <b>4.1.2</b> | <b>Obarvanost venčnih listov</b>                                                              | 27 |
| <b>4.2</b>   | <b>METODE INJICIRANJA IN OBARVANOST CVETOV</b>                                                | 28 |
| <b>4.2.1</b> | <b>Testiranje časa barvanja in koncentracije dveh barvil s odrezanimi posameznimi cvetovi</b> | 28 |
| <b>4.2.2</b> | <b>Poskus priporočene 2% koncentracije barvila injiciraneg z injekcijo in infuzijo</b>        | 30 |
| <b>4.2.3</b> | <b>Obarvanost cvetov barvanih z različnimi koncentracijami barvila</b>                        | 32 |
| <b>4.2.4</b> | <b>Potreben čas do maksimalnega obarvanja cvetov</b>                                          | 33 |
| <b>4.2.5</b> | <b>Poskus barvanja cvetov z injiciranjem modrega črnila v cvetno steblo</b>                   | 34 |
| <b>4.2.6</b> | <b>Poskus dolgoživosti obarvanih in neobarvanih stebel</b>                                    | 34 |
| <b>5</b>     | <b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>                                                                     | 36 |
| <b>5.1</b>   | <b>RAZPRAVA</b>                                                                               | 36 |
| <b>5.2</b>   | <b>SKLEPI</b>                                                                                 | 39 |
| <b>6</b>     | <b>POVZETEK</b>                                                                               | 41 |
| <b>7</b>     | <b>VIRI</b>                                                                                   | 43 |
|              | <b>ZAHVALA</b>                                                                                |    |

## KAZALO PREGLEDNIC

|                                                                                           | Str. |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Preglednica 1: Osnovne razlike med enokaličnicami in dvokaličnicami (Batič in sod., 2004) | 4    |



## KAZALO SLIK

|                                                                                                                                                                                             | Str. |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Slika 1: Buliformne celice v povrhnjici lista enokaličnice (Dermastia, 2007)                                                                                                                | 5    |
| Slika 2: Listne reže v povrhnjici lista dvokaličnice (A); listne reže v povrhnjici lista enokaličnice (B) (Dermastia, 2007)                                                                 | 5    |
| Slika 3: Razporeditev žil po principu rhaps (Dermastia, 2007)                                                                                                                               | 6    |
| Slika 4: Prečni prerez stebela: steblo dvokaličnic z evstelo (A); steblo enokaličnic z ataktostelo (B) (Dermastia, 2007)                                                                    | 6    |
| Slika 5: Sestavni deli cveta <i>Phalaenopsis</i> : cel cvet (A), sepale - čašni listi (B), petali - venčni listi (C), medena ustna in stebriček - ginostemij (D) (foto: Zanelli, 2013)      | 10   |
| Slika 6: Oblika rasti orhidej: A in B – monopodialna, C – simpodialna (Trenc-Frelih, 1990)                                                                                                  | 12   |
| Slika 7: Koreninski gomolj pri talnih orhidejah (Squire, 2008)                                                                                                                              | 13   |
| Slika 8: Zračne korenine pri epifitskih orhidejah (DLOS ..., 2005)                                                                                                                          | 13   |
| Slika 9: Večplastna povrhnjica (velamen) zračne korenine epifitske orhideje (Dermastia, 2007)                                                                                               | 13   |
| Slika 10: Cvetovi orhideje rodu <i>Phalaenopsis</i> (foto: Zanelli, 2012)                                                                                                                   | 15   |
| Slika 11: Prvi indigo <i>Phalaenopsis violacea</i> 'Gulfstream Blue' (A); <i>Phalaenopsis violacea</i> 'Blue Blood' (B); <i>Phalaenopsis violacea</i> 'Blue Chip' (C) (Orchidview..., 2011) | 18   |
| Slika 12: Sorta 'Anthura Bern' (White ..., 2010)                                                                                                                                            | 20   |
| Slika 13: Sorta 'Anthura Cambridge' (White ..., 2010)                                                                                                                                       | 21   |
| Slika 14: Luknja na modri orhideji (VG Colours, Nizozemska), narejena s posebno tehnologijo (foto: Zanelli, 2013)                                                                           | 22   |
| Slika 15: Vzdolžni prerez stebela v predelu luknje pri modri orhideji <i>Phalaenopsis</i> (VG Colours, Nizozemska), ki je dostopna na tržišču (foto: Ocean Orchids d.o.o., 2013)            | 22   |
| Slika 16: Injiciranje barvila z injekcijo (foto: Zanelli, 2013)                                                                                                                             | 24   |
| Slika 17: Dovajanje barvila z infuzijo (foto: Zanelli, 2013)                                                                                                                                | 24   |
| Slika 18: Prečni prerez stebela dlje od poškodbe komercialno obarvane orhideje <i>Phalaenopsis</i>                                                                                          | 26   |
| Slika 19: Prečni prerez stebela bližje poškodbi komercialno obarvane orhideje <i>Phalaenopsis</i>                                                                                           | 26   |
| Slika 20: Obarvan venčni list                                                                                                                                                               | 27   |
| Slika 21: Obarvana površina venčnega lista ter vršnega dela žil                                                                                                                             | 27   |
| Slika 22: Mikroskopski prikaz žil v obarvanem venčnem listu                                                                                                                                 | 27   |
| Slika 23: Prečni prerez žile venčnega lista                                                                                                                                                 | 27   |
| Slika 24: Prečni prerez obarvanega venčnega lista                                                                                                                                           | 28   |
| Slika 25: Epiderm venčnega lista: spodnji del (A) in zgornji del (B)                                                                                                                        | 28   |
| Slika 26: Obarvanost odrezanih cvetov: z modrim črnilom (A) in razredčitev z destilirano vodo (1:1) (B) (foto: Zanelli, 2013)                                                               | 29   |

|           |                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Slika 27: | Obarvanost odrezanih cvetov z različno koncentracijo sistemskega barvila: kontrola destilirana voda (A); barvilo po navodilih proizvajalca (B); razredčitev 1:1 (C); razredčitev 1:3 (D); razredčitev 1:5 (E) (foto: Zanelli, 2013) | 29 |
| Slika 28: | Modro obarvani cvetovi sorte 'Anthura Bern' po metodi injiciranja barvila z injekcijo (foto: Zanelli, 2013)                                                                                                                         | 30 |
| Slika 29: | Modro obarvani cvetovi sorte 'Anthura Cambridge' po metodi z infuzijo (foto: Zanelli, 2013)                                                                                                                                         | 31 |
| Slika 30: | Obarvan mladi list orhideje <i>Phalaenopsis</i> (foto: Zanelli, 2013)                                                                                                                                                               | 31 |
| Slika 31: | Prenos barvila do mladega cvetnega stebela orhideje <i>Phalaenopsis</i> (foto: Zanelli, 2013)                                                                                                                                       | 31 |
| Slika 32: | Obarvani cvetovi sorte 'Anthura Bern' z 1 % koncentracijo barvila (foto: Zanelli, 2013)                                                                                                                                             | 32 |
| Slika 33: | Obarvanost popkov in vršička (A) ter celotnih cvetov (B) sorte 'Anthura Cambridge' pri močnejši 3,4 % koncentraciji barvila (foto: Zanelli, 2013)                                                                                   | 33 |
| Slika 34: | Povprečen čas maksimalne obarvanosti cvetov orhidej s različnimi koncentracijami sistemskega barvila                                                                                                                                | 33 |
| Slika 35: | Minimalna obarvanost cveta z injiciranjem modrega črnila (foto: Zanelli, 2013)                                                                                                                                                      | 34 |
| Slika 36: | Propad cvetov zaradi barvila in poškodbe (foto: Zanelli, 2013)                                                                                                                                                                      | 34 |
| Slika 37: | Povprečen čas cvetenja obarvanih cvetov glede na kontrolo                                                                                                                                                                           | 35 |
| Slika 38: | Ponovno cvetenje obarvane orhideje iz rodu <i>Phalaenopsis</i> (foto: Zanelli, 2014)                                                                                                                                                | 39 |

## 1 UVOD

Orhideje tvorijo eno najbolj obsežnih družin cvetočih rastlin na Zemlji. Družina kukavičevk (Orchidaceae) obsega okoli 750 rodov in 25 000 vrst in podvrst. Postavlja se na prvo mesto po številčnosti oziroma raznolikosti vrst. Prilagodile so se vsem klimatskim razmeram, razen skrajnim polarnim in puščavskim predelom (Jevšnik, 2006). Ker so najštevilnejše v tropskih predelih Južne Amerike in jugovzhodne Azije, menijo da se je njihov nastanek in razvoj pričel tam. V Evropi raste okoli 300 vrst. V Sloveniji je bilo do sedaj najdenih 76 vrst in podvrst, ki jih uvrščamo v 27 rodov (Ravnik, 2002).

Tropske orhideje so zanimive ljubiteljem rastlin, ker imajo atraktivne, razkošne in lepe cvetove različnih oblik, ki so podobni roju metuljev ali živobarvnim pajkom. Najlažje je gojiti tiste orhideje, ki celo rastno sezono preživijo na sobni temperaturi in nimajo potrebe po mirovanju. Orhideje iz roda *Phalaenopsis* so najbolj enostavne za gojenje, ker jim prija toplota in normalni sobni zrak ter cvetijo po nekoliko tednov (Orhideje ..., 2014). Zaradi teh lastnosti je *Phalaenopsis* najbolj prodajana in priljubljena lončnica (Trenc-Frelj, 1990).

Rod *Phalaenopsis* vsebuje okoli 70 vrst. Rastline tega rodu so epifiti ali litofiti in se s koreninami oprijemajo vej, debel ter z mahom poraščenih skal. Pojavljajo se na mestih, kjer ni direktnega sonca (Jevšnik, 2006).

Že od davnega so bile orhideje zaradi eksotičnega videza predmet legend. Omenjali so jih kot cvetje, ki ima čarobno moč, je strupeno ali pa so jih opredelili kot mesojede rastline (Purchai, 2004). Do konca prve polovice 20. stoletja so bile orhideje statusni simbol elite, saj je bilo gojenje zelo zahtevno, sadike pa cenjene in drage. Ko so v drugi polovici 20. stoletja razvili metode razmnoževanja, so postale dostopnejše tudi srednjemu sloju prebivalstva (Jevšnik, 2006).

Najpogostejše gojene sorte orhidej so medvrstni križanci tudi do sedmih različnih vrst. Njihova barvna lestvica sega od bele do rumene, rumeno rjave in rožnate do rdeče ter vijolične barve. V zadnjih letih so križanci podedovali tudi vonj (Trenc-Frelj, 1990).

Čeprav imamo na izbiro veliko hibridov, težimo k spremembam in raznolikosti. Pri modernih križancih je novi trend pridobivanje orhidej z modrimi cvetovi. Do zdaj so bili žlahtniteljski poskusi v tej smeri neuspešni, ker je modri pigment neobstoje in se izrazi kot vijolični odtенок. Lažji način je injiciranje modre barve v rastlino. To metodo so razvili, da bi hitreje prišli do zelenega cilja modrih cvetov in ker modro obarvane rastline dosegajo večjo ceno na trgu, so natančni podatki o postopku obarvanja neznani. Ta metoda je najbolj primerna za rod *Phalaenopsis*, ki je znan po dolgo obstojnih cvetovih.

### 1.1 VZROK ZA RAZISKAVO

Orhideje cenimo zaradi nenavadnih, eksotičnih cvetov. Med približno 25 000 botaničnimi oziroma naravnimi vrstami obstaja tudi veliko modernih križancev, ki so plod vnaprej načrtanega žlahtniteljskega cilja.

Modra barva cvetov je v naravi zelo redka. Najdemo jo pri vrstah *Delphinium* sp. (*D.* 'Loch Leven'), *Iris* sp. (*I.* 'Joyce'), *Meconopsis grandis*, *Myosotis sylvatica* 'Blue Ball', *Aquilegia alpina*, *Linum perenne*, *Gentiana* sp. (Upward, 2008). Pri različnih vrstah orhidej ima najbolj 'modre' cvetove vandina skupina orhidej. Ker veljajo rastline rodu *Phalaenopsis* za ene najbolj prodajanih lončnic, so vrtnarske hiše razvile postopek obarvanja cvetnih stebel na rastlini. Zanimalo nas je, ali lahko z enostavnimi metodami injiciranja modrih barvil v cvetno steblo dosežemo podoben učinek. Postopek namreč ni patentiran in zato se je pojavil interes proizvodnje modrih orhidej tudi pri nas. V sklopu magistrske naloge smo tako želeli ugotoviti, kakšne so možnosti za obarvanje vlončenih orhidej rodu *Phalaenopsis*.

## 1.2 NAMEN RAZISKAVE

Namen raziskave je bil ugotoviti, kako uspešno in s čim manj škode pridobiti modre cvetove orhidej iz rodu *Phalaenopsis* s tehniko injiciranja barvila v cvetno steblo. Zanimalo nas je, kaj vpliva na dolgoživost obarvanih cvetov – poškodba na cvetnem stebelu ali injicirano barvilo. Želeli smo tudi pojasniti mehanizme, ki vplivajo na uspešen prenos barvila po cvetnem stebelu do posameznega cveta.

## 1.3 DELOVNA HIPOTEZA

Z različnimi barvili lahko uspešno obarvamo cvetove orhidej iz rodu *Phalaenopsis*. Zastavili smo si naslednje delovne hipoteze:

- sestava in tip barvila vplivata na intenzivnost modrega obarvanja;
- tehnika dodajanja barve v cvetno steblo je občutljiv postopek, ki poškoduje rastlino;
- različne koncentracije barvila vplivajo na intenziteto barve v cvetovih, ki je v rastlini prisotna do odpadanja cvetov;
- intenzivnost obarvanja in dolgoživost cvetov sta odvisni od sorte *Phalaenopsis*;
- za barvanje je pomembno v kateri fazi je cvet. Popki so zelo občutljivi, ko se obarvajo, se hitro posušijo in odpadejo;
- modro črnilo ni primerno za barvanje cvetov;
- primerno barvilo za obarvanje cvetov pri rodu *Phalaenopsis* je Deep Blue A43 Absorbit Stem Dye, ki se uporablja tudi za barvanje cvetov rastlin namenjenih rezi;
- postopek injiciranja rastline z modrim barvilom ne spremeni dolgoživosti cvetnega stebela in posameznih cvetov;
- različni deli cveta se različno intenzivno obarvajo;
- barvilo se ne nalaga v drugih rastlinskih organih (v listih, zračnih koreninah, cvetnem stebelu);
- barvilo ni obstojno do te mere, oziroma ga rastlina ne akumulira, da bi bili modri tudi cvetovi na cvetnih steblih, ki se razvijejo naknadno.

## 2 PREGLED OBJAV

Orhideje že stoletja predstavljajo ene najbolj eksotičnih in zanimivih okrasnih rastlin. Gojenje orhidej je zaradi njihove lepote in vpetosti v žlahtniteljske programe, v katerih ustvarijo številne nove hibride, izjemno močna cvetna industrija in hobi za tisoče ljubiteljev. Prvi zapisi o orhidejah so omenjeni že leta 600 p.n.š. Konfucij je leta 500 p.n.š. pisal o kakovosti dišav narejenih iz orhidej. Teofrast je leta 300 p.n.š. prvi zabeležil ime rodu *Orchis* po katerem nosi ime celotna družina. Gomolje nekaterih mediteranskih vrst orhidej je namreč izenačil s parom moških mod ter zaradi tega uporabil grško besedo *orchis*, ki pomeni moška moda. V 16. stoletju so v Evropo zanesli semensko glavico vrste orhideje, ki se od takrat pogosto uporablja v prehrani ali kot aroma za parfume, jedi in pijače - vanilijo (*Vanilla planifolia*) (Sheehan, 2001).

Prve tropske orhideje so leta 1732 iz Bahamov prinesli na Nizozemsko, kjer so takoj postale cenjene zaradi svoje nenavadne lepote. Skrivnost njihovega razmnoževanja pa je šele leta 1902 odkril francoski raziskovalec Noel Bernar. Ugotovil je, da semena kalijo le v simbiozi z glivami iz rodu *Rhizoctonia*. Na tej osnovi se je začelo masovno gojenje orhidej. Od leta 1950 se orhideje razmnožujejo tudi *in vitro*. V začetku 19. stoletja se je zanimanje za orhideje povečalo do te mere, da so orhideje začeli množično zbirati premožnejši sloji – orhidomanija. Lovci na orhideje so uničevali in sekali drevesa, da bi prišli do cenjenih rastlin, ki običajno najdejo življenjski prostor visoko v krošnjah. Zato je še danes veliko vrst orhidej v naravi ogroženih ali celo na robu izumrtja (Purchai, 2004). Orhideje so bile zelo cenjene in drage ter so postale statusni simbol elite (Jevšnik, 2006).

Komercialna pridelava sadik orhidej se je začela v ZDA okrog leta 1848. Pomemben in dolgo časa vodilni pridelovalec orhidej so postali havajski otoki, ki so jih pogosto imenovali 'the Orchid Isles' (otoki orhidej). Leta 1942 je bila prva pošiljka rezanih orhidej v ZDA poslana prav s Havajev (Sheehan, 2001).

V drugi polovici 20. stoletja so orhideje postale najbolj priljubljene in s tem najbolj prodajane lončnice v ZDA in v Evropi. Hitra rast popularnosti orhidej je bil vzrok za ustanavljanje številnih društev po celem svetu. Najbolj znana društva so (Jevšnik, 2006):

- AOS – American Orchid Society je največje društvo ljubiteljev orhidej na svetu, ki združuje ljubitelje, gojitelje in specializirana društva (International Phalaenopsis Alliance, Pleurothallid Alliance). Ustanovljeno je bilo leta 1921. Ima več kot 30 000 članov in je pobudnik svetovne konference o orhidejah WOC (World Orchid Conference).
- RHS – Royal Horticultural Society združuje profesionalne in amaterske vrtnarje ter ljubitelje in ima več specializiranih sekcij in publikacij. Ustanovljeno je bilo leta 1804. Mednje sodi tudi The Orchid Review, ki ga je leta 1893 ustanovil R. Rolfe in velja za najstarejšo še aktivno strokovno revijo o orhidejah.
- NSW – Orchid Society of New South Wales je avstralsko društvo, ki od leta 1936 izdaja revijo Australian Orchid Review, Australian Orchid Council pa od leta 1989 izdaja Orchids Australia.
- DLOS – Društvo ljubiteljev orhidej Slovenije je bilo ustanovljeno leta 2003, pred tem pa je že več let obstajalo kot sekcija pod okriljem Zveze hortikulturnih

organizacij Slovenije. Društvo je nehalo delovati leta 2012, prirejalo je številne izlete ter obiske sejmov, gojiteljev orhidej in botaničnih vrtov ter izdajalo glasilo Epifit (Jevšnik, 2006).

Začetki načrtne hibridizacije orhidej segajo v sredino 19. stoletja. Prvi umetni hibrid je nastal s križanjem *Calanthe furcata* in *Calanthe masuca*. Znano je tudi, da so se naravni hibridi pojavili že prej. Danes so številni hibridi rezultat križanja med dvema ali tremi vrstami, lahko tudi med več vrstami (Squire, 2008).

Mnogi gojitelji orhidej predstavljajo svoje nove križance in sodelujejo v mednarodnih ocenjevanjih, ki jih organizirajo društva. Cilj križanja so pri večini rodov doseganje velikih in ploskih cvetov ter čistih in izrazitih barv. Pomembne lastnosti kvalitetnega križanca so tudi vigor rastline in številčnost cvetov (Jevšnik, 2006). Kljub temu pa s križanjem ne moremo doseči modre obarvanosti cvetov pri rodu *Phalaenopsis*.

## 2.1 ENOKALIČNICE

Kritosemenke se delijo na dvokaličnice<sup>1</sup> in enokaličnice<sup>2</sup>. Družina Orchidaceae (kukavičevke), v katero sodi rod *Phalaenopsis*, pripada enokaličnicam. Osnovne razlike med dvo- in eno – kaličnicami so prikazane v preglednici 1.

Preglednica 1: Osnovne razlike med enokaličnicami in dvokaličnicami (Batič in sod., 2004)

| DVOKALIČNICE                                                                                       | ENOKALIČNICE                                                                              |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2 klična lista                                                                                     | 1 klični list                                                                             |
| alorizija                                                                                          | homorizija                                                                                |
| evstela                                                                                            | ataktostela                                                                               |
| žila nedovršena                                                                                    | žila dovršena                                                                             |
| sekundarna debelitev                                                                               | samo primarna debelitev                                                                   |
| listi različnih oblik, pecljati, mrežastožilni, deljeni, nožnice so redke, prilisti pogosti        | listi z nožnico, pecljati listi so redki, prilistov ni, vzporedno ali lokastožilni        |
| predlista na stranskih poganjkih v prečni legi                                                     | predlista na stranskih poganjkih adosirana                                                |
| cvetovi 4- ali 5-števni, cvetno odevalo dvojno, K <sub>5-4</sub> C <sub>5-4</sub> G <sub>5-4</sub> | cvetovi 3-števni, cvetno odevalo enojno, P <sub>3+3</sub> A <sub>3+3</sub> G <sub>3</sub> |
| izvirna oblika: drevo                                                                              | izvirna oblika: zelnata; pogosto vodne rastline, pa tudi hemikriptofiti in geofiti        |
| pelod nastaja simultano                                                                            | pelod nastaja sukcedano                                                                   |
| pelod trikolpaten                                                                                  | pelod monokolpaten                                                                        |
| endosperm nuklearen ali celularen                                                                  | endosperm nuklearen ali helobialen                                                        |

### 2.1.1 Listi

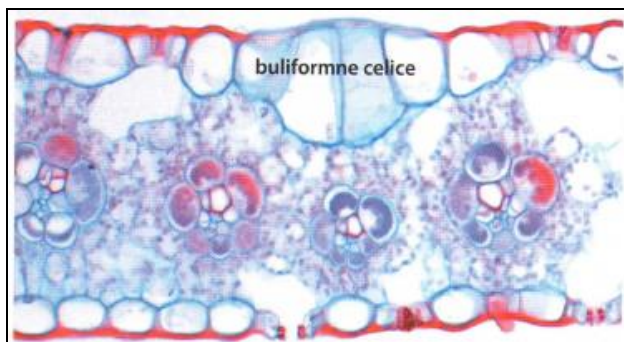
Listi enokaličnic imajo listno dno in listno ploskev, včasih imajo tudi psevdopcelj. Listno dno se vedno pritrdi na steblo s širokim delom, ki po navadi popolnoma obkroža steblo in oblikuje listno nožnico. Če se robova strukture skoraj srečata ali prekrivata, je nožnica

<sup>1</sup> Dicotyledoneae, Magnoliopsida, prva, največja skupina kritosemenk (Petauer in sod., 1998).

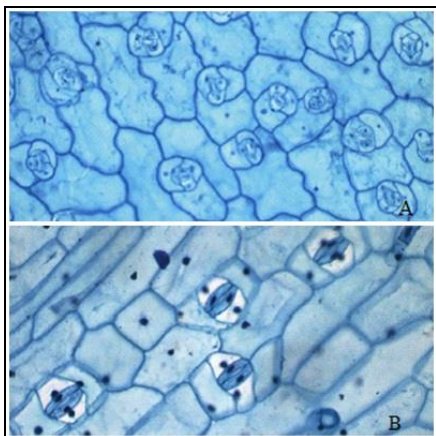
<sup>2</sup> Monocotyledoneae, Liliopsida, druga skupina kritosemenk (Petauer in sod., 1998).

odprta. Pri zaprti nožnici sta robova zlita. Listna baza ima lahko poleg nožnice številne modifikacije, kot so npr. pri travah ligula ali jeziček ter ušesce ali aurikula. Veliko enokaličnic ima dolge in trakasto oblikovane liste, ki rastejo iz interkalarnega meristema na bazi lista. Večina žil teče vzdolžno z dolgo osjo lista in vzporedno ena z drugo. Večje žile se izmenjujejo z manjšimi. Dolge vzporedne žile so med seboj povezane s finimi povezovalnimi žilami, ki potekajo pravokotno na velike žile. Velike žile so sestavljene iz ksilema in floema ter so obdane z žilnimi ovojnicami. Te imajo zelo izrazite vlaknaste podaljške, ki pomagajo pri opori lista. V bolj kserofitnih skupinah, npr. pri epifitih, kot so orhideje so trajni listi ekstremno trdi in usnjati. Mnoge žile v takih listih sploh nimajo prevodnega tkiva, ampak vsebujejo le vlakna (sklerenhimskih vlaken je več kot prevodnega tkiva). Taki vlaknati snopi so pogostejši v zunanjih delih lista, kjer sta nujni večja opora in zaščita (Dermastia, 2007).

V listnih povrhnjicah mnogih enokaličnic so pogoste tankostenske, velike in zelo vakuolizirane buliformne (balonaste) celice (slika 1), ki so urejene v skupkih. Njihova naloga naj bi bila zvijanje ali odvijanje listov po izgubi ali sprejemu vode. Reže se razvijajo v celičnih stolpcih, medtem ko je njihov razvoj pri dvokaličnicah prostorsko in časovno razpršen (slika 2) (Dermastia, 2007).



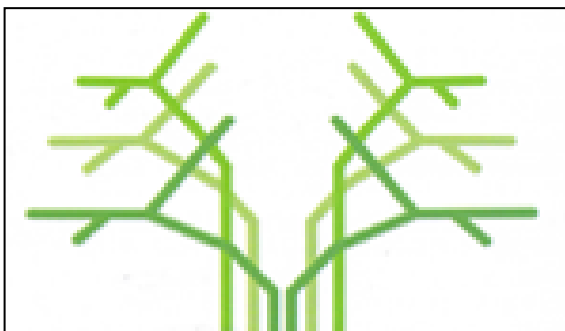
Slika 1: Buliformne celice v povrhnjici lista enokaličnice (Dermastia, 2007)



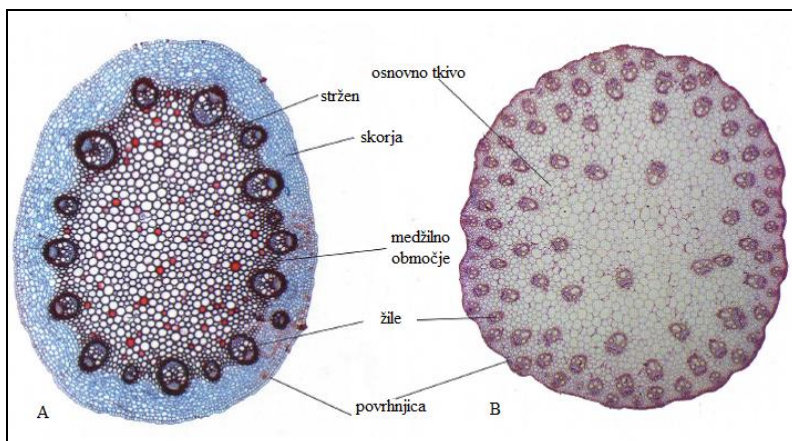
Slika 2: Listne reže v povrhnjici lista dvokaličnice (A); listne reže v povrhnjici lista enokaličnice (B) (Dermastia, 2007)

## 2.1.2 Steblo

Splošne naloge stebila so prenašanje vode in hranil do cvetov. Posebna in spremenjena stebila opravljajo tudi druge naloge kot je shranjevanje vode in hranila. V stebelu enokaličnic so žile razpršene in neorganizirane. Taka ureditev se imenuje ataktostela, kar pomeni neorganizirana stela. Gosto so razporejene po obrobju stebila in oblikujejo visoko organizirano omrežje za učinkovit transport na dolge razdalje. Razporeditev žil poznamo kot »princip rhaps« (slika 3), ker so jo najprej preučevali pri majhni palmi *Rhapis excelsa*. Pri tej rastlini posamezne žile v stebelu oblikujejo enotno raztegnjeno vijačnico. Žile so nagnjene proti središču stebila, a se v regularnih intervalih ostro obrnejo v smeri proti listu. Ob obratu se razdelijo. En krak vstopi v list, drugi pa se dviga navzgor kot osna žila. Podobno so razporejene tudi sosednje žile, a so na različnih mestih povezane z majhnimi in velikimi mostički. Prečni prerez stebila je še bolj zamegljen, ker so listne žile zelo podobne osnim žilam (slika 4). Osne žile so navadno kolateralne s primarnim ksilemom na notranji strani žile in primarnim floemom na zunanji. Če pride do preloma vodnega stolpca in embolije, enokaličnice poškodovanih elementov ne morejo nadomestiti, a lahko prelomljene in embolizirane vodne stolpce ponovno napolnijo z vodo (Dermastia, 2007).



Slika 3: Razporeditev žil po principu rhaps (Dermastia, 2007)



Slika 4: Prečni prerez stebila: steblo dvokaličnic z evstelo (A); steblo enokaličnic z ataktostelo (B) (Dermastia, 2007)



### 2.1.3 Transport barvila do cveta

Transportni sistem v rastlini sestavljata ksilem in floem, ki sta povezana v enoto, ki je bolj ali manj neprekinjena po celotni rastlini od korenin do najmlajših žil v zelenih in cvetnih listih. Ksilem je sestavljeno tkivo, ki v rastlini opravlja tri glavne naloge: prevaja vodo in raztopine na dolge razdalje iz korenin navzgor v nadzemni del rastline, daje mehansko oporo celotni rastlini in njenim delom ter shranjuje vodo in v njej raztopljene snovi. Celice, ki sestavljajo ksilem so sklerenhimske (za transport in oporo) in parenhimske (za shranjevanje). Vstop in izstop vode iz ksilema je pasiven. Floem je prav tako sestavljen iz parenhima in sklerenhima, ki v rastlini transportira organska hranila, še posebej sladkorje nastale v procesu fotosinteze, v vse nefotosintetske dele rastlin (podzemne dele, meristeme, primordije). Je živo tkivo, ki kot gonilno silo za tok hranil uporablja gradient turgorskega tlaka vzdolž prevodnega sistema. Območja aktivnega vstopa fotosintatov v floem se imenujejo vir, mesta, kjer izstopajo, pa ponor. Zaradi velikega kopičenja fotosintatov je na viru turgorski tlak velik. Na ponoru je majhen zaradi izhoda fotosintatov in izgube vode. Floemski sok je v prevodnih celicah pod velikim tlakom, zato je velika nevarnost, da se ob poškodbi floema hitro razlije. Kot zaščitni mehanizem prevodne floemske celice hitro zamašijo nastale razpoke (Dermastia, 2007).

Prevodni elementi ksilema, ki jih imenujemo trahejni elementi (traheide in členi trahej), so v svoji zreli in delujoči stopnji mrtvi, zato gibanje vode po njih nadzoruje le abiotski gradient vodnega potenciala na neprekinjeni poti tla - rastlina - zrak. Vodni potencial je zmožnost vode, da opravi delo. Omogoča, da se voda premika iz območja, kjer je vodni potencial bolj pozitiven (kjer se molekule vode bolj prosto gibljejo; voda je bolj koncentrirana), do območja, kjer je bolj negativen (kjer je gibanje vodnih molekul omejeno; voda je manj koncentrirana). Voda je adhezivna, kar pomeni, da se nanjo vežejo številne druge molekule. Je tudi kohezivna in njene molekule so med sabo zelo tesno povezane z vodikovimi vezmi (Dermastia, 2007).

Kavitacija je proces, ki prekine prevajanje vode in zmanjša učinkovitost prevajanja vode oziroma prelom vodnega stolpca. Posledica tega je nastanek embolij – zračnih mehurčkov. Embolije nastanejo tudi v prevodnih elementih, ki so fizično poškodovani in zato se voda po rastlini ne more gibati. Dvokaličnice lahko nadomestijo poškodovane prevodne elemente ali razvijejo nove trahejne elemente. Enokaličnice tega procesa ne zmorejo ampak embolizirane vodne stolpce ponovno zapolnijo z vodo (Dermastia, 2007).

Rastlinske celice na različne načine sprejemajo in oddajajo molekule, ki so nujne za njihovo rast in razvoj. Te molekule so voda in različni topljenci, ki so v vodi raztopljeni. Znaten del prenosa topljencev je povezan z membranskim transportom, ki je lahko enostavna difuzija skozi membrano ali pa ga omogočajo posebni membranski prenašalni proteini. Voda in topljenci se spontano premikajo skozi membrano z območja, kjer je večja koncentracija topljencev ali vode, na območje, kjer je koncentracija majhna. V določenih primerih poteka vodni transport skozi membrane po vodnih kanalčkih - akvaporinih<sup>3</sup> (Dermastia, 2007).

---

<sup>3</sup> Transmembranski proteini; so v plazmalemi in v membrani vakuole.

Preko transportnega sistema, natančneje z membranskim transportom, se vodna raztopina barvila prenaša do končnih celic venčnih listov orhidej *Phalaenopsis* in se kopiči v vakuoli - največjem celičnem organelu.

Rastlinsko celico sestavljajo celična stena, citoplazma in celični organeli (jedro, celične membrane, plastidi, mitohondriji, endoplazmatski retikulum, golgijev aparat, ribosomi, citoskelet, citosomi, vakuola). Vakuola je zgrajena iz vakuolne membrane ali tonoplasta, ki omejuje notranji vakuolni ali celični sok. Naloge vakuole so povečanje celic, preprečevanje velikih sprememb prostornine citosola v času vodnega stresa in skladiščenje vode in topljencev. Povečanje rastlinske celice je posledica kombinacije privzema vode v vakuolo in celične raztegljivosti. Z vstopom vode v vakuolo se poveča turgorski tlak, ki omogoča aktivni transport topljencev v vakuolo. Prehajanje vode skozi tonoplast nadzorujejo tonoplastni akvaporini, ki vplivajo na hiter transport vode v vakuolo in iz nje. Vakuola tako predstavlja pomemben založni organel. V njej se skladiščijo ioni, sladkorji, aminokisline, organske kisline, polisaharidi, pigmenti, proteini in toksične spojine. pH vakuole je med 5,0 in 5,5, lahko je tudi bolj kisel ali bazičen. V vakuolah cvetov in plodov se pogosto nalagajo flavonoidni pigmenti antociani, ki privabljajo opraševalce in raznašalce semen, delujejo protimikrobno in dajejo delom rastline značilno barvo (Dermastia, 2007).

## 2.2 DRUŽINA ORCHIDACEAE - KUKAVIČEVKE

Orhideje pripadajo družini kukavičevk (Orchidaceae). Večina orhidej je epifitov, kar pomeni, da rastejo na deblih in vejah dreves (Ravnik, 2002). Vendar pa niso paraziti, ker od svojih gostiteljskih rastlin ne sprejemajo nobenih hranil (Trenc-Frelj, 1990). Za življenje jim zadošča zračna vlaga in padavine. Zračne korenine imajo posebno tkivo na površini, ki sprejema deževnico in jo prevaja v notranjost korenine. Nekatere vrste shranjujejo vodo v mesnatih listih ali pa v stebelnih gomoljih (Ravnik, 2002). Druge so geofiti - rastejo v tleh in litofiti - rastejo na skalah. Litofiti (nekater vrste iz rodov *Bulbophyllum*, *Ansellia*, *Laelia* in druge) živijo v najbolj skromnih razmerah in so zato pogosti le v zelo vlažnem okolju. Tropski geofiti nimajo veliko predstavnikov (*Wulfschlaegelia*, *Calanthe*, *Ludisia*, *Macodes*) in rastejo na vlažnih in senčnih gozdnih tleh. Večina jih raste v zmernem pasu, v gozdovih in travnikih ter vse redkejših mokriščih. Najbolj znani so čeveljčki iz rodu *Cypripedium* v zmernem pasu in rodova *Phragmipedium* (Amerika) ter *Paphiopedilum* (Azija) v tropskem pasu (Jevšnik, 2006). Vse vrste orhidej, ki rastejo v Sloveniji spadajo med geofite (Ravnik, 2002).

Splošne značilnosti družine kukavičevk je težko definirati zaradi izjemne raznolikosti vrst. Vsako leto registrirajo okoli 100 doslej neznanih vrst. Približno 25 000 vrst, združenih v 750 rodovih, predstavlja slabo desetino flore na zemlji. Ker so kukavičevke kozmopolitska družina, ki se je prilagodila na življenje v izjemno različnih ekosistemih, je posploševanje nemogoče (Jevšnik, 2006).

Skupne značilnosti so zato omejene le na osnovne botanične lastnosti (Jevšnik, 2006):

- Za vse vrste je značilna tvorba plodov (semenskih glavic), ki vsebujejo zelo veliko število izredno majhnih semen brez rezervnih snovi.

- Kalitev semen je mogoča le v simbiozi z glivo. Ko seme vzkali, se spremeni v protokorm iz katerega požene rizoid in en klični list (enokaličnice).
- Cvet je enosomeren in sestavljen iz šestih cvetnih listov, ki so razvrščeni v dveh vretenjih: zunanjšega vretenca, ki nosi tri sepale<sup>4</sup> in notranjšega vretenca, ki nosi tri petale<sup>5</sup> od katerih največjemu srednjemu listu pravimo medena ustna ali labelum in je namenjen privabljanju opraševalcev.
- Pelodna zrna so združena v bolj ali manj kompaktne skupke - poliniji.
- Prašniki in brazda so zrasli in tvorijo značilno strukturo - stebriček.

Orhideje razvrščamo v tri kategorije, pri katerih je glavni parameter razločevanja optimalna temperatura za rast in cvetenje (Jevšnik, 2006):

- Orhideje iz hladnejših območij v naravi rastejo v hribovitih predelih, kjer nočne temperature pozimi redno padejo pod 10 °C. Povprečna letna temperatura andskih tropskih pragozdov na višini 2 500 metrov je okoli 13 °C. Te orhideje so občutljive na nihanje temperatur med dnevom in nočjo. Priporočljivo je, da jim čez vse leto zagotovimo minimalno 4 °C razlike med temnim in svetlim delom dneva. Kadar so temperature nizke, jih je potrebno zalivati redkeje. Ne prenesajo pa dveh ekstremov: nizkih temperatur in vlažnega substrata ter visokih temperatur in suše. Rodovi, ki pripadajo tej skupini so: *Cymbidium*, *Dendrobium* tip nobile, *Odontoglossum*, *Pleione*, *Coelogyne*, *Disa*, *Cypripedium* in *Bletilla*.
- K orhidejam iz toplejših območij uvrščamo vrste in križance, ki izvirajo iz ekvatorialnih predelov in rastejo ob oceanih na nadmorski višini med 0 in 1 000 metrov. Za ta območja je značilno relativno majhno nihanje povprečnih mesečnih temperatur. Temperatura med toplejšim dnevom in hladnejšo nočjo niha od 5 do 15 °C. Orhideje nimajo izrazitega obdobja mirovanja, kar pomeni, da cvetijo in rastejo ne glede na letni čas, ko dosežejo zrelost in nakopičeno energijo. Minimalne temperature za te orhideje nihajo med 18 in 20 °C, najvišje dnevne temperature pa so okoli 32 °C. Večdnevna izpostavljenost pod 13 °C povzroča stres in dalj časa trajajoče mirovanje. Predstavniki te skupine so rodovi: *Phalaenopsis*, *Vanda*, *Aerides*, *Ascocentrum*, *Renanthera*, *Angraecum*, *Aerangis* in *Aeranthus*.
- Orhideje iz vmesnih območij ne prenesajo večmesečne poletne vročine. Pozimi jim ustrezajo temperature med 15 in 18 °C. V naravi rastejo v gozdovih na nadmorski višini med 1 000 in 2 000 metri. Ko temperature pozimi padejo (15/18 °C – ponoči/podnevi) rastline začnejo oblikovati generativne organe ali pa zgolj umirijo rast. V to skupino spada večina orhidej iz rodov *Cattleya*, *Laelia*, *Oncidium*, *Epidendrum*, *Encyclia*, *Paphiopedilum*, *Pleurothallis*, in *Dendrobium* tip *phalaenopsis*.

---

<sup>4</sup> Časni listi (Petauer in sod., 1998).

<sup>5</sup> Venčni listi (Petauer in sod., 1998).

### 2.2.1 Razširjenost orhidej

Največ vrst orhidej je neenakomerno porazdeljenih čez celoten tropski pas. Z orhidejami najbolj bogata območja so v srednji in južni Ameriki (med Panamo in Brazilijo) in Jugovzhodni Aziji (med Indijo in Novo Gvinejo). Samo v Kolumbiji in Ekvadorju so do sedaj opisali okoli 7 000 vrst, v celotni Jugovzhodni Aziji pa kar okoli 10 000 vrst. V afriškem tropskem delu ni veliko vrst orhidej. Poddružina Epidendroideae obsega tri četrtine vseh vrst orhidej in je v tropskih predelih najbolj zastopana. Vsebuje najbolj znane rodove kot so *Cattleya* (Srednja in Južna Amerika), *Vanda* (Azija), *Polystachia* (Afrika) in *Phalaenopsis* (Azija). Komercialno najbolj znana orhideja vanilija (*Vanilla*), vključuje le 110 vrst in je prav tako kozmopolitska. V Ameriki so monopodialne orhideje zelo redke medtem, ko so zelo zastopane v Jugovzhodni Aziji in Afriki (Jevšnik, 2006).

### 2.2.2 Morfologija orhidej

#### 2.2.2.1 Cvet

Orhideje so enodomne rastline z večinoma dvospolnimi cvetovi, le redko so enospolni (*Catasetum*, *Cycnoches*). So zigomorfni, kar pomeni da so bilateralno simetrični (simetrična prepolovitev cveta je možna le v eni osi) (Jevšnik, 2006). Cvetovi kukavičevk se ločijo od cvetov drugih cvetnic po številu prašnikov, zgradbi, pelodu in načinu opravevanja (Ravnik, 2002). Zgradba cveta je pri vseh vrstah orhidej enaka. Sestavni deli cveta so: sepale, petali, medena ustna ali labelum in stebriček ali ginostemij (slika 5) (Squire, 2008).



Slika 5: Sestavni deli cveta *Phalaenopsis*: cel cvet (A), sepale - čašni listi (B), petali - venčni listi (C), medena ustna in stebriček - ginostemij (D) (foto: Zanelli, 2013)

Sepale so zunanji trije cvetni listi, ki varujejo notranje tri cvetne liste (petale) in spolne organe cveta. Pri večini rastlin so čašni listi zeleno obarvani, pri kukavičevkah pa so obarvani podobno kot venčni listi. Pri različnih vrstah kukavičevk so trije čašni listi povsem podobni, lahko pa sta stranska čašna lista manjša ali pa se od sredinskega ločita po barvi in strukturi. Pri nekaterih rodovih (*Paphiopedilum*, *Restrepia*) sta stranska čašna lista

med seboj bolj ali manj zraščena. V vseh primerih so čašni listi kukavičevk debelejši in robustnejši od nežnih venčnih listov (Jevšnik, 2006).

Notranje tri cvetne liste imenujemo petale. Spodnji venčni list je pri vseh orhidejah drugačen od stranskih dveh, ki sta preprosta in simetrična (Jevšnik, 2006).

Medena ustna (*labellum*) je preobražen srednji cvetni list notranjega vretenca (Petauer in sod., 1998). Je najbolj atraktiven del cveta, ki na različne načine vzbuja pozornost opraševalcev. Lahko služi kot pristajalna steza za opraševalce (*Zygopetalum*, *Miltonia*), jim nudi hrano (pri nekaterih vrstah je ustna podaljšana v ostrogo z nektarjem, npr. *Angraecum*), posnema samico žuželke (*Ophrys*), tvori začasno past (*Bulbophyllum*) ali pa tunel, skozi katerega obstaja le ena pot na prostost (*Paphiopedilum*). Njena struktura je zelo kompleksna in se med posameznimi rodovi zelo razlikuje. Labelum se vedno nahaja nasproti spolnih organov (stebrička) in skrbi za to, da opraševalec najlažje pobere skupke cvetnega prahu (poliniji) (Jevšnik, 2006). Poliniji se prilepijo na žuželko, ki ga odnese na drugi cvet kjer se prilepi na brazdo in pride do oprašitve. Nekatere kukavičevke so avtogamne (oprašujejo se same) (Ravnik, 2002).

Stebriček ali ginostemij je struktura, ki leži v središču cveta in združuje ženske in moške reproduktivne organe ter meji na podraslo tridelno plodnico. Plodnica je zelo neizrazita in do oprašitve opravlja zgolj funkcijo cvetnega peclja. Pri orhidejah so spolni organi nekoliko modificirani, zato jih je pogosto zelo težko določiti in prešteti. Z redkimi izjemami imajo kukavičevke le en aktiven in dva sterilna, neizrazita prašnika. Oblika stebrička in število posameznih organov, ki jih združuje, so najpomembnejši kriteriji pri klasifikaciji orhidej. Stebriček kukavičevk je edinstven primer natančnosti in predstavlja unikatno strukturo rastlinskega kraljestva. Predvideva se, da je dejanska oprašitev in tvorba plodu (semenske glavice) redkost zaradi pomanjkanja opraševalcev in majhnega odstotka uspešnih oprašitev (Jevšnik, 2006).

#### 2.2.2.2 Cvetno steblo

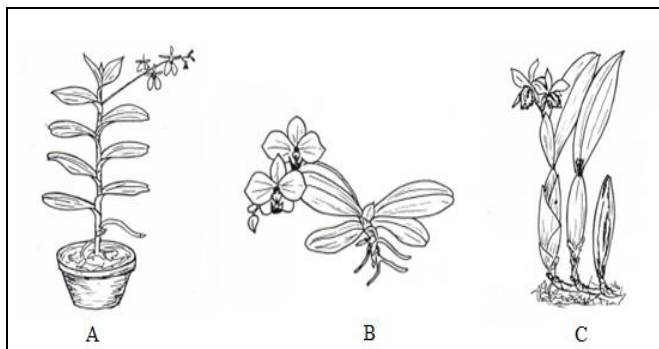
Cvetno steblo je poganjek, ki nosi socvetje ali posamične cvetove. Požene lahko iz vrha vegetativnega poganjka (*Cattleya*, *Paphiopedilum*), po njegovi dolžini (*Dendrobium nobile*, *Eria biflora*), ali pa iz njegove osnove (*Masdevallia*, *Cymbidium*) (Jevšnik, 2006). Cvetno steblo je lahko povešeno ali pokončno (Squire, 2008).

Socvetje je pri orhidejah kobulasto (klas, grozd, sestavljen klas, sestavljen grozd, kobul, češulja) s posameznimi izjemami (pakobul – *Lockhartia*) (Jevšnik, 2006).

#### 2.2.2.3 Nadzemni deli

Orhideje rastejo na dva osnovna načina – habitusa, po katerih družino razdelimo na dve skupini (slika 6). Simpodialne orhideje (stransko rastoče) se razraščajo tako, da nove poganjke poženejo iz osnove prejšnjih dozorelih poganjkov (Squire, 2008). Zadebeljene stebelne poganjke imenujemo pseudobulbusi, ki so lahko okrogli ali podolgovati, ter nosijo enega ali več listov različnih oblik in velikosti. Primeri simpodijalnih orhidej so *Cymbidium*, *Paphiopedilum*, *Miltonia*, *Epidendrum* (Jevšnik, 2006). Druga skupina so

monopodialne orhideje (navzgor rastoče), ki rastejo pokončno – vršiček raste le v eni osi. Listi se razraščajo iz obeh strani stebila (Squire, 2008). Rast je nedeterminirana, pri čemer spodnji listi, korenine in steblo postopno odmirajo. Na vrhnjem delu rastline nastajajo vedno nove korenine, ki se oprijemajo skorje gostiteljskega drevesa. Najbolj znani primeri monopodijalnih orhidej so rodovi *Phalaenopsis*, ki ima zelo kratko monopodialno steblo z mesnatimi listi, *Vanda* in *Vanilla* (vanilija), katere monopodialno steblo se lianasto razpreda na poti v krošnje in lahko preseže 30 metrov v višino (Jevšnik, 2006).



Slika 6: Oblika rasti orhidej: A in B – monopodialna, C – simpodialna (Trenc-Frelj, 1990)

Listi imajo vzporedno razporejene žile (izjemi sta rodova *Anoectochilus* in *Goodyera*). So nepecljati, nedeljeni in celorobi. Lahko so dlakasti, gladki, enoletni ali večletni. Po dolžini sredinske žile se list deli na dve bolj ali manj somerni listni ploskvi, ki sta lahko zraščeni, kar tvori mesnate liste cevastega prereza (*Vanda teres*), trikotnega prereza (*Tolumnia*) ali sploščenega prereza (nekaterne vrste iz rodu *Dendrobium* in *Angraecum*). Listi večine epifitskih orhidej imajo debelo, ali pa povečano povrhnjico, ki preprečuje izhlapevanje vode. Vrste iz območij vsakodnevne dežja in celodnevne visoke zračne vlažnosti imajo nežnejše liste (*Miltonia*, *Odontoglossum*) (Jevšnik, 2006).

#### 2.2.2.4 Korenine

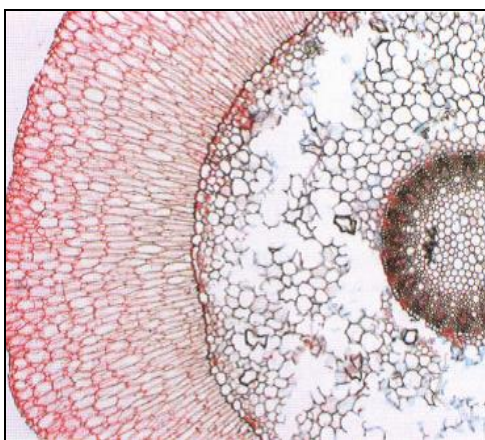
Talne orhideje imajo dolge, tanke in razvejane korenine poraščene z dlačicami – rizoidi, ki sodelujejo pri črpanju hranil in vlage iz zemlje. Imajo razvite koreninske gomolje (slika 7) in korenike, ki skladiščijo hrano in omogočijo preživetje v hladnejšem in/ali sušnem obdobju. Epifitske vrste so razvile zračne korenine kot posebno prilagoditev na prirasel način življenja (slika 8). Prevodni del korenin, razen vršička, obdaja gobast sloj odmrlih celic sivo srebrne barve – velamen (slika 9), ki preprečuje izhlapevanje tako, da vpije vlago in jo dlje časa zadrži v okolici aktivnega prevodnega tkiva. Rastlina absorbira zračno vlago in hranila preko vršičkov. Zdrave in aktivne korenine imajo zelen, ali zelenordeč vršiček, ki hitro raste. Korenine se razraščajo v vse smeri ter tako rastlino zasidrajo v podlago. Opravljajo tudi izmenjavo plinov, zaradi česar epifitski rodovi (*Phalaenopsis*, *Oncidium*) ne prenesajo zastajanja vode v okolici korenin, ker začno zaradi pomanjkanja kisika gniti. Zato je srk vode z barvili preko korenin pri teh rastlinah praktično nemogoč. Korenine so pri nekaterih orhidejah sposobne fotosintezirati (*Phalaenopsis*, *Microcoelia*, *Kingidium*). Ta sposobnost je omogočila evolucijo brezlistnih orhidej, ki se vsaj za delček leta ali več zanesejo le na snovi, ki jih proizvedejo in skladiščijo korenine (*Polyrrhiza*, *Dendrophylax*) (Jevšnik, 2006).



Slika 7: Koreninski gomolj pri talnih orhidejah (Squire, 2008)



Slika 8: Zračne korenine pri epifitskih orhidejah (DLOS ..., 2005)



Slika 9: Večplastna povrhnjica (velamen) zračne korenine epifitske orhideje (Dermastia, 2007)

## 2.3 ROD *PHALAENOPSIS*

Klasifikacija vrst in rodov kukavičevk je stalen proces, ki poteka na osnovi ugotavljanja novih morfoloških, anatomskih in genetskih parametrov. Lahko jih ločimo tudi po načinu rasti na epifite, geofite ali litofite. Resnejše klasifikacije so pojavile v zadnjih 150 letih, saj so pred tem opisovali le njihove čudovite cvetove in medicinsko delovanje. Pomembni začetniki klasifikacije orhidej so evropski naravoslovci Linnaeus, Olof Swartz, L.C. Richard in John Lindley. Linnaeus je prepoznal osem rodov (*Orchis*, *Satyrium*, *Ophrys*, *Serapias*, *Limodorum*, *Cypripedium* in *Epidendrum*). Swartz je bil prvi, ki je objavil klasifikacijo na osnovi morfologije in s ključem za določanje 25 rodov. Richard je leta 1817 določil strukturo polinija in ginostemija. Leta 1825 je Lindley oblikoval prvi glavni sistem klasifikacije družine kukavičevk (Orchidaceae). V svojih raziskavah je omenil tri družine – Burmanniaceae, Orchidaceae in Apostasiaceae (Pridgeon in sod., 1999). Novejša klasifikacija, ki je narejena tudi na podlagi molekulskih markerjev deli družino Orchidaceae na pet poddružin – Apostasioideae, Cypripedioideae, Vanilloideae, Orchidoideae in Epidendroideae (Sheehan, 2001).

DEBLO: *Spermatophyta* – semenke

PODDEBLO: *Magnoliophytina* (*Angiospermae*) - kritosemenke

RAZRED: *Liliopsida* (*Monocotyledoneae*) - enokaličnice

PODRAZRED: *Liliidae*

NADRED: *Orchidanae*

RED: *Orchidales* - kukavičevci

DRUŽINA: Orchidaceae - kukavičevke

PODDRUŽINA: Orchidoideae

PLEME: *Vandae*

PODPLEME: *Sarchantinae*

ROD: *Phalaenopsis* (Sheehan, 2001).

Rod *Phalaenopsis* je prvi opisal Carl Blume leta 1825. Ime je nastalo iz grščine - *phalaina* = molj, metulj; *opsis* = izgled, ker je izgled cveta podoben metulju. Rod vsebuje okoli 70 vrst, ki izvirajo iz območja med Indijo in severno Avstralijo. Največja gostota vrst je na širšem območju Filipinskega otočja. Vrste so razmeščene v devet skupin glede na botanične podrobnosti v strukturi cvetov. Velikocvetni križanci iz tega rodu so večinoma potomci sedmih različnih vrst. To so *P. aphrodite*, *P. schilleriana*, *P. amabilis*, *P. sanderiana*, *P. stuartiana*, *P. equestris* in *P. philippinensis*. Novejše oblike in barve pa vsebujejo še vrste z manjšimi ampak bolj pisanimi cvetovi kot so *P. violacea*, *P. cornucervi* in druge.

V prvi polovici 20. stoletja so bili najbolj priljubljeni roza in beli cvetovi. Royal Exotic Nursery, London, je registriral prvi *Phalaenopsis* hibrid leta 1886, ki je bil križanec med *P. aphrodite* in *P. rosea* ter so ga imenovali *Phalaenopsis* x *intermedia*. V naslednjih 50 letih so največ žlahtnili hibride z belimi cvetovi ali bele z obarvanimi medenimi ustnami ter cvetove s različnimi odtenki roza barve. V tem času so žlahtnitelji stremeli za večjimi, bolj zaobljenimi in sploščenimi cvetovi, lepo razporejenimi na cvetnem stebelu. V drugi polovici 20. stoletja pa je prišlo do večjih žlahtniteljskih sprememb, saj je leta 1957 Lewis Vaughn



registriral prvi rumeno cvetoči hibrid – *P.* 'Golden Louis'. Začeli so nastajati različno obarvani hibridi (slika 10) (Sheehan, 2001).



Slika 10: Cvetovi orhideje rodu *Phalaenopsis* (foto: Zanelli, 2012)

Zadnjih nekaj let so prisotni tudi manjši križanci rumene, oranžne in živo rdeče barve, kjer površina celotnega cveta ni v eni ravnini. Moderni križanci, ki vključujejo vrste *P. violacea*, *P. bellina* in *P. luddemanniana*, so podedovali tudi vonj. V Ameriki se že dolgo časa pojavlja trend miniaturnih križancev, ki so potomci *P. equestris*, *P. lindenii* in podobnih. Te rastline imajo nizek habitus z največ 15 cm dolgimi listi. Cvetovi so veliki od 1 do 4 cm na samo 10 do 20 cm dolgem cvetnem stebelu. Iz Tajvana, kjer so se po letu 1985 začeli intenzivno ukvarjati s križanjem in razmnoževanjem orhidej *Phalaenopsis*, prihajajo številni atraktivni križanci čisto novih oblik in barv. Mednje zagotovo sodita *Phalaenopsis* z rdečimi cvetovi in skupina harlekin križancev, ki so posledica mutacije in imajo značilne pegaste/lisaste cvetove (Jevšnik, 2006).

### 2.3.1 Opis

Orhideje iz rodu *Phalaenopsis* so epifiti ali litofiti in se s koreninami oprijemajo vej, debel ter z mahom poraščenih skal. Pojavljajo se na mestih, kjer ni direktnega sonca. Korenine v naravi prosto visijo v zraku oziroma se oprijemajo podlage kar pomeni da ne prenesejo daljše izpostavljenosti vodi v podstavku. Vlažne korenine so sposobne fotosinteze. Zato se za sajenje uporabljajo prozorni lončki. Primeren substrat je z velikimi koščki lubja (10 do 15 mm) in šotnim mahom v razmerju 3:1. Listi so mesnati, podolgovato ovalni in služijo shranjevanju snovi ter vlage. Pri nekaterih vrstah so dolgi le 10 cm, pri drugih več kot 45 cm (*P. gigantea*), pri nekaterih pa v sušnem obdobju celo odpadejo. Naravno okolje vrst, iz katerih so sestavljeni moderni križanci, je toplo okolje, s temperaturami med 16 in 35 °C in z relativno zračno vlago med 50 in 90 % (letna količina dežja je nad 2 000 mm). Enkrat letno nastopi obdobje, ko se vlažnost zmanjša, temperature pa vsako noč padejo pod 18 °C. Takrat začne rasti novo cvetno steblo, ki je lahko dolgo od 15 do 70 cm. Močne rastline lahko iz istega cvetnega stebela cvetijo večkrat. Če se cvetno steblo odreže pod prvim cvetom, ki se je odprl, lahko cvetijo brez prekinitve tudi celo leto. Če se cvetočo rastlino škropi po cvetovih, se na njih pogosto pojavijo črne pege, ki so znak glivične okužbe (*Botrytis*) (Jevšnik, 2006). Cvetovi so dolgotrajni, pogosto cvetijo tudi do tri mesece (Squire, 2008).

## 2.4 TEHNIKE BARVANJA RASTLIN

V paleti barv, ki jo najdemo pri rastlinah, je prevladujoča zelena barva. Rastlinski pigmenti zajemajo več vlog – najpomembnejši sta gotovo fotosinteza in signalizacija (obramba ali privabljanje opraševalcev). Obstajajo številni biokemični mehanizmi, ki vplivajo na spremembo barve cvetov in posameznih pigmentov. Nekateri dejavniki, ki vplivajo na spremembo barve so temperatura, kopigmenti, pH vakuolnega soka, prisotnost kovinskih ionov, dostopnost primarnih metabolitov, oblika celic itd. (Miller in sod., 2011).

Pigmenti v rastlinah so organske molekule, ki absorbirajo svetlobno energijo in na ta način določajo barvo rastlinskega tkiva. Obstajajo štiri glavne skupine rastlinskih pigmentov (Miller in sod., 2011):

- Klorofil absorbira modri in rdeči del spektra svetlobe, zato je rastlinsko tkivo, ki ga vsebuje, značilno zelene barve. Je ključna fotosintetsko aktivna molekula, sodeluje pa tudi v signalizaciji opraševalcev ali raznašalcev semen. Vsebuje magnezij, železo in baker.
- Karotenoidi dajejo rumene, oranžne in rdeče barvne tone. Nekateri vsebujejo molekule kisika. Potrebni so za fotosintezo, zaščito klorofila pred fotooksidacijo, signalizacijo in zbiranje svetlobe.
- Flavonoidi (flavoni in flavonoli; antocianini) so brezbarvni, beli, blede rumeni, rdeči, vijolični in modri pigmenti. Na njihovo sintezo vplivajo temperatura, pH, prisotnost kovinskih ionov, vezava sladkorjev na aglikone, organske kisline, kopigmenti, oblika celice... Njihova vloga je zaščita pred presežki UV sevanja, obramba pred herbivori in drugimi stresorji in signalizacija (privabljanje opraševalcev in raznašalcev semen). Akumulirajo se v vakuoli.
- Betalaini so rdeče, vijolične in modre barve. Vsebujejo dušik. Njihova vloga je podobna kot pri antocianinih – signalizacija in obramba.

Antocianini so najpomembnejši vodotopni pigmenti v vakuolah rastlinskih celic, ki vplivajo na nastanek rdeče, vijolične in modre barve cvetov. Najpogostejši aglikoni so pelargonidin, cianidin, peonidin, delfinidin, petunidin in malvidin, znani pa so tudi številni drugi antociani, ki so zelo vrstno specifični. V procesu sinteze antocianinov sodelujejo številni encimi; v zadnjih korakih sintezne poti predvsem halkon sintaza (CHS), halkon izomeraza (CHI), dihidroflavonol 4-reduktaza (DFR) in antocianidin sintaza (ANS). V večini orhidej je prisoten le cianidin, ki daje cvetovom rdečkasto-rožnate do rjave tone (Chen in sod., 2011). Za tvorbo delfinidina, ki je odgovoren za modrikaste in vijoličaste barvne tone, je ključen encim flavonoid 3', 5' – hidroksilaza (*F3'5'H*), ki pa ga rastline iz rodu *Phalaenopsis* nimajo. Ker so antocianini občutljivi tudi na vpliv ko-pigmentov, pH vakuolnega soka in prisotnosti in vezavo kovinskih ionov je od tega odvisen videz modrih cvetov (Qi in sod., 2013).

Antociani so najbolj stabilni pri pH 3. V kislem območju vplivajo na modro do vijolično barvo, v nevtralnem pH so brezbarvni, v bazičnem pa roza do rdeči. Kovine, ki vplivajo na spremembo barve so aluminij, železo in magnezij. Rastlina, ki je najbolj dovzetna na vrednost pH v tleh je hortenzija (*Hydrangea* sp.). V cvetovih kopiči aluminij ( $Al^{3+}$ ), ki je dostopnejši v kislih tleh, zato se cvetovi modro obarvajo (Schreiber in sod., 2010).

Modra barva cvetov je pri rastlinah izjemno redka. Delfinidin, ki je pomemben za tvorbo modre barve cvetov, v rodu *Phalaenopsis* ni prisoten. Večina kukavičevk v cvetovih namreč kopiči le cianidin. V naravi obstaja zgolj nekaj svetlo modrih orhidej, kot je npr. *Vanda coerulea*, katere glavni pigmenti so cianidin in delfinidin. Zaradi redkosti so modre orhideje zelo iskane (Griesbach, 2005). Vrste in križanci rodu *Phalaenopsis* so večinoma beli, rumeni, oranžni, rdeči do rdeče-vijolični (Tsai in sod., 2008).

Različno obarvane sorte določenih vrst lahko naredimo s križanjem ali z genetskimi transformacijami, ki sta sorazmeroma dolgotrajna procesa. Na ta način pri kukavičevkah sicer nastajajo zanimivi križanci, ki so edinstveni zaradi različnih barv ali oblik cvetov, vendar modre barve cvetov še niso uspeli požlahtniti. Bolj enostaven način barvanja rastlin in rastlinskih delov je dodajanje posebnih sintetičnih barvil, ki se kopičijo v vakuolah. Postopek je še posebno zanimiv pri rastlinah, ki dolgo cvetijo. Kot rezano cvetje je najbolj primerna vrtnica, pri lončnicah pa orhideja iz rodu *Phalaenopsis*.

#### 2.4.1 Genetska sprememba barve

Genske transformacije oziroma vnos genov v genom rastline so ena od metod žlahtnjenja, pri kateri pridobimo želene lastnosti pri določeni rastlini (Javornik, 2000). Vnos novih genov v rastlino večinoma povzroči opazne spremembe pri eni ali več lastnostih rastline (Žel, 1996).

Z uporabo tradicionalnih žlahtniteljskih metod (križanje in selekcija) žlahtnitelji ustvarjajo nove sorte (križance). To predstavlja dolgotrajen proces, še posebej ko se ustvarjajo rastline, ki naj bi imele številne zaželenne lastnosti, kot so barva in oblika cvetov, habitus rasti, odpornost na različne bolezni in škodljivce, tolerantnost na stres ter obstojnost rezanega cvetja za različne namene (Mol in sod., 1995).

Pridobivanje modrih cvetov pri različnih vrstah rastlin je izjemno težko. Faktorji, ki so pomembni za obstojnost modre barve so sinteza delfinidina, prisotnost kopigmentov in ustreznost pH vrednost v vakuoli (Mol in sod., 1995).

Prvi uspešni poskusi pridobivanja modrih cvetov so bili izvedeni pri nageljnih in vrtnicah. Slednje so popularne zaradi različnih barv in obstojnosti cvetov. Kljub obsežnemu barvnemu spektru pa še danes čisto prave modre vrtnice niso požlahtnili. Za pridobivanje modrih cvetov vrtnic je ključno preprečiti sintezo rdečih pigmentov in spodbuditi produkcijo modrega pigmenta (Fukui in sod., 2006).

K barvnim odtenkom cvetov prispevajo tudi flavoni in flavonoidi. Obe skupini spojin igrata pomembno vlogo pri stabilnosti in razvoju modre barve antocianidnih pigmentov s tako imenovano "kopigmentacijo". Za razvoj barve cvetov je torej najbolj odgovorno kopičenje sekundarnih metabolitov kot so antociani, flavonoidi, karotenoidi in betalaini. Spontane spremembe v kopičenju sekundarnih metabolitov lahko povzročijo variacije v barvi cvetov in večina komercialno dostopnih sort je požlahtnjena tako, da so izkoriščene naravne mutacijske spremembe. Antocianidni aglikoni (npr. pelargonidin, cianidin in delfinidin), ki izražajo rdečo do modro barvo, se sintetizirajo iz halkonov s pomočjo encimov v reakcijah hidroksilacije, redukcije in oksidacije. Modra barva je intenzivnejša s

povečanjem števila hidroksilnih skupin na B-obroču antocianida in sintezo delfinidinov (Nishihara in Nakatsuka, 2010).

Žlahtnitelji iščejo gen za sintezo delfinidina v vrstah rodu *Phalaenopsis*. Uporabljajo tudi naravne mutacije, ki bi vodile k modremu cvetenju pri vrstah, ki v naravi v tej barvi ne cvetijo. Za žlahtnjenje modrih cvetov je pomembno poznavanje biokemijskih osnov mutacij, ki bi jih s pridom lahko uporabljati v postopkih (Griesbach, 2005).

Po dolgoletnih raziskavah in poskusih se žlahtnitelji na Chiba Univerzi, Okinawa, Japonska, počasi približujejo modrim orhidejam. Cvetovi so temno vijolične barve do indigo barve. Hibridi so večinoma potomci *Phalaenopsis violacea* var. *coerulea* in *Doritis pulcherrima* var. *Coerulea*. Cvetovi so majhni in imajo povprečni premer le od 3 do 5 cm. Leta 2001 je zacvetel prvi 'moder' oziroma indigo hibrid *Phalaenopsis violacea* 'Gulfstream Blue' (slika 11 A). Naslednji poskusi so bili bolj uspešni. Leta 2005 so zacveteli še hibridi *Phalaenopsis violacea* 'Blue Blood' in *Phalaenopsis violacea* 'Blue Chip' (Slika 11 B in C) (Orchidview ..., 2011).



Slika 11: Prvi indigo *Phalaenopsis violacea* 'Gulfstream Blue' (A); *Phalaenopsis violacea* 'Blue Blood' (B); *Phalaenopsis violacea* 'Blue Chip' (C) (Orchidview ..., 2011)

Pridobljene lastnosti pri križancih so po dolgem času še obstojne, mlade rastline pa razmnožujejo vegetativno (Mol in sod., 1995).

Kljub temu so barvni odtenki bolj vijoličasti kot modri. Intenzivno modrih cvetov pri rodu *Phalaenopsis* zaenkrat še niso uspeli požlahtniti. Zato so se razvile druge tehnike barvanja cvetov, kot je dodajanje barvila v cvetno steblo.

#### 2.4.2 Sprememba barve z dodajanjem barvil

Enostavnejši in hitrejši način spreminjanja barve cvetov je pomakanje stebel/cvetov v barvilo ali injiciranje posebnega sintetičnega barvila v cvetno steblo.

Za postopek barvanja rezanega cvetja je pomembno, da je cvet v rahlem sušnem stresu, tako da je črpanje barvila po ksilemskem toku najmočnejše. Cvetno steblo položijo v vodno raztopino barvila in spremembe barve so vidne že po nekaj urah. Običajno se barvajo beli cvetovi različnih rastlin, končni odtenek pa je odvisen od koncentracije barvila, tipa barvila, časa barvanja in rastlinske vrste. Najpogosteje barvajo rezano cvetje vrtnic, nageljčkov in krizantem; priljubljene pa so predvsem modro obarvane rastline (Garden guides ..., 2010). Prav tako je ta postopek priljubljen tudi za obarvanje zelenih nageljčkov, ki se podarjajo ob prazniku sv. Patrika na Irskem (Ehow ..., 2011).

Obarvano rezano cvetje je na tržišču prisotno že vrsto let. Posebnost pa v zadnjem obdobju predstavljajo obarvane lončnice, saj so 'žive' in cvetijo dolgo časa. Največkrat so to rastline, ki ohranijo cvetove dolgo časa, kot npr. vrste rodov *Phalaenopsis*, *Anthurium* in *Bromelia*. Tehnologija barvanja orhidej se je razvijala dolgo časa, obstaja posebno izdelana oprema za vbrizgavanje barvila v cvetno steblo (Silver Vase, 2011).

Številne vrtnarije in vrtni centri tržijo modro cvetoče vrste rodu *Phalaenopsis* in potrošniki so velikokrat prepričani, da gre za naravno barvo cvetov. Pogosto so razočarani, saj po prenehanju modrega cvetenja rastline oblikujejo povsem običajne bele cvetove, saj so le obarvani beli hibridi. Ker korenine vrst rodu *Phalaenopsis* nimajo sposobnosti absorpcije barvila aktivni transport preko korenin ni mogoč. Zato so razvili pasivno tehniko barvanja, kjer cvetove obarvajo preko injiciranja vodne raztopine barvila v cvetno steblo. Vanj se naredi luknja in z infuzijo injicira barvilo, v drugih rastlinskih organih (listih, zračnih koreninah) pa se barvilo načeloma ne nalaga, saj pasivni transport poteka le po cvetnem steblu navzgor do cvetov. Ko obarvani cvetovi odpadejo jih tako nasledijo novi beli, ker barvilo v rastlini ni obstojno (Chang in Wang, 2014).

### 3 MATERIAL IN METODE DELA

#### 3.1 MATERIAL ZA POSKUS

##### 3.1.1 Rastlinski material

Sadike orhidej iz rodu *Phalaenopsis* smo dobili pri podjetju Ocean Orchids d.o.o., ki se nahaja v kraju Dobrovnik v Prekmurju. V poskus smo vključili dve sorti *Phalaenopsis* – 'Anthura Bern' in 'Anthura Cambridge', ki imata bele cvetove. Razlika med sortama je v obliki in velikosti cveta ter barvi medene ustne. Izbrali smo sorti z belimi cvetovi, ker je injicirano modro barvilo bolj vidno, kot če bi obarvali pisane ali drugače pigmentirane cvetove. Orhideje, ki smo jih vključili v poskus, so imele odprte cvetove in le dva do štiri zaprta cveta (popka). Za boljšo primerjavo med kontrolo in obarvanim cvetnim stebлом smo uporabili dvostebelne rastline.

##### Sorta 'Anthura Bern':

Hibrid s polno cvetočimi debelimi cvetnimi stebli. Povprečni premer cveta je 8,5 cm. Pripada skupini orhidej z velikimi cvetovi. Cvetovi so beli z bledo rumeno medeno ustno (slika 12). Povprečna višina cvetnega stebela je 60 cm. Navadno zrasteta po dve cvetni stebli s stranskimi poganjki (White ..., 2010).



Slika 12: Sorta 'Anthura Bern' (White ..., 2010)

##### Sorta 'Anthura Cambridge':

Hibrid z belimi cvetovi in živo rumeno medeno ustno. Povprečni premer cveta je od 10 do 11 cm, kar pomeni da pripada skupini orhidej z velikimi cvetovi (slika 13). Pri večini orhidej te sorte zrasteta po dve cvetni stebli, ki imata povprečno višino od 55 do 65 cm. V primerjavi s sorto 'Anthura Bern' ima ta sorta bolj zaobljene in večje cvetove in živo rumeno medeno ustno (White ..., 2010).



Slika 13: Sorta 'Anthura Cambridge' (White ..., 2010)

### 3.1.2 Sredstvo za barvanje cvetov

Cvetove orhidej iz rodu *Phalaenopsis* smo barvali z modrim črnilom ter sistemskim modrim barvilom v prahu za barvanje cvetov.

Modro barvilo, ki se uporablja za barvanje rezanega cvetja, smo dobili pri podjetju Ocean Orchids d.o.o. Na tržišču sistemske barve, ki so specializirane za barvanje cvetnih stebel pri orhideji iz rodu *Phalaenopsis*, niso dostopne. Uporabili smo Deep Blue A43 Absorbit Stem Dye barvo v prahu. To je specialno sistemsko sredstvo za barvanje rastlin oziroma dela rastline (cvet, list). Vsebuje aktivno snov natrijev dodecil benzen sulfonat (5 % w/w), ki za rastline v priporočenih odmerkih ni toksična, v večjih koncentracijah pa lahko povzroči poškodbo. Po navodilih se 2 % barvilo pripravi tako, da se v 500 mL destilirane vode umeša 10 g prahu. Pomembno je, da je rastlina v rahlem sušnem stresu preden injiciramo vodno raztopino barvila. Od rastline je odvisno, kdaj se začne vlek barve v cvetno steblo. Npr. vrtnica, ki ima bolj olesenelo cvetno steblo, rabi več časa kot nagelj, ki je zelenat (The color ..., 2014).

### 3.1.3 Drugi uporabljeni materiali v poskusu

Pri postavitvi poskusa smo uporabili še skalpel za zarezo v cvetnem stebelu, injekcijo in infuzijo za injiciranje barvila v cvetno steblo, filter papir za boljši vlek barve v rastlino, sponke, papirnate brisače in izolirni trak za zaščito luknje. Za pregled prečnega prereza cvetnega stebela in venčnega lista smo uporabili mikroskop OLYMPUS AX70, lupo OLYMPUS SZH10 in kamero (za mikroskop in lupo) OLYMPUS DP-70.

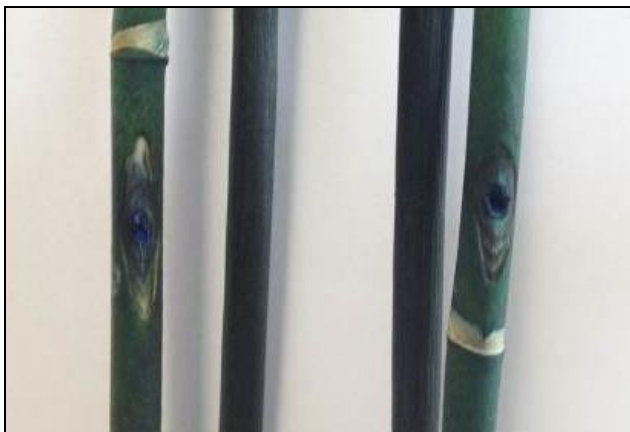
## 3.2 METODE DELA

Začetek poskusov je bil oktobra leta 2013. Zadnji poskus je bil izveden januarja leta 2014. Poskusi so bili opravljeni na Biotehniški fakulteti v Ljubljani, Oddelku za agronomijo, Katedri za sadjarstvo, vinogradništvo in vrtnarstvo.



### 3.2.1 Primerjava komercialno obarvane orhideje z našo metodo barvanja

Preden smo začeli s poskusi, smo preučili že obarvano modro orhidejo (VG Colours, Nizozemska), ki je dostopna na tržišču. Luknja na cvetnem stebelu je narejena s posebno tehnologijo (slika 14 in 15). V našem poskusu smo s skalpelom poskušali narediti čim bolj podobno luknjo. Metode injiciranja barvila v orhideje, za katere smo se odločili, niso idealne in predstavljajo improvizacijo tehnološkega postopka, ki ga izvajajo za barvanje orhidej rodu *Phalaenopsis*.



Slika 14: Luknja na modri orhideji (VG Colours, Nizozemska), narejena s posebno tehnologijo (foto: Zanelli, 2013)



Slika 15: Vzdolžni prerez stebela v predelu luknje pri modri orhideji *Phalaenopsis* (VG Colours, Nizozemska), ki je dostopna na tržišču (foto: Ocean Orchids d.o.o., 2013)

Pred zasnovo poskusov barvanja cvetov smo naredili prečni prerez stebela kontrolne in obarvane rastline (VG Colours, Nizozemska), da vidimo razporeditev žil in potek barve do cveta ter prečni prerez obarvanega venčnega lista.

Poskusi so bili razdeljeni tako, da smo eno skupino orhidej iz rodu *Phalaenopsis* poskušali obarvati z modrim črnilom, drugo pa s sistemskim barvilom Deep Blue A43 Absorbit Stem Dye. Najprej smo testirali različne koncentracije obeh barvil pri posameznih odrezanih cvetovih in potem smo primerne koncentracije injicirali v cvetna stebela z dvema



metodama. Prva uporabljena metoda je bila metoda injekcije, druga pa infuzije. Zanimalo nas je namreč ali z različnimi metodami in koncentracijami barvila dosežemo boljše ali hitrejšo obarvanost venčnih listov. Pri obeh metodah smo najprej s skalpelom previdno zarezali v cvetno steblo. Pomembno je, da orhideje preveč ne poškodujemo in obenem zagotovimo čim več žil v cvetnem stebelu, da bi se barvilo lahko razdelilo po celotnem transportnem sistemu. Zato je bila rez poševna in ne pravokotna na cvetno steblo, saj tako ohrani večjo stabilnost. Orhideje so imele odprte cvetove razen par popkov na koncu cvetnega stebela. Rastline smo pred začetkom poskusov z injiciranjem barvila izpostavili blagemu sušnem stresu (niso bile zalite 10 dni), saj naj bi se v teh razmerah vlek vode z raztopljenim barvilom povečal. V času poskusa so bile rastline na dnevni svetlobi in ponoči v temi ter na sobni temperaturi (20 °C).

### **3.2.2 Testiranje časa barvanja in koncentracije dveh barvil s posameznimi odrezanimi cvetovi**

Preverjali smo obarvanost posameznih odrezanih cvetov z modrim črnilom in sistemskim barvilom Deep Blue A43 Absorbit Stem Dye. Cvetove s cvetnim pecljem smo s skalpelom previdno odrezali s cvetnega stebela orhideje, ki ni bila zalita, tako da bi cvetovi hitreje začeli z vlek vode in barvila. S pomakanjem posameznih cvetov v različne razredčitve barvila smo testirali, koliko časa je potrebno, da se začne vlek barvila v cvet in če koncentracija barvila vpliva na obarvanost cvetov.

Uporabili smo 4 mL modrega črnila neznane koncentracije, ki smo ga poleg osnovne koncentracije še razredčili z destilirano vodo v razmerju 1:1 (2 mL modrega črnila in 2 mL destilirane vode).

Priporočeno 2 % koncentracijo sistemaškega barvila Deep Blue A43 Absorbit Stem Dye smo preračunali na manjšo količino (0,1 g barvila v prahu smo raztopili v 5 mL destilirane vode). Pripravljeni barvili smo razredčili v različnih razmerjih in sicer v razmerju 1:1 (5 mL barvila in 5 mL destilirane vode, da smo dobili 1 % raztopino), 1:3 (5 mL barvila in 15 mL destilirane vode je 0,6 % raztopina), 1:5 (5 mL barvila in 25 mL destilirane vode je 0,4 % raztopina).

V nadaljnjih postopkih barvanja cvetnih stebel smo na podlagi rezultatov tega poskusa uporabili priporočeno 2 % ter 1, 0,6, 0,4 in 3,4 % koncentracijo sistemaškega barvila ter modrega črnila neznane koncentracije in redčitev 1:1. Kot kontrolo smo beli cvet dali v destilirano vodo.

### **3.2.3 Poskus priporočene 2 % koncentracije sistemaškega barvila z injekcijo in infuzijo**

Na dvostebelnih orhidejah smo injicirali priporočeno 2 % koncentracijo barvila v cvetno steblo z dvema metodama – z injekcijo in z infuzijo. Razlika v metodah je v velikosti rezi oziroma luknje v cvetnem stebelu. Proces barvanja je trajal dvajset ur (20). Po daljšem časovnem intervalu (25 ur) ni bilo opaznih razlik v barvi cvetov. Po zaključku barvanja smo izvlekli injekcijo/infuzijo in filter papir ter z vodo izprali luknje, ki smo jih nato zatesnili z izolirnim trakom.

### Injekcija

V cvetna stebila smo barvilo injicirali z injekcijo. S skalpelom smo previdno naredili rez in manjšo luknjico. V luknjico posameznih cvetnih stebel smo dali majhen košček filter papirja, preko katerega je potekal vlek vode z raztopljenim barvilom. Na ta način smo preprečili iztekanje barve iz zareze in hkrati ves čas rastlini dodajali barvilo, saj je bil filter papir ves čas navlažen. Injekcijo z barvilom smo na cvetna stebila in oporo pritrdili s sponkami (slika 16).



Slika 16: Injiciranje barvila z injekcijo (foto: Zanelli, 2013)

### Infuzija

S skalpelom smo v posamezna cvetna stebila naredili luknjo velikosti končnega nastavka infuzije. V luknjo smo dali majhen košček filter papirja zaradi boljšega vleka barvila v cvetno steblo. Ko smo pritrdili infuzije, smo začeli z dovajanjem barvila (slika 17).



Slika 17: Dovajanje barvila z infuzijo (foto: Zanelli, 2013)

#### **3.2.4 Poskus različnih koncentracij sistemskega barvila pri injiciranju v steblo**

Na podlagi poskusa, v katerem smo testirali obarvanost posameznih cvetov s priporočeno 2 % koncentracijo barvila ter njegovo razredčitvijo smo, poleg priporočene koncentracije barvila za obarvanje rezanega cvetja, preizkusili še injiciranje razredčenega 1 % barvila v cvetno steblo. Pripravili smo tudi povišano 3,4 % koncentracijo barvila v prahu (0.1 g

barvila v 3 mL destilirane vode), da bi preverili ali je obarvanost cvetov pri močnejši koncentraciji bolj intenzivna.

### **3.2.5 Poskus barvanja cvetov z injiciranjem modrega črnila v cvetno steblo**

Na podlagi rezultatov poskusa barvanja posameznih cvetov z modrim čnilom smo v cvetna stebila z injekcijo injicirali razredčeno modro čnilo v razmerju 1:1 (2 mL modrega črnila in 2 mL destilirane vode).

### **3.2.6 Poskus dolgoživosti obarvanih in neobarvanih stebel**

V poskusu dolgoživosti dvostebelnih orhidej *Phalaenopsis* smo kot kontrolo namesto injiciranja barvila v eno cvetno steblo dvostebelne orhideje injicirali destilirano vodo. To smo naredili zato, da ugotovimo ali je vzrok propada in odpadanja cvetov poškodba ali barvilo. Naredili smo podoben rez in luknjo kot pri vseh primerih injiciranja barvila. Proces je potekal istočasno kot barvanje in v enakih pogojih.

### **3.2.7 Grafični prikaz podatkov**

Dobljene podatke o potrebnem času do maksimalnega obarvanja cvetov in času cvetenja po obarvanju smo vnesli v računalniški program MS Excel 2010 ter jih prikazali z ustreznimi grafikoni.

## 4 REZULTATI

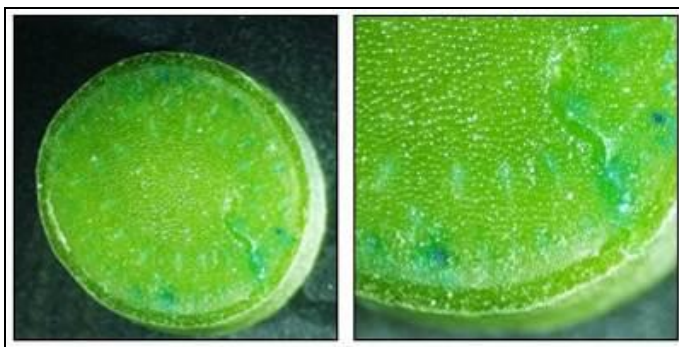
### 4.1 PROUČEVANJE KOMERCIALNO OBARVANE ORHIDEJE

#### 4.1.1 Prečni prerez cvetnega stebela

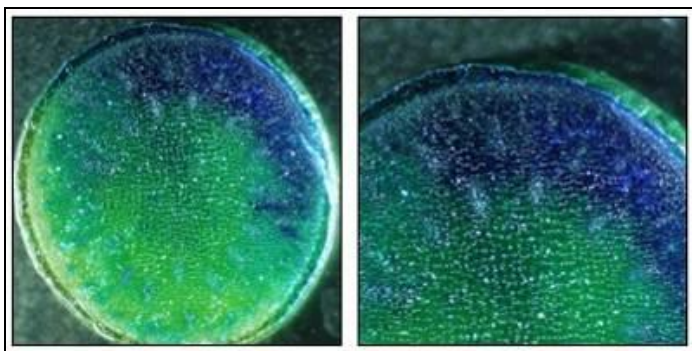
Pred začetkom poskusov barvanja cvetov orhidej *Phalaenopsis* smo prečno prerezali cvetno steblo modro obarvane rastline (VG Colours, Nizozemska) in pod lupo opazovali spremembe žilnega sistema. Zanimala nas je razporeditev žil v cvetnem steblu oziroma kako poteka transportni prenos injiciranega barvila po cvetnem steblu. Orhideja je enokaličnica, kar pomeni, da ima žile razpršene in neorganizirane ter gosto razporejene po obrobju stebela. Tako oblikujejo visoko organizirano omrežje za učinkovit transport na dolge razdalje (Dermastia, 2007).

Naredili smo prečne prereze cvetnega stebela dlje od poškodbe (slika 18) ter bližje poškodbi (slika 19). Pri prečnem prerezu, ki je bil bližje poškodbi, je bilo opazno, da se je barvilo bolj akumuliralo na mestu, kjer je bila narejena luknja za injiciranje barvila in da je bil transport omejen le na poškodovane žile, ki so vpile barvilo.

Kopičenje barvila na poškodovanem mestu je verjetno posledica nastanka embolij. To so zračni mehurčki zaradi katerih se voda/barvilo ne more takoj prenašati po rastlini (Dermastia, 2007).



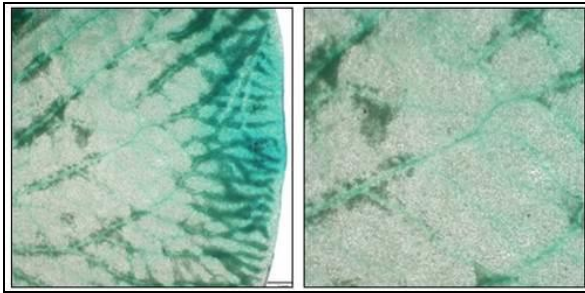
Slika 18: Prečni prerez stebela dlje od poškodbe komercialno obarvane orhideje *Phalaenopsis*



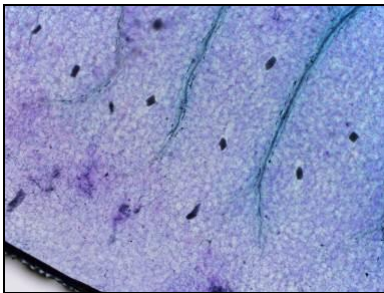
Slika 19: Prečni prerez stebela bližje poškodbi komercialno obarvane orhideje *Phalaenopsis*

#### 4.1.2 Obarvanost venčnih listov

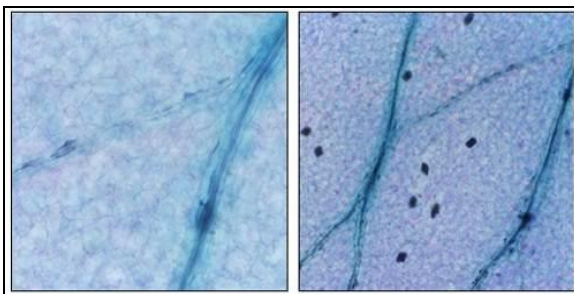
Injicirano barvilo v cvetnem stebelu se je s transportnim sistemom preneslo do cveta orhideje *Phalaenopsis* in se razporedilo po žilah. Z mikroskopskim pregledom smo spremljali površinsko obarvanost venčnega lista (slika 20 in 21), razporeditev barvila po žilah (slika 22) in prečni prerez žile venčnega lista (slika 23).



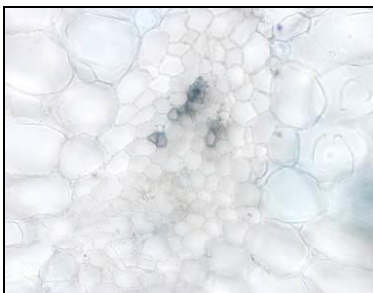
Slika 20: Obarvan venčni list



Slika 21: Obarvana površina venčnega lista ter vršnega dela žil

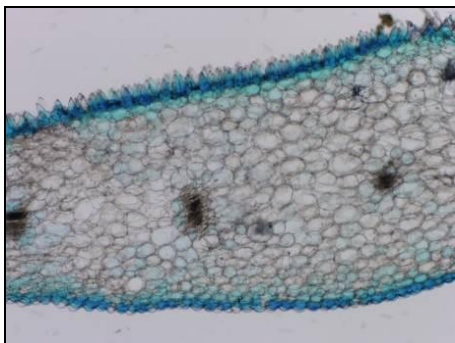


Slika 22: Mikroskopski prikaz žil v obarvanem venčnem listu

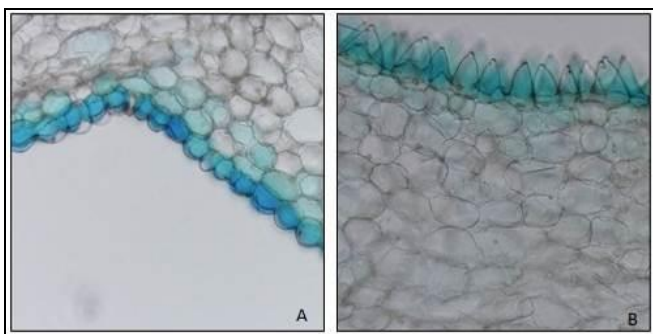


Slika 23: Prečni prerez žile venčnega lista

Barvilo se je v venčnem listu kopičilo v vakuoli. Vakuola je del rastlinske celice in pomemben založni organel. Poleg skladiščenja sintetiziranih primarnih in sekundarnih metabolitov je sposobna sprejeti tudi barvilo (Dermastia, 2007). Ko smo prerezali venčni list, se je barvilo razlilo iz vakuole. Na mikroskopskih slikah 24 in 25 je obarvanost vidna le v robnih celicah.



Slika 24: Prečni prerez obarvanega venčnega lista



Slika 25: Epiderm venčnega lista: spodnji del (A) in zgornji del (B)

## 4.2 METODE INJICIRANJA IN OBARVANOST CVETOV

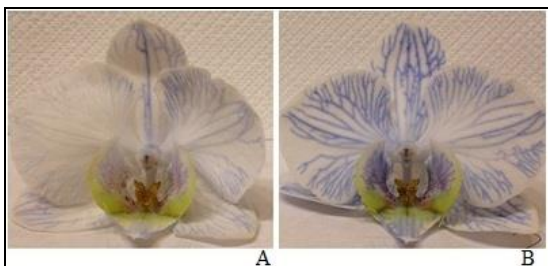
### 4.2.1 Testiranje časa barvanja in koncentracije dveh barvil z odrezanimi posameznimi cvetovi

Postopek obarvanja odrezanih posameznih cvetov z modrim črnilom in sistemskim barvilom je bil opravljen v enakih pogojih. Proces barvanja je trajal dvajset (20) ur. Po daljšem času ni bilo opaznih večjih sprememb.

#### Modro črnilo

Obarvanost cveta pri osnovni neznani koncentraciji modrega črnila je bila slaba. Barva se v cvetu ni razporedila v celoti, ampak so bile svetlo obarvane le žile. Obarvanost je bila vidna po 2 urah. Po desetih urah so se žile nekoliko temneje obarvale (slika 26 A). Pri razredčitvi modrega črnila z destilirano vodo v razmerju 1:1 je bila obarvanost žil bolj intenzivna. Po prvi uri barvanja so bile žile že svetlo modro obarvane, po desetih urah pa temno modre in poudarjene (slika 26 B).





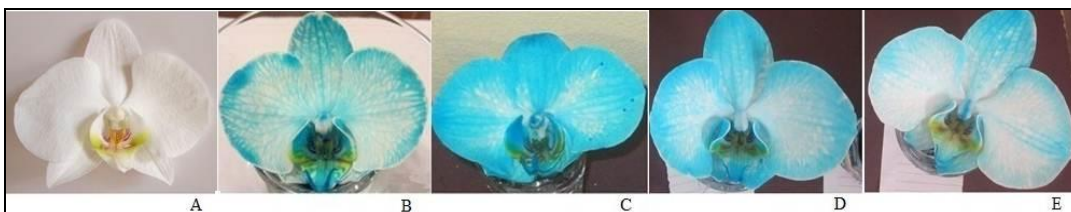
Slika 26: Obarvanost odrezanih cvetov: z modrim črnilom (A) in razredčitev z destilirano vodo (1:1) (B) (foto: Zanelli, 2013)

### Sistemsko barvilo

Pri osnovni 2 % koncentraciji modrega barvila (0,1 g barvila v prahu smo raztopili v 5 mL destilirane vode) so venčni listi začeli akumulirati barvilo že v prvi uri. Najprej so bile vidne spremembe v barvi medene ustne in glavnih žil, kasneje pa se je barva začela razporejati tudi od roba proti notranjosti sepalov in petalov. Tudi po koncu postopka obarvanja so bili robovi venčnih listov in medena ustna (razen rumenega dela) najbolj obarvani, drugi deli cveta pa so bili blede modri ali pa so celo ohranili belo barvo (slika 27 B). Na cvetnem peclju ni bilo vidnejših sprememb barve.

Barvilo smo razredčili na 1, 0,6 in 0,4 % koncentracijo, da bi znižali gostoto in s tem vplivali na boljšo obarvanost cvetov. Po desetih minutah so se žile v venčnih listih svetlo modro obarvale. Cvetovi so takoj začeli srkati vodo z raztopljenim barvilom, saj so bili prej izpostavljeni blagemu sušnemu stresu. Razredčitev v razmerju 1:1 (5 mL priporočene koncentracije barvila in 5 mL destilirane vode) oziroma 1 % koncentracija se je pokazala kot najboljša, ker se je cvet v celoti obarval modro in se je barva lepo razporedila po vseh delih (slika 27 C). Pri razmerju 1:3 (5 mL priporočene koncentracije barvila v 15 mL destilirane vode) oziroma 0,6 % koncentracija je bila barva svetlejša in sredina cveta se ni obarvala (slika 27 D). Pri razmerju 1:5 (5 mL priporočene koncentracije barvila v 25 mL destilirane vode) oziroma 0,4 % koncentracija je bil cvet še svetlejše obarvan in bolj bel kot moder (slika 27 E).

Kljub priporočilu 2 % koncentracije proizvajalca barvila za obarvanje rezanega cvetja se je pri barvanju cvetov orhideje *Phalaenopsis* za najprimernejšo izkazala 1 % koncentracija oziroma razredčitev v razmerju 1:1 (5 mL priporočene koncentracije barvila v 5 mL destilirane vode). Barva je bila v tem primeru razporejena po celotnem cvetu, ne le po žilah (slika 27).



Slika 27: Obarvanost odrezanih cvetov z različno koncentracijo sistemskega barvila: kontrola destilirana voda (A); barvilo po navodilih proizvajalca (B); razredčitev 1:1 (C); razredčitev 1:3 (D); razredčitev 1:5 (E) (foto: Zanelli, 2013)

#### **4.2.2 Poskus priporočene 2 % koncentracije barvila injiciranega z injekcijo in infuzijo**

Za poskus smo uporabili proizvajalčevo priporočeno 2 % koncentracijo barvila za barvanje rezanega cvetja in ga injicirali v cvetna stebila nekaj cm nad bazo listov. Podoben postopek izvajajo tudi ponudniki modrih orhidej rodu *Phalaenopsis*, tako da smo pri poskusu želeli slediti njihovi metodi in mesto vboda pri vseh rastlinah čim bolj poenotiti. Poskus z injekcijo in infuzijo je trajal dvajset ur (20). Maksimalna obarvanost cvetov se je pri večini poskusnih rastlin izrazila po petnajstih (15) urah, kasneje spremembe v intenzivnosti barve niso bile več opazne.

##### Injekcija

Luknja v posameznih cvetnih steblih je bila manjša, kar pomeni da je bilo v procesu poškodovanih manj žil. Barvanje cvetnih delov se je začelo tri ure po začetku injekcije. Injicirano barvilo je bilo najprej vidno po glavnih žilah, potem se je počasi razporejalo po stranskih žilah ter le deloma tudi po celotnih venčnih listih. Medene ustne so bile intenzivno modro obarvane. Barva je bila najbolj razlita po venčnih listih v notranjosti cvetov in v medenih ustnah. Proti robu so bili venčni listi obarvani le po žilah (slika 28).



Slika 28: Modro obarvani cvetovi sorte 'Anthura Bern' po metodi injiciranja barvila z injekcijo (foto: Zanelli, 2013)

Modre orhideje so intenzivno cvetele primerljivo s kontrolno rastlino, po približno 20 dneh so začeli posamezni cvetovi propadati in odpadati.

##### Infuzija

Pri tej metodi je bila luknja v posameznih cvetnih steblih večja in posledično je bilo poškodovanih več žil. Barvanje venčnih listov se je začelo že dve uri po začetku injiciranja barvila. Pri mladih cvetovih in popkih so bili znaki barvanja takoj vidni po glavnih žilah. Postopoma se je barva razlila po celotnih venčnih listih. Najbolj so se obarvali mladi cvetovi, ki so se šele odpirali ter popki. Starejši cvetovi so bili bolj obarvani po žilah, medene ustne pa so bile tudi pri teh v celoti intenzivno modre (slika 29).

Obarvane orhideje so cvetele primerljivo s kontrolno rastlino, po 20 dneh so začeli odpadati starejši cvetovi in potem mlajši.





Slika 29: Modro obarvani cvetovi sorte 'Anthura Cambridge' po metodi z infuzijo (foto: Zanelli, 2013)

Razlika v metodah je bila v začetku barvanja, kar je verjetno odvisno od velikosti poškodbe in zajetih žil v cvetnem stebelu. Končni rezultati obarvanosti pa so bili med metodama pri isti sorti primerljivi. Intenzivnost obarvanja žil je bila močnejša pri sorti 'Anthura Cambridge' v primerjavi s sorto 'Anthura Bern' ne glede na uporabljen metodo barvanja. Pri obeh metodah so bili najbolj obarvani mlajši cvetovi in popki pri obeh sortah, ki pa so bili po odpiranju manj intenzivno modri. Postopek injiciranja z injekcijo je sicer manj zahteven in cenejši, vendar je dovajanje barvila po infuziji lažje.

S transportnim sistemom se je barvilo razporedilo tudi po listih (slika 30). Na robovih starejših listov so bile vidne temnejše obarvane žile, še bolj pa so bile spremembe opazne na mladih listih. Barvilo se je transportiralo tudi v mlado cvetno steblo (slika 31).



Slika 30: Obarvan mlad list orhideje *Phalaenopsis* (foto: Zanelli, 2013)



Slika 31: Prenos barvila do mladega cvetnega stebela orhideje *Phalaenopsis* (foto: Zanelli, 2013)

#### 4.2.3 Obarvanost cvetov barvanih z različnimi koncentracijami barvila

##### 1 % koncentracija barvila

V poskusu z odrezanimi posameznimi cvetovi smo ugotovili, da z 1 % koncentracijo barvila dosežemo hitrejšo (šest ur) in boljšo obarvanost celotnih venčnih listov, v primerjavi z metodo, ko smo isto koncentracijo injicirali v cvetna stebila. Znaki obarvanja so se pojavili šele po dvanajstih urah in barva se je kopičila izredno počasi in končni rezultat ni bila intenzivno modra obarvanost cvetov, pač pa svetlo modra barva (slika 32). Žile niso bile tako poudarjene kot pri poskusu, kjer priporočene 2 % koncentracije barvila nismo razredčili. Podobno, kot pri poskusu s priporočeno koncentracijo barvila, so bili najbolj obarvani mladi cvetovi in medene ustne. Poskus je trajal 20 ur. Maksimalno obarvanost cvetov smo pri večini rastlin zaznali po osemnajstih urah. Obarvane orhideje so cvetele primerljivo dolgo kot kontrolna rastlina. Pri listih ni bilo vidne obarvanosti, verjetno zaradi nižje koncentracije barvila, ki v listih ni bila opazna s prostim očesom.



Slika 32: Obarvani cvetovi sorte 'Anthura Bern' z 1 % koncentracijo barvila (foto: Zanelli, 2013)

##### Povečana 3,4 % koncentracija barvila injicirana v cvetno steblo

Ker je bila koncentracija barvila višja, so bili prvi znaki obarvanja vidni že po dveh urah. Vršički stebila in mladi popki so že po petih urah pridobili modri odtenek. Do konca procesa barvanja so bili intenzivno modro obarvani (slika 33 A). Barvilo se je uspešno preneslo tudi po celotnih venčnih listih, žile so bile zelo poudarjene. Medene ustne so bile v celoti modre, z izjemo belega roba (slika 33 B). Na mladih listih so bile vidne temno modre žile. Proces barvanja je trajal dvajset ur. Maksimalna obarvanost cvetov je bila vidna po desetih urah, kasneje ni bilo večjih sprememb v odtenku barve cveta.

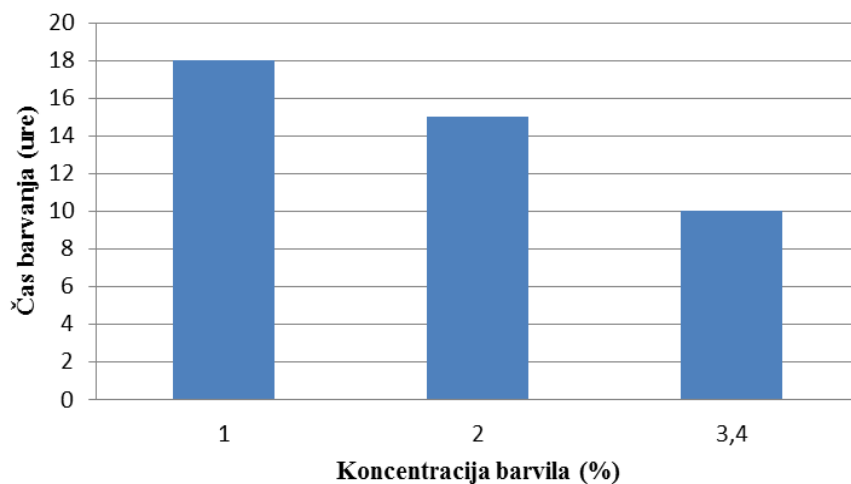
Tri dni po začetku barvanja so cvetovi začeli veneti in po enem tednu odpadati, prav tako so se sušili in odpadli popki. Rast vršička se je ustavila. Predvidevamo lahko, da je močnejša koncentracija za rastlino toksična, saj je bil postopek injiciranja barvila v rastlino izveden povsem enako, kot pri prejšnjih poskusih.



Slika 33: Obarvanost popkov in vršička (A) ter celotnih cvetov (B) sorte 'Anthura Cambridge' pri močnejši 3,4 % koncentraciji barvila (foto: Zanelli, 2013)

#### 4.2.4 Potreben čas do maksimalnega obarvanja cvetov

Obarvanje vseh orhidej smo opazovali dvajset ur, saj smo ugotovili, da po tem času ni več zaznati večjih sprememb. S proučevanjem obarvanosti orhidej s posameznimi koncentracijami barvila smo opazili različen čas, ki je bil potreben za doseganje maksimalne obarvanosti cvetov orhidej. Iz grafa na sliki 34 je razvidno, da je maksimalen čas obarvanosti pri priporočeni 2 % koncentraciji barvila (0,1 g v 5 mL destilirane vode) v povprečju petnajst ur, pri 1 % koncentraciji v povprečju osemnajst ur ter pri 3,4 % koncentraciji v povprečju deset ur.



Slika 34: Povprečen čas maksimalne obarvanosti cvetov orhidej s različnimi koncentracijami sistemskega barvila injiciranega v cvetno steblo

Maksimalna obarvanost cvetov je odvisna od koncentracije sistemskega barvila in začetka akumulacije barvila v cvetovih posameznih rastlin. Močnejša 3,4 % koncentracija barvila je vplivala na temnejšo modro barvo cvetov ter hitrejšo maksimalno obarvanost. Cvetovi, obarvani z razredčeno 1 % koncentracijo barvila, so bili svetlejše barve, hkrati pa je bilo potrebno dlje časa do maksimalne obarvanosti. Barvanje s priporočeno 2 % koncentracijo barvila je dalo vmesne rezultate.

#### 4.2.5 Poskus barvanja cvetov z injiciranjem modrega črnila v cvetno steblo

Z injekcijo smo razredčeno modro čnilo (razmerje črnila in destilirane vode 1:1) injicirali v cvetno steblo. Za razredčitev smo se odločili na podlagi poskusa z odrezanimi posameznimi cvetovi, pri katerih je bil rezultat obarvanja boljši. Proces barvanja je trajal 20 ur in po tem času so bile opazne le minimalne spremembe barve žilnega sistema in medene ustne (slika 35). Modro čnilo se je izkazalo za neprimerno in neučinkovito za pridobivanje modrih cvetov orhidej iz rodu *Phalaenopsis*.



Slika 35: Minimalna obarvanost cveta z injiciranjem modrega črnila (foto: Zanelli, 2013)

#### 4.2.6 Poskus dolgoživosti obarvanih in neobarvanih stebel

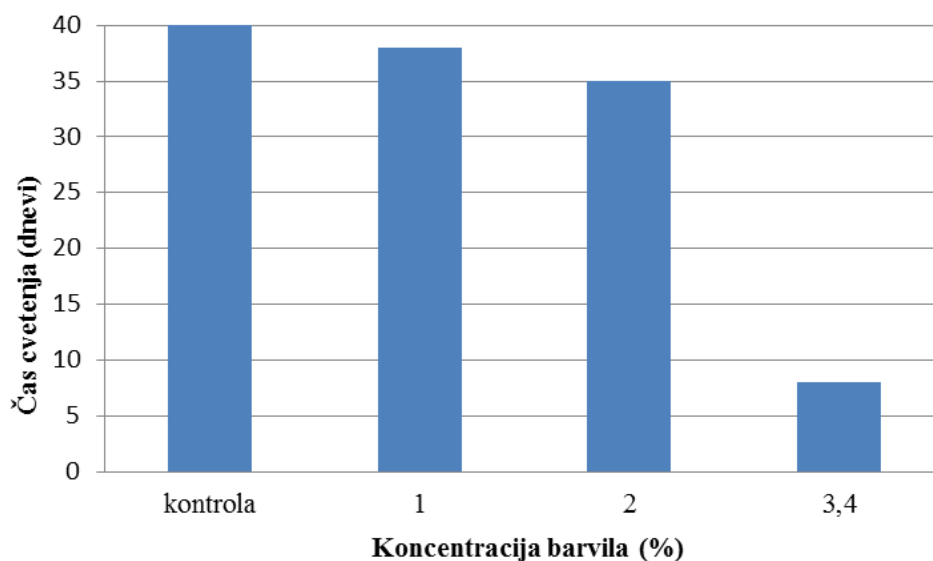
Dolgoživost obarvanih cvetov je odvisna od več dejavnikov, med njimi so najpomembnejši poškodba zaradi rezi, vdor mikroorganizmov v rastlino skozi poškodovano mesto in previsoka koncentracija barvila. Razlike v obstojnosti cvetov med uporabljenima sortama niso bile opazne (slika 36).



Slika 36: Propad cvetov zaradi barvila in poškodbe (foto: Zanelli, 2013)

Pri kontrolnih rastlinah smo ugotovili, da je luknja, ki jo naredimo v cvetnem steblu za injiciranje barvila, eden od ključnih razlogov za predčasno odpadanje cvetov. Poškodba cvetnega stebla je različna pri posameznih primerkih, odvisna je od debeline cvetnega stebla in natančnosti izvedbe.

Iz grafa na sliki 37 lahko vidimo razlike v času cvetenja pri kontrolnih in modro obarvanih orhidejah. Cvetovi pri kontrolnih orhidejah so cveteli dlje časa, kot obarvane orhideje. Orhideje, v katere smo injicirali priporočeno 2 % koncentracijo barvila dobavitelja (0,1 g barvila v prahu v 5 mL destilirane vode) so cvetele še približno en mesec. Mladi popki pa so že po nekaj dneh odpadli. Rastline, pri katerih smo priporočeno koncentracijo barvila razredčili na 1 % z destilirano vodo v razmerju 1:1 (5 mL barvila v 5 mL destilirane vode), so cveteli dlje časa kot pri predpisani koncentraciji dobavitelja; čas cvetenja je bil primerljiv s časom cvetenja kontrolnih rastlin, vendar pa se je pri nekaterih izkazalo drugače. Popki so pri nekaterih rastlinah prav tako odpadli. Orhideje, v katere smo injicirali višjo 3,4 % koncentracijo barvila (0,1 mL barvila v prahu v 3 mL destilirane vode), so cvetele le nekaj dni, nato pa so po štiri dneh počasi začeli veneti, popki pa so odpadli. Po desetih dneh so odpadli vsi preostali cvetovi. Sušenje in odpadanje popkov je verjetno posledica večje akumulacije barvila v vršičku in zastrupitev ne glede na uporabljeno sorto in koncentracijo barvila. Cvetna stebla so po odpadanju cvetov ostala zelena, a so prenehala z rastjo.



Slika 37: Povprečen čas cvetenja obarvanih cvetov glede na kontrolo

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Namen našega poskusa je bil pridobiti modre cvetove orhidej iz rodu *Phalaenopsis* s tehniko injiciranja specialnega systemskega barvila in modrega črnila v cvetno steblo. Ugotavljali smo vpliv poškodbe na cvetnem stebelu in barvila na dolgoživost obarvanih cvetov ter maksimalen čas za obarvanje cvetov.

Orhideje iz rodu *Phalaenopsis* so ene izmed najbolj prodajanih in priljubljenih lončnic. Obstaja veliko hibridov različnih barv, ampak vseeno težimo k spremembam in raznolikosti. Modra barva cvetov je redka pri rastlinah, tako je tudi pri orhidejah. Žlahtnitelji iščejo gen za sintezo delfinidina, ki ni prisoten v rodu *Phalaenopsis*, a je pomemben za tvorbo modre barve cvetov. Ker je žlahtniteljski postopek dolgotrajen, se je razvil lažji način pridobivanja modrih cvetov – injiciranje barvila v cvetno steblo. Ta metoda je bolj obstojna pri rastlinah, ki dolgo cvetijo, kot je orhideja iz rodu *Phalaenopsis*.

Epifitske orhideje, v katere spada rod *Phalaenopsis*, imajo zračne korenine, ki absorbirajo zračno vlago in hranila le preko vršičkov, ker je ostali prevodni del obdan z velamnom, ki preprečuje izhlapevanje. Aktivni transport barvila ni mogoč, ker korenine ne prenesejo zastajanje vode, zaradi česar lahko začnejo gniti.

Injiciranje barvila v cvetno steblo ulončenih rastlin, v našem primeru sta bili to sorti orhidej iz rodu *Phalaenopsis*, je skrbno varovan tehnološki postopek, v katerem s posebnim mehanizmom zarežejo luknjico v cvetno steblo, preko katere injicirajo sistemsko barvilo, prilagojeno za ta namen. Metode in barvili, s katerimi smo poskušali doseči podoben učinek modrega obarvanja niso idealna, a so se vseeno izkazala za dokaj učinkovita. Za masovno proizvodnjo je pomembno, da je metoda injiciranja barvila čim bolj enostavna, kar pa se je v našem primeru izkazalo za nerealno, saj je potrebno precej ročne spretnosti, potrpežljivosti, natančnosti in previdnosti pri nameščanju infuzije ali injekcije.

Orchidaceae (kukavičevke), kamor uvrščamo rod *Phalaenopsis*, so enokaličnice. To pomeni, da imajo v cvetnem stebelu žile razpršene in neorganizirane ter gosto razporejene po obodu (Dermastia, 2007). Pri naših poskusih smo zarezo v cvetnih steblih orhidej previdno naredili s skalpelom. Po začetnih poskusih smo ugotovili, da je najprimernejša poševna rez, saj zajame več žil in obenem ohranja stabilnost cvetnega stebela.

Orhideje smo pred pričetkom injiciranja barvila izpostavili rahlemu sušnemu stresu, da bi dosegli boljši vlek injicirane vodne raztopine barvila. Ob blagem sušnem stresu imajo celice v rastlini bolj negativen vodni potencial. Ustvari se gradient vodnega potenciala med celicami in ksilemom, kjer je vodni potencial bolj pozitiven. Posledično voda z barvilom postopoma izhaja iz ksilema in prehaja od celice do celice v medcelične prostore ter povrhnjico in barvilo se kopiči v vakuolah venčnih listov. Z vstopom vode v vakuolo se poveča turgorski tlak, ki omogoča aktivni transport topljencev v vakuolo. Poleg skladiščenja naravnih snovi, je ta sposobna kopičiti tudi barvila.

Preden smo začeli s postopkom injiciranja vodne raztopine barvila v cvetno steblo, smo preverjali obarvanost posameznih cvetov z modrim črnilom in sistemskim barvilom ter z njihovimi različnimi koncentracijami.

Posamezni odrezani cvetovi, barvani z osnovno neznano koncentracijo modrega črnila, so se počasneje in svetleje obarvali kot tisti, ki smo jih dali v razredčeno modro črnilo z destilirano vodo v razmerju 1:1. Zato smo za nadaljnji poskus injiciranja v cvetno steblo uporabili tisto koncentracijo, ki je dala boljši rezultat.

Osnovno 2 % koncentracijo modrega barvila smo razredčili na 1, 0,6 in 0,4 % koncentracijo, da bi znižali gostoto barvila in potencialno omogočili boljši vlek. Ker je pot črpanja vodne raztopine barvila po cvetnem peclju do cveta dokaj kratka, so se posamični odrezani cvetovi hitro začeli barvati. Pokazalo se je, da je cvet najbolj obarvan pri redčenju priporočene 2 % koncentracije barvila na 1 %. V nadaljnjih poskusih injiciranja v cvetna stebila smo uporabili priporočeno 2 % koncentracijo barvila dobavitelja in tudi 1 % razredčitev.

Na dvostebelni orhideji smo barvilo injicirali z dvema metodama – z injekcijo in infuzijo. Razlika v metodah je v velikosti reza in poškodbe cvetnega stebela, od česar je odvisna hitrost začetka barvanja cvetov glede na poškodovane žile. Ugotovili smo, da so se cvetovi hitreje obarvali pri metodi z infuzijo, ker smo v steblo naredili večjo luknjo za injiciranje barvila. Čas do maksimalnega obarvanja je bil pri obeh metodah enak (dvajset ur). Ugotovili smo, da je začetek barvanja in maksimalna obarvanost cvetov pri obeh metodah odvisna od koncentracije barvila. Močnejša koncentracija je vplivala na predčasno vidnost in bolj temno modro barvo žil. Na splošno so bili končni rezultati obarvanosti cvetov pri isti koncentraciji primerljivi med metodama. Enostavnost dovajanja barvila je glavno vodilo pri izbiri metode postopka. Ko pritrdimo infuzijo, lahko začnemo počasi in kontrolirano dovajati barvilo. Pri injekciji je to težje, ker barvilo iz injekcije lahko izteče.

Barvanje z modrim črnilom je dalo slabše rezultate v primerjavi s sistemskim barvilom. Modro črnilo se je težje razporejalo po žilah in ni prehajalo v medžilni prostor. Končni rezultat poskusa je minimalna, komaj opazna modra barva v medeni ustni cveta. Izkazalo se je, da modro črnilo ni primerno za barvanje cvetov orhidej in da so primernejša specialna barvila. Verjetno sestava tega barvila ni obstojna in močna, da bi se obdržala v vakuoli cveta.

V nadaljnjih poskusih smo uporabili Deep Blue A43 Absorbit Stem Dye barvo v prahu. Priporočena dobaviteljeva 2% koncentracija barvila, ki je primerna za barvanje rezanega cvetja, se je pokazala primerna tudi za barvanje ulončene rastline *Phalaenopsis*. Cvetovi so se lepo obarvali, a so bile najbolj poudarjene žile.

Redčenje priporočene koncentracije barvila na 1 % se je pri barvanju posameznih odrezanih cvetov izkazalo za najbolj primerno. Ko smo isto razredčitev barvila injicirali v cvetno steblo, nismo dobili enakih rezultatov obarvanosti. To bi lahko pripisali daljši poti prenosa barvila iz cvetnega stebela do cvetov in večjega števila cvetov na rastlini, v katere se barvilo razporeja. Zato je pomembno, da je koncentracija uporabljenega barvila močnejša.



Preverili smo, kakšna je obarvanost cvetov, če priporočen 2 % odmerek barve v prahu pripravimo s 3 mL destilirane vode in dobimo povečano 3,4 % koncentracijo. Vodna raztopina barvila se je počasi razporejala po cvetnem stebelu in cvetovih, ker je bila bolj gosta in bolj koncentrirana. Končni rezultati so bili sicer uspešnejši od bolj razredčenega barvila, vendar so bile enako kot v prejšnjih poskusih, barvno najbolj poudarjene žile.

V poskusu z različnimi koncentracijami barvila so se najbolj obarvali popki in vršički cvetnega stebela. Območje vstopa fotosintatov (barvila) v floem imenujemo vir, mesta, kjer izstopajo, pa ponor. Ponor predstavljajo apikalni meristemi (rastni vršiček stebela/korenine) in založni organi (korenine, stebela, brsti, listi, plodovi) (Dermastia, 2007). S tem lahko obrazložimo zakaj so bili mladi popki in vršički stebela najbolj modro obarvani, saj se v njih snovi (v tem primeru barvilo) kopičijo.

Prenosa barvila z enega cvetnega stebela v drugo nismo opazili. V nekaterih primerih (odvisno od koncentracije barvila) se je barvilo nalagalo tudi na robovih listov (posebej v mladih listih), v mladem cvetnem stebelu ter v stranskem cvetnem stebelu, v katerega smo injicirali barvilo. Transportni sistem v rastlini sestavljata ksilem in floem, ki sta povezana v enoto, ki je bolj ali manj neprekinjena po celotni rastlini od korenin do najmlajših žil v zelenih in cvetnih listih. Ksilemski del listnega prevodnega sistema prinaša vodo (v tem primeru z barvilom) iz stebela v list in jo razporeja po listnem mezofilu. V povrhnjici lista so vakuolizirane buliformne (balonaste) celice, ki zvijajo ali odvijajo list po izgubi ali sprejemu vode – s tem lahko povežemo kopičenje barvila v povrhnjici lista (Dermastia, 2007).

Pri prečnih prerezi obarvanih cvetnih stebel smo ugotovili, da se je injicirano barvilo nakopičilo v bližini odprtine in raztopine se le delno razporejajo po stebelu. Višje na stebelu smo opazili vse manj obarvanih (modrih) žil. To lahko razložimo z nastankom embolij (zračnih mehurčkov), ki so posledica mehanske poškodbe cvetnega stebela zaradi katerega se prekine prevajanje vode po rastlini in otežuje prenos barvila. Voda z razredčenim barvilom uspešno potuje le po nekaj žilah, zato je verjetno končni učinek obarvanja cvetov manj izrazit. Po žilnem sistemu se vodna raztopina barvila prenaša do venčnih listov orhidej in se kopiči v vakuoli. Pri prečnem prerezu venčnega lista smo opazili, da je barvilo steklo iz vakuol, kar nakazuje, da so modre orhideje res modre le do odpadanja modrih cvetov, nato pa se barvilo ne premešča v novo nastala cvetna stebela.

Nekatere poskusne rastline so cvetele še nekaj časa po obarvanju, druge so pa čez en teden začele propadati. Izkazalo se je, da sta obe uporabljeni sorti orhidej iz rodu *Phalaenopsis* enako občutljivi in predstavljata podoben potencial za modro obarvanje cvetov. Odpadanje modrih cvetov posameznih orhidej bi lahko povezali z več dejavniki, med njimi pa je najpomembnejši gotovo stres. Slednji predstavlja izpostavljenost rahlo sušnim razmeram, mehanska poškodba cvetnega stebela za injiciranje barvila ter vnos systemskega barvila. Vsako rastlino smo različno poškodovali, ker človeška roka ne naredi vedno enako globoke in široke odprtine. Barvilo v splošnem ni strupeno, ampak s prevelikim kopičenjem v popkih in vršičku cvetnega stebela lahko naredi škodo, kot je odpadanje popkov in prenehanje rasti vršička. Luknja je v bistvu odprta rana, skozi katero se orhideja lahko okuži. Floemski prevodni deli so tudi pot, ki jo različni mikrobi izkoriščajo za



premiške po rastlini (Dermastia, 2007). Z vsemi temi parametri smo oslabili rastline orhidej.

Orhideje, ki smo jih uporabili v poskusih, niso propadle v celoti. Odpadejo le modri cvetovi in posuši se cvetno steblo. Pri naslednjem cvetenju so cvetovi spet beli, ker se modro barvilo z naravnim procesom izčisti iz rastline (slika 38). Pri močnejši koncentraciji barvila, ki se je kopičilo tudi v steblo in listih orhideje, so možni še modri odtenki na novih belih cvetovih (Blue orchid ..., 2011).



Slika 38: Ponovno cvetenje obarvane orhideje iz rodu *Phalaenopsis* (foto: Zanelli, 2014)

Za natančnejše podatke bi potrebovali več časa za raziskavo, ker orhideje iz rodu *Phalaenopsis* nimajo določenega obdobja cvetenja, temveč zacvetijo, ko so dovolj močne. Če imajo primerne razmere za rast in cvetenje, je možno, da na vedno novih poganjkih cvetijo tudi celo leto in več. Cvetovi lahko ostanejo zdravi in lepi več kot štiri tedne (Ocean Orchids ..., 2012).

V pogovoru s Tomažem Jevšnikom iz podjetja Ocean Orchids d.o.o., smo potrdili, da so po končanem cvetenju modrih cvetov novi cvetovi spet beli. To je bilo opazno tudi pri ponovnem cvetenju poskusnih rastlin, ki smo jih obarvali z modrim barvilom. Pojav modrih odtenkov na novih belih cvetovih je možen zaradi ohranjanja barvila v rastlini ali v mladem cvetnem steblo, ki je v osnovi začelo z rastjo. Predčasno odpadanje obarvanih cvetov in popkov lahko omejimo s pravilnim zapiranjem rane/luknje, ki je narejena za injiciranje modrega barvila v cvetno steblo.

## 5.2 SKLEPI

Iz pridobljenih rezultatov našega poskusa smo potrdili naslednje hipoteze:

- sestava in tip barvila vplivata na intenzivnost modrega obarvanja;
- tehnika dodajanja barve v cvetno steblo je občutljiv postopek, ki poškoduje rastlino;
- različne koncentracije barvila vplivajo na intenzivnost barve v cvetovih, ki je v rastlini prisotna do odpadanja cvetov;

- za barvanje je pomembno, v kateri fazi je cvet. Popki so zelo občutljivi; ko se obarvajo, se hitro posušijo in odpadejo;
- primerno barvilo za obarvanje cvetov pri rodu *Phalaenopsis* je Deep Blue A43 Absorbit Stem Dye, ki se uporablja tudi za cvetove rezanih rastlin;
- modro črnilo ni primerno za barvanje cvetov pri rodu *Phalaenopsis*;
- različni deli cveta se različno intenzivno obarvajo;
- barvilo ni obstojno do te mere, oziroma ga rastlina ne akumulira, da bi bili modri tudi cvetovi na cvetnih steblih, ki se razvijejo naknadno.

Hipotezo, ki pojasnjuje, da sta intenzivnost obarvanja in dolgoživost cvetov odvisni od sorte *Phalaenopsis* lahko zavrnamo. Uporabljeni sorti sta se izkazali za primerljivo občutljivi. Na dolgoživost cvetov veliko bolj vpliva poškodba cvetnega stebela kot pa sorta.

Hipotezo, da postopek injiciranja rastline z modrim barvilom ne spremeni dolgoživosti cvetnega stebela in posameznih cvetov prav tako zavrnamo. S postopkom injiciranja pogosto vplivamo na dolgoživost cvetnega stebela in posameznih cvetov. Orhideja je poškodovana, ko naredimo luknjo/zarezo in ji vnesemo barvilo. Zaradi mehanskega stresa, ki smo ga povzročili, cvetovi odpadejo prej kot pri nepoškodovani orhideji.

Zavrnilo smo tudi hipotezo, da se barvilo ne nalaga v drugih rastlinskih organih (v listih, zračnih koreninah, cvetnem stebelu). Ugotovili smo, da se med injiciranjem barvila v cvetno steblo le-to s transportnim sistemom razporedi po celi rastlini. Najbolj vidno je pri cvetovih, ker so beli, vidno je tudi pri mladih rastlinskih organih, kot so mladi listi in mlado cvetno steblo. Kopičenje barvila v cvetovih drugega cvetnega stebela nismo zaznali. Transport hranilnih snovi teče v tisto smer, kjer se porabljajo – torej proti mladim rastlinskim organom. Vodni potencial omogoča, da se voda premika iz območja, kjer jo je več do območja kjer jo je manj. Ker smo rastline izpostavili rahlemu sušnemu stresu, se je v tem primeru voda oziroma v vodi raztopljeno barvilo, s transportnim sistemom rasporedilo tudi do mlajših delov rastlin.

## 6 POVZETEK

Orhideje pripadajo družini kukavičevk (Orchidaceae), ki obsega okoli 750 rodov in 25 000 vrst in podvrst. Tvorijo eno najbolj obsežnih družin cvetočih rastlin na zemlji. V drugi polovici 20. stoletja so postale najbolj priljubljene in s tem najbolj prodajane lončnice. Večina orhidej je epifitov, kar pomeni da rastejo na deblih in vejah dreves ter imajo razvite zračne korenine. Tej skupini orhidej pripada rod *Phalaenopsis*, ki vsebuje okoli 70 vrst. Rod *Phalaenopsis* je enostaven za gojenje in dolgo cveti. Hibridi vsebujejo bele, rumene, oranžne, rdeče, rdeče do vijolične in vijolične cvetove. Kljub temu si želimo spremembe kot so modra barva cvetov, ki je redka pri rastlinah - tudi pri orhidejah.

Žlahtnjenje predstavlja dolgotrajen proces za pridobivanje novih hibridov z zaželenimi lastnostmi. Žlahtniteljski poskusi za pridobivanje modrih cvetov pri rodu *Phalaenopsis* so bili do zdaj neuspešni, ker se barva izrazi kot vijolični odtenki. Antociani so glavni vodotopni pigmenti v vakuoli, ki prispevajo k nastanku rdeče, vijolične in modre barve cvetov. Žlahtnitelji iščejo gen za sintezo delfinidina v rodu *Phalaenopsis*, ki je pomemben za tvorbo modre barve cvetov.

Hitrejši in bolj enostaven način barvanja cvetov je dodajanje posebnih barvil v cvetno steblo. Lahko barvamo rezano cvetje ali lončnice, ki dolgo cvetijo. Med slednjimi so zelo primerne vrste in sorte rodu *Phalaenopsis*, najpogosteje pa se barvajo bele sorte. Natančni tehnološki postopki barvanja ulončenih orhidej niso znani, modre orhideje pa se na tržišču pojavljajo že nekaj let. Pri barvanju uporabljajo posebno opremo za zarezovanje in injiciranje sistemskega barvila v cvetno steblo, ki je obstojno le do odpadanja cvetov, nato pa rastline spet zacvetijo v sortno značilni beli barvi.

V magistrskem delu smo želeli ugotoviti kako uspešno in s čim manj poškodb pridobimo modre cvetove pri orhidejah rodu *Phalaenopsis* s tehniko injiciranja barvila v cvetno steblo. Proučevali smo, če poškodba na cvetnem stebelu ali barvilo vplivata na dolgoživost modrih cvetov.

V poskus smo vključili dve sorti orhidej iz rodu *Phalaenopsis* in sicer 'Anthura Bern' in 'Anthura Cambridge', ki imata bele cvetove, saj je v tem primeru modra barva najbolj opazna. Uporabili smo sistemsko barvo v prahu Deep Blue A43 Absorbit Stem Dye, ki za rastline v priporočenih odmerkih ni toksična, v večjih koncentracijah pa lahko povzroči poškodbo.

Testirali smo koncentracije sistemskega barvila in modrega črnila pri posameznih cvetovih in nato primerni koncentraciji injicirali v cvetno steblo z dvema metodama – injekcijo in infuzijo. Metode injiciranja barvila v orhidejo, za katere smo se odločili, niso idealne, so improvizacija tehnološkega postopka, ki ga uporabljajo za barvanje orhidej iz rodu *Phalaenopsis*.

Luknjo za injiciranje vodne raztopine barvila smo previdno naredili s skalpelom. Ko smo injicirali barvilo v cvetno steblo se je s transportnim sistemom le-to preneslo do cveta, kjer se je kopičilo v vakuolah.

Različne koncentracije so vplivale na različno obarvanost cvetov. Priporočena 2 % koncentracija barvila dobavitelja, ki se uporablja za barvanje rezanega cvetja, kot so vrtnice in nageljni, se je izkazala primerna tudi za barvanje cvetov lončnic. Razredčitev priporočene koncentracije barvila na 1 % je vplivala na časovno dinamiko obarvanja, hkrati pa tudi na svetlejšo končno obarvanost venčnih listov in drugih delov cveta. Močnejša koncentracija barvila je po drugi strani povzročila zelo hitre spremembe obarvanosti, cvetovi pa so bili ob koncu postopka zelo temno obarvani. V vseh primerih poskusnih rastlin smo dosegli dobro obarvanost žilnega sistema v cvetovih. Le redko dosežemo popolnoma modro obarvan cvet, kot pri kupljeni modri orhideji (VG Colours, Nizozemska). Uspelo nam je le pri poskusu, ko smo posamezne odrezane cvetove dali v raztopino barvila.

Predčasno odpadanje obarvanih cvetov bi lahko povezali s posledicami stresa, predvsem s poškodbo na cvetnem stebelu in injiciranjem sinteznega barvila. Tudi zelo visoke koncentracije barvila in drugi parametri lahko dodatno vplivajo na propad cvetnega stebela in odpadanje cvetov ter popkov.

Pri postopku barvanja lončnic orhidej *Phalaenopsis* celotna rastlina ne propade, pač pa napake v tehnološkem postopku (prevelika zareza, embolije...) povzročijo le propad cvetnega stebela in cvetov. Običajno rastline nato kmalu poženejo nova cvetna stebela, ki pa razvijejo cvetove sortno specifične barve. Injicirano barvilo v rastlini namreč ni obstojno dolgo časa. Opazili pa smo, da pri uporabi močnejše koncentracije barvila posamezni novi cvetovi, ki se razvijejo na mladih cvetnih steblih prisotnih že v času obarvanja, lahko ohranijo svetlo moder pridih.

## 7 VIRI

- Batič F., Šircelj H., Turk B. 2004. Pregled rastlinskega sistema. Ljubljana, Oddelek za agronomijo, Biotehniška fakulteta v Ljubljani: 119 str.
- Blue orchid. The mystique of the blue Phal. 2011.  
<http://blueorchid.org/the-mystique-of-the-blue-phal.html> (28. apr. 2014)
- Chang Y. A., Wang Y. 2014. Genetic modification produces true blue orchid. greenhouse grower.  
<http://www.greenhousegrower.com/plant-culture/genetic-modification-produces-true-blue-orchid/> (20. mar. 2014)
- Chen W., Hsu C., Cheng H., Chang H., Chen H., Ger M. 2011. Downregulation of putative UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase gene alters flower colour in *Phalaenopsis*. Plant Cell Report, 30:1007–1017
- Dermastia M. 2007. Pogled v rastline. Ljubljana. Nacionalni inštitut za biologijo: 237 str.
- DLOS: Društvo ljubiteljev orhidej Slovenije. 2005.  
<http://www.orhideje.org> (6. feb. 2014)
- Ehow. Meaning of green carnations. 2011  
[http://www.ehow.co.uk/about\\_6686666\\_meaning-green-carnations.html](http://www.ehow.co.uk/about_6686666_meaning-green-carnations.html) (20. mar. 2014)
- Fukui Y., Nomoto K., Iwashita T., Masuda K., Tanaka Y., Kusumi T. 2006. Two novel blue pigments with ellagitannin moiety, rosacyanins A1 and A2, isolated from the petals of *Rosa hybrida*. Tetrahedron, Elsevier ScienceDirect, 62: 9661-9670
- Garden guides. How to dye roses blue 2010.  
<http://www.gardenguides.com/86995-dye-roses-blue.html> (20. mar. 2014)
- Griesbach, R. J. 2005. A scientific approach to breeding blue orchids: exploring new frontiers in search of elusive flower colors. Orchids, 74, 5 : 376-379
- Javornik B. 2000. Gensko spremenjene rastline. Sodobno kmetijstvo, 33, 6: 290-294
- Jevšnik T. 2006. Orhideje – Gojenje tropskih orhidej. 1. izdaja. Dobrovnik, Založba Ocean Orchids d.o.o.: 149 str.
- Miller R., Owens S. J., Rorslett B. 2011. Plants and colour: Flowers and pollination. Optics & Laser Technology, 43: 282–294
- Mol J. N. M., Holton T. A., Koes R. E. 1995. Floriculture: genetic engineering of commercial traits. Tibtech, 13: 350-355

Nishihara M., Nakatsuka T. 2010. Genetic engineering of flavonoid pigments to modify flower color in floricultural plants. *Biotechnology Letters*, 33: 433-441

Ocean Orchids. Nega falenopsisov. 2012.  
<http://www.oceanorchids.com/si/care.php> (28. apr. 2014)

Orchidview - home of the finest Phalaenopsis and Phragmipediums. 2011  
[http://www.orchidview.com/information\\_links/Birth\\_of\\_the\\_Blues.htm](http://www.orchidview.com/information_links/Birth_of_the_Blues.htm) (20. mar. 2014)

Orhideje za dnevnu sobu. 2014. Moj lijepi vrt, 1: 56-58

Petauer T., Ravnik V., Šuštar F. 1998. Mali leksikon botanike. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 390 str.

Pridgeon A. M., Cribb P. J., Chase M. W., Rasmussen F. N. 1999. *Genera orchidacearum*. V: General introduction, Apostasioideae, Cypripedioideae. Vol. 1. New York, Oxford University Press Inc: 197 str.

Purchai G. 2004. Kućne biljke. Zagreb, Nova knjiga Rast: 69 str.

Qi Y., Lou Q., Quan Y., Liu Y., Wang Y., 2013. Flower-specific expression of the *Phalaenopsis* flavonoid 3', 5'-hydroxylase modifies flower color pigmentation in *Petunia* and *Lilium*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 115:263–273

Ravnik V. 2002. Orhideje Slovenije. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 192 str.

Schreiber H. D., Swink A. M., Godsey T. D. 2010. The chemical mechanism for Al<sup>3+</sup> complexing with delphinidin: A model for the bluing of hydrangea sepals. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 104: 732-739

Silver Vase. Blue mystique 2011  
<http://silvervase.com/w/index.php> (20. mar. 2014)

Sheehan T. J. 2001. *Ultimate orchid*. 1. izdaja. New York, DK Publishing, Inc: 160 str.

Squire D. 2008. Orhideje – stručnjak za vrt. Rijeka, Leo-commerce d.o.o.: 80 str.

The color design resource. 2014  
<http://dmcolor.com/products/deep-blue-3/> (12. apr. 2014)

Trenc-Frelj I. 1990. *Moje sobne rastline – Orhideje*. Ljubljana, Mladinska knjiga: 64 str.

Tsai W., Hsiao Y., Pan Z., Hsu C., Yang Y., Chen W., Chen H. 2008. Molecular biology of orchid flowers: with emphasis on *Phalaenopsis*. *Advances in Botanical Research*, 47: 99-145

Upward M. 2008. Trajnice. Cvijeće i ukrasno bilje. V: Velika ilustrirana enciklopedija.  
Brickell C. (ur.). London, Royal Horticultural Society: 220-325

White assortment Phalaenopsis. Goeij L. (ur.). 2010. Bleiswijk, Anthura B.V., 18, 2: 10-11  
<http://www.anthura.nl/uploads/downloads/anthurinfo/en/2010/Anthurinfo%20october%202010%20en.pdf>

Žel J. 1996. Specifične metode genske tehnologije pri rastlinah – vnos genov. V:  
Biotehnologija. Osnovna znanja. Uredil Raspor P. BIA, Ljubljana: 299-308

## **ZAHVALA**

Za vso pomoč in strokovne nasvete pri izdelavi magistrskega dela se zahvaljujem mentorici doc. dr. Valentini SCHMITZER. Zahvala tudi recenzentki prof. dr. Zlati LUTHAR, ter predsedniku komisije prof. dr. Gregorju OSTERCU, ki so delo natančneje pregledali.

Zahvaljujem se podjetju Ocean Orchids d.o.o., posebej Tomažu JEVŠNIKU, za strokovno pomoč in izvedbo praktičnega dela ter za vse podarjene rastline.

Zahvala velja tudi moji družini, prijateljem in sošolcem za vso podporo, pomoč in potrpežljivost med študijem.