

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Maja VIVOD

***IN VITRO* RAZMNOŽEVANJE TROPSKE ORHIDEJE
Anguloa clowesii (Lindl.)**

DIPLOMSKO DELO

Visokošolski strokovni študij

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Maja VIVOD

***IN VITRO* RAZMNOŽEVANJE TROPSKE ORHIDEJE *Anguloa
clowesii* (Lindl.)**

DIPLOMSKO DELO
Visokošolski strokovni študij

***IN VITRO* PROPAGATION OF TROPICAL ORCHIDS *Anguloa
clowesii* (Lindl.)**

GRADUATION THESIS
Higher professional studies

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo je zaključek visokošolskega strokovnega študija – agronomija, smer hortikultura. Opravljeno je bilo na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin, Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorico diplomske naloge imenovala izr. prof. dr. Zlato LUTHAR.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: izr. prof. dr. Marijana JAKŠE
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

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

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

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Spodaj podpisana Maja Vivod se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Maja Vivod

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Vs
- DK UDK 582.594:631.53.03:57.085.2 (043.2)
- KG tropska orhideja/*Anguloa clowesii*/seme/asimbiotska kalitev/rast/razvoj
- KK AGRIS F01
- AV VIVOD, Maja
- SA LUTHAR, Zlata (mentorica)
- KZ SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
- LI 2013
- IN *IN VITRO* RAZMNOŽEVANJE TROPSKE ORHIDEJE *Anguloa clowesii* (Lindl.)
- TD Diplomsko delo (Visokošolski strokovni študij)
- OP IX, 29 str., 5 pregl., 8 sl., 24 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI V poskus *in vitro* razmnoževanja smo vključili semena tropske orhideje *Anguloa clowesii* Lindl., nabrana v naravnem rastišču Kolumbije. Pred inokulacijo na gojišča smo semena površinsko razkužili z 1,6 % dikloroizocianurno kislino. Uporabili smo 3 različna gojišča s tremi koncentracijami hranil (polno, polovično in četrtinsko) z oznakami A, ½A, ¼A, B, ½B, ¼B, C, ½C in ¼C. Zaradi okužbe je bilo izločenih 51,4 % petrijevk s semeni. 7 dni po inokulaciji na semenih ni bilo vidnih sprememb, medtem ko je po 14 dneh večina semen na vseh gojiščih nabrekla. Začeli so se pojavljati protokormi, ki so bili na gojiščih A podolgovati, na gojiščih B in C pa okrogli. 21 dni po inokulaciji so se protokormi povečali in začeli zeleneti. Na gojišču B so se prvič pojavili rizoidi, ki so se 28 dni po inokulaciji močno zgostili in povečali. 36 dni po inokulaciji so se pojavili zametki za liste na gojiščih B in C, medtem ko so se na gojišču A začele pojavljati nekroze. 77 dni po inokulaciji smo prešteli kaljiva in nekaljiva semena ter ocenili prisotnost protokormov in rizoidov. Največ 96,3 % kaljivih semen je bilo na gojišču B s polno koncentracijo hranil, nekoliko manj na ostalih gojiščih C in A. Na obeh gojiščih je bila tudi ocena prisotnosti protokormov in rizoidov srednja do velika, medtem ko na gojišču A mala do srednja. Ne glede na koncentracijo hranil sta za kalitev ter nadaljnjo rast in razvoj primerni gojišči B in C, medtem ko je gojišče A neprimerno za *in vitro* razmnoževanje orhideje *Anguloa clowesii* Lindl.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Vs
 DC UDC 582.594:631.53.03:57.085.2 (043.2)
 CX tropical orchid/*Anguloa clowesii*/seed/asymbiotic germination/growth/development
 CC AGRIS F01
 AU VIVOD, Maja
 AA LUTHAR, Zlata (supervisor)
 PP SI – 1000, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
 PY 2013
 TI *IN VITRO* PROPAGATION OF TROPICAL ORCHIDS *Anguloa clowesii* (Lindl.)
 DT Graduation thesis (higher professional studies)
 NO IX, 29 p., 5 tab., 8 fig., 24 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB In *in vitro* propagation were included seeds tropical orchids *Anguloa clowesii* Lindl. collected during the natural growing area of Colombia. Before inoculation the media seeds were surface disinfected with 1,6 % dichloroisocyanuric acid. We used 3 different media with three concentrations of nutrients (full, half and quartile) with labels A, ½ A, ¼ A, B, B ½, B ¼, C, C ½ and ¼ C. The infection eliminated 51.4 % petri dishes with seeds. 7 days after inoculation, the seeds had not visible changes, while after 14 days the most of the seeds have swollen on all media. They began to appear protocorms, which were on media A oblong, on media B and C round. 21 days after inoculation protocorms increased and became green. On the medium B first appeared rhizoids, which have increased after 28 days inoculation and greatly condensed. 36 days after inoculation beginnings of leaves appeared on media B and C, while the medium A began to emerge a necrosis. 77 days after inoculation we counted germinated and not germinated seeds and evaluate the presence and protocorms and rhizoids. More than 96.3 % of germinated seeds were on the medium B with full concentration of nutrients, to a lesser extent on other media C and A. On both media were also the present protocorms and rhizoids, while on the medium A, small to medium-sized. Regardless of the concentration of the nutrients for germination and subsequent growth and development are suitable media B and C, while medium A was unsuitable for *in vitro* propagation of orchids *Anguloa clowesii* Lindl.

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
SIMBOLI IN OKRAJŠAVE	IX
1 UVOD	1
1.1 NAMEN NALOGE	1
1.2 CILJ NALOGE.....	1
1.3 DELOVNA HIPOTEZA	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 DRUŽINA ORCHIDACEAE – KUKAVIČEVKE.....	2
2.1.1 Znanstvena klasifikacija orhideje <i>Anguloa clowesii</i> Lindl.	2
2.1.2 Sistematika rodu <i>Aguloa</i>.....	3
2.2 MORFOLOGIJA RASTI – HABITUS ORHIDEJ	3
2.2.1 Značilnost rasti orhideje <i>Anguloa clowesii</i> Lindl.	4
2.3 MORFOLOGIJA ORHIDEJ	5
2.3.1 Značilnosti cvetov orhideje <i>Anguloa clowesii</i> Lindl.	5
2.4 NAČINI OPRAŠEVANJA ORHIDEJ	5
2.5 OPLODITEV IN RAZVOJ SEMENA ORHIDEJ.....	6
2.6 POMEN MIKORIZE ZA KALITEV ORHIDEJ.....	7
2.6.1 <i>In vivo</i> kalitev	7
2.6.2 <i>In vitro</i> kalitev	7
2.7 STERILIZACIJA SEMEN	8
2.8 SESTAVA GOJIŠČ	8
2.8.1 Makrohranila.....	8
2.8.2 Mikrohranila.....	9
2.8.3 Ogljikovi hidrati	9
2.8.4 Organske snovi in vitamini.....	9
2.8.5 Strjevalci gojišč.....	10
2.8.6 pH vrednost gojišča	10
2.9 RAZVOJ SEJANCEV	10
3 MATERIALI IN METODE	11
3.1 SEMENSKI MATERIAL	11
3.2 SESTAVA IN PRIPRAVA GOJIŠČ	11
3.3 RAZKUŽEVANJE IN INOKULACIJA SEMEN NA GOJIŠČE	13

3.4	KALITEV IN GOJENJE RASTLIN	13
3.5	BONITIRANJE	13
4	REZULTATI	15
4.1	RAZKUŽEVANJE SEMEN	15
4.2	VPLIV GOJIŠČA NA GENERATIVNO RAZMNOŽEVANJE	15
4.2.1	7 dni po inokulaciji semen na gojišča	16
4.2.2	14 dni po inokulaciji semen	16
4.2.3	21 dni po inokulaciji semen	16
4.2.4	28 dni po inokulaciji semen	17
4.2.5	36 dni po inokulaciji semen	17
4.2.6	41 dni po inokulaciji semen	17
4.2.7	55 dni po inokulaciji semen	17
4.2.8	63 dni po inokulaciji semen	18
4.2.9	77 dni po inokulaciji semen	18
4.2.10	91 dni po inokulaciji semen	21
4.2.11	103 dni po inokulaciji semen	22
4.2.12	131 in 155 dni po inokulaciji semen	22
5.1	RAZPRAVA	25
5.1.1	Aseptičnost kulture semen	23
5.1.2	Vpliv gojišča in koncentracije hranil na kalitev in razvoj	23
5.2	SKLEPI	25
6	POVZETEK	26
7	VIRI	28
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	Str.
Preglednica 1: Sestava A, B in C gojišč za kalitev, rast in razvoj tropske orhideje <i>Anguloa clowesii</i> Lindl.	12
Preglednica 2: petrijevk z okuženimi semeni orhideje <i>Anguloa clowesii</i> Lindl. na A, B in C gojiščih	15
Preglednica 3: Število še kaljivih in nekaljivih semen ter ocenitev protokormov in rizoidov 77 dni po inokulaciji semen orhideje <i>Anguloa clowesii</i> Lindl. na gojišče A.....	20
Preglednica 4: Število še kaljivih in nekaljivih semen ter ocenitev protokormov in rizoidov 77 dni po inokulaciji semen orhideje <i>Anguloa clowesii</i> Lindl. na gojišče B.....	21
Preglednica 5: Število še kaljivih in nekaljivih semen ter ocenitev protokormov in rizoidov 77 dni po inokulaciji semen orhideje <i>Anguloa clowesii</i> Lindl. na gojišče C.....	21

KAZALO SLIK

	Str.
Slika 1: Tropska orhideja <i>Anguloa clowesii</i> Lindl.	4
Slika 2: Semena tropske orhideje <i>Anguloa clowesii</i> Lindl.	11
Slika 3: Odstotek petrijevk z okuženimi semeni orhideje <i>Anguloa clowesii</i> Lindl. po inokulaciji na A, B in C gojiščih.....	15
Slika 4: Nabrekli kalčki oz. kaljiva semena ter pojav protokormov 14 dni po inokulaciji semen orhideje <i>Anguloa clowesii</i> Lindl.: A – gojišče A; B – gojišče B in C z ogljem	16
Slika 5: Kaljiva semena s povečanimi in ozelenelimi protokormi ter posameznimi rizoidi 21 dni po inokulaciji semen orhideje <i>Anguloa clowesii</i> Lindl.: A – gojišče A; B – gojišče B z ogljem.....	17
Slika 6: Razvoj protokormov z rizoidi in pojav prvih listov 63 dni po inokulaciji semen orhideje <i>Anguloa clowesii</i> Lindl. na gojišča s celotno koncentracijo hranil: A – gojišče A; B – gojišče B; C – gojišče C; D – protokormi z listi na gojišču ½B	18
Slika 7: Odstotek še kaljivih in nekaljivih semen 77 dni po inokulaciji semen orhideje <i>Anguloa clowesii</i> Lindl. na gojišče A, B in C.....	21
Slika 8: 91 dni po inokulaciji semen orhideje <i>Anguloa clowesii</i> Lindl.: A in C – gojišče B, brez propadajočih protokormov; B in D – gojišče A, s propadajočimi protokormi	22

SIMBOLI IN OKRAJŠAVE

A, B in C – oznake gojišč s polno koncentracijo hranil

$\frac{1}{2}$ A, $\frac{1}{2}$ B in $\frac{1}{2}$ C – oznake gojišč s polovično koncentracijo hranil

$\frac{1}{4}$ A, $\frac{1}{4}$ B in $\frac{1}{4}$ C – oznake gojišč s četrtinsko koncentracijo hranil

BAP – 6-benzil aminopurin

MES – 2-(N-morfolin) etansulfonska kislina

NAA – α -naftalen očetna kislina

S – seme

KS – kaljiva semena

NS – nekaljiva semena

P – protokormi

R – rizoidi

1 UVOD

Orhideje so zelo obsežna in razširjena rastlinska družina. Zanimive so po obliki in barvi cvetov ter listov in predvsem epifiti tudi po načinu rasti. *Anguloa clowesii* Lindl. je tropska orhideja, ki raste v višinskih predelih Venezuele, Kolumbije, Ekvadorja in Peruja. Večinoma je terestična, občasno tudi epifitska z mesnatimi pseudobulbuli, večjimi od 20 cm, listi so daljši od 1 m, cvetni peclji s cvetom so krajši od listov, cvetovi so večinoma rumeni, veliki, v obliki tulipana. Oblika in barva cvetov ter oblika rasti so zelo zanimivi kot vir genov za križanje (Oakeley, 1999; Absolute astronomy ..., 2012).

V poskus smo vključili semena orhideje *Anguloa clowesii* Lindl., ki smo jih dobili iz naravnega rastišča Kolumbije. Pred inokulacijo semen na gojišče smo jih površinsko razkužili z dikloroizocianurno kislino z dodatkom močila. Rastline so uspevale v zelo humidnem območju, zato je bila okuženost semen s patogeni zelo močna in je bilo potrebno koncentracijo ter čas razkuževanja prilagoditi, da smo dobili aseptično kulturo.

1.1 NAMEN NALOGE

Namen naloge je bil, s tremi različnimi gojišči in koncentracijo hranil, optimizirati asimbiotsko razmnožitev tropske orhideje *Anguloa clowesii* Lindl.

1.2 CILJ NALOGE

Osnovni cilj je bil pridobiti aseptično *in vitro* kulturo semen in izzvati asimbiotsko kalitev ter rast in razvoj. Če bi se katero od uporabljenih gojišč pokazalo za uspešno, bi se lahko uporabljalo za razmnoževanje orhidej *Anguloa clowesii* Lindl.

1.3 DELOVNA HIPOTEZA

Predvidevali smo, glede na znano dejstvo, da so orhideje zelo revne glede potreb po hranilih, da bo generativno razmnoževanje tropske orhideje *Anguloa clowesii* Lindl. boljše na revnejših gojiščih oz. na gojiščih s polovično oz. četrtinsko koncentracijo hranil.

2 PREGLED OBJAV

2.1 DRUŽINA ORCHIDACEAE – KUKAVIČEVKE

Kukavičevke (Orchidaceae) so poleg trav (Poaceae) in košaric (Asteraceae) ena izmed najbolj razširjenih družin cvetnic na svetu. Družino kukavičevk sestavlja približno 750 različnih rodov z več kot 25000 opisanimi vrstami in mnogo podvrstami ter številnimi križanci, ne samo medvrstnimi, ampak tudi medrodovnimi, ki so jih vrtnarji vzgajali v okrasne namene (Arditti, 1992; Chase, 2005). Največ vrst najdemo v tropskih predelih Južne Amerike in jugovzhodne Azije. V Evropi raste okoli 300 vrst, v Sloveniji pa je bilo do sedaj najdenih 76 vrst (Ravnik, 2002).

Družina kukavičevk je razširjena po vsem svetu. Rastline uspevajo v različnih okoljih, razen v ekstremnih razmerah, kot so suhe puščave, morja in vrhovi najhladnejših gora. Največje število orhidej najdemo v tropskih in subtropskih predelih, pogoste pa so tudi v tundrah in goratih predelih ter skoraj puščavskih območjih (Rittershausen in Pilcher, 2000).

Kukavičevke so evolucijsko najmlajša in med najbolj pestrimi družinami v rastlinskem svetu, ki se še vedno aktivno razvija in povečuje (Arditti, 1992).

2.1.1 Znanstvena klasifikacija orhideje *Anguloa clowesii* Lindl.

Rod *Anguloa* sta opisala José Antonio Pavon in Hipolito Ruiz Lopez leta 1798 in pozneje so ga poimenovali v čast španskega jezikoslovca, pisatelja in etnomuzikologa Jaime de Angulo (1887-1950) (Oakeley, 1999; Absolute astronomy ..., 2012).

Kraljestvo: Plantae

Deblo: Spermatophyta

Poddeblo: Magnoliophyta

Razred: Liliopsida

Podrazred: Liliidae

Red: Asparagales

Družina: Orchidaceae

Podružina: Epidendroideae

Pleme: Maxillarieae

Podpleme: Lycastinae

Rod: *Anguloa*

Vrsta: *clowesii*

Binomsko ime: *Anguloa clowesii* Lindl. (1844)

2.1.2 Sistematika rodu *Anguloa*

Rod *Anguloa* je majhen rod, tesno povezan z rodom orhidej *Lycaste*. Sestavlja ga 9 speciesov oz. vrst in 6 varietet ter 4 naravni križanci, ki se sčasoma lahko razvijejo v različne vrste. Obstajajo še križanci, ki jih gojijo vrtnarji oz. gojitelji in se v naravi ne pojavljajo (Oakeley, 1999; Absolute astronomy ..., 2012).

- Anguloa brevilabris* (Kolumbija)
- Anguloa cliftonii* (Kolumbija)
- Anguloa cliftonii* var *alba* (Kolumbija)
- Anguloa cliftonii* var *concolor* (Kolumbija)
- Anguloa clowesii* (Kolumbija in severozahodna Venezuela)
- Anguloa clowesii* var *flava* (Kolumbija, Venezuela, Ekvador in Peru)
- Anguloa dubia* (Kolumbija)
- Anguloa eburnea* (Kolumbija in Ekvador)
- Anguloa hohenlohii* (Kolumbija in severozahodna Venezuela)
- Anguloa hohenlohii* var. *hohenlohii* (Kolumbija in severozahodna Venezuela)
- Anguloa hohenlohii* var. *macroglossa* (Kolumbija, malo primerkov v naravi)
- Anguloa tognettiae* (Kolumbija in Venezuela)
- Anguloa uniflora* (Peru)
- Anguloa virginalis* (Venezuela, Kolumbija, Ekvador, Peru and Bolivija)
- Anguloa virginalis* var *turneri* (Kolumbija)
- Anguloa x rolfei* (Kolumbija)
- Anguloa x ruckeri* (*A. clowesii* × *A. hohenlohii*) (Venezuela)
- Anguloa x speciosa* (Venezuela in Kolumbija)
- Anguloa x acostae* (Kolumbija)

Med njimi so gospodarsko najpomembnejše: *A. cliftonii*, *A. clowesii* (slika 1) in *A. hohenlohi*. Vedno bolj pa pridobivajo na pomenu še ostale vrste predvsem zaradi barvitih cvetov, ki se jih uporablja kot vir genov v namene križanj za pridobitev zanimivih križancev.

2.2 MORFOLOGIJA ORHIDEJ

Po morfologiji rasti se orhideje delijo na epifite in geofite. Epifiti rastejo v tropih po vejah in koreninskih izboklinah dreves ter po površini kamnov in skal, kamor se samo pritrdijo. Talne, geofitne oz. terestične orhideje poseljujejo zmerne podnebne pasove, so manj zahtevne kot epifitne. Predstavniki te skupine rastejo tudi v Sloveniji.

Na razrast nadzemnih delov jih delimo v dve glavni skupini, monopodialne in simpodialne (Ravnik, 2002). Pri monopodialnih je rast stranskih poganjkov podrejena glavnemu

poganjku in rastejo povešujoče navzgor. Rast je nedeterminantna in z vsakim novim listom se steblo podaljšuje (Pridgeon, 1999).

Pseudobulbule, ki so odebeljena stebila napolnjena s hranili in vodo, oblikujejo simpodialne orhideje. Pseudobulbilov je lahko več znotraj ene rastline, kar jim daje zelo bujen izgled (Kramer, 1997).

2.2.1 Značilnost rasti orhideje *Anguloa clowesii* Lindl.

V naravi raste v Venezueli, Kolumbiji, Ekvadorju in Peruju na gozdnih tleh na visoki nadmorski višini od 1800 do 2500 m, na zahodnem pobočju Andov pa vse do Llanosa (Orinoško nižavje) v severnem delu Južne Amerike, kjer je dnevna temperatura od 18 do 24 °C in nočna od 6 do 8 °C ter relativna vlaga 70 do 80% (Absolute astronomy ..., 2012).

Anguloa clowesii Lindl. je precej velika terestična, občasno tudi epifitska orhideja s 3 do 4 mesnatimi, približno 20 cm velikimi, konično hruškastimi in rahlo stisnjenimi pseudobulbusi. Ima dolge, sulicaste in pecljate liste. Odrasla rastlina je večja od 1 m. Dva do štiri listi rastejo oz. izraščajo iz baze vsakega pseudobulbusa. Na koncu rastne dobe se listi posušijo in na začetku zrastejo novi. Listi so višje kot cvetovi in to je ena od značilnosti oz. posebnosti, razen oblike cvetov te orhideje (slika 1) (Absolute astronomy ..., 2012).



Slika 1: Tropska orhideja *Anguloa clowesii* Lindl. (Vintage ..., 2012; Anguloa ..., 2008)

2.3 MORFOLOGIJA CVETA ORHIDEJ

Cvet kukavičevk je sestavljen iz šestih cvetnih listov in stebrička - združenih spolnih organov, pestiča in prašnikov. Osnova cveta pri orhidejah so trije zunanji čašni listi (sepala) in trije notranji venčni listi (petala). Čašni in venčni listi so pri orhidejah obarvani, medtem ko so pri ostalih cvetočih rastlinah čašni listi večinoma zeleni, obarvani pa so le venčni listi.

Notranji obroč cveta oz. perigon je sestavljen iz treh venčnih listov, od katerih je spodnji oz. najnižji po izgledu, obliki, velikosti in barvi drugačen od ostalih. Imenuje se medena ustna – labellum, ki je pri nekaterih vrstah podaljšana v ostrogo. V njej se nahajajo nektarne žleze, ki privlačijo žuželke k oprашevanju. Ostala dva cvetna lista sta običajno nameščena drug čez drugega.

Spolni organi (prašniki in pestič) so pri orhidejah shranjeni v posebni podolgovati strukturi imenovani stebriček. Prašniki so sestavljeni iz prašnične niti (filament) z lepljivim diskom (viscidij) in pelodnih zrn, ki so pri večini kukavičevk združeni v voskaste kepice, imenovane poliniji. Ležijo pod prašnično kapico na vrhu stebrička, nameščeni v organu, ki ga imenujemo klinandrij. Ženski spolni organ, imenovan brazda (stigma), je od moškega spolnega organa ločen s tkivom imenovanim rostelum (Kramer, 1997).

2.3.1 Značilnosti cvetov orhideje *Anguloa clowesii* Lindl.

Značilnost rodu *Anguloa* je oblika rasti, predvsem oblika cvetov, ki so po izgledu podobni cvetu tulipana, po sestavi cvetnih delov pa cvetu orhidej. Čašni listi imajo balonasto obliko, ki spominja na cvet tulipana (slika 1). Medena ustna je iz treh delov. Stebriček oz. prašnik vsebuje 4 polinije (Absolute astronomy ..., 2012).

Cvetovi so dišeči z močnim vonjem po cimetu. So voskastega videza, široki 8 cm in pri prostoživečih vrstah so pojavljata dve barvi svetlo zelena in bela ter rumena do rdeča. Posamezni cvet izraste iz osnove vsakega novega pseudobulbusa. Bela oz. svetle vrste imajo lahko po šest cvetov na pseudobulbus, ostale tudi več kot 12 (Absolute astronomy ..., 2012).

2.4 NAČINI OPRAŠEVANJA ORHIDEJ

Spolno razmnoževanje je odvisno od oprashitve in oploditve. Oprashitev je prenos cvetnega prahu iz prašnika na brazdo pestiča (Moore in sod., 1998). Za uspešno oprashitev je potreben dozorel in odprt cvet, zato se oprashitve večinoma dogajajo v dopoldanskem času, ko se cvet popolnoma odpre.

Večina orhidej je tujeprašnih oz. alogamnih, lahko so tudi samoprašne oz. avtogamne in kleistogamne ter apogamne. Alogamne orhideje se navzkrižno oprashauejo med različnimi rastlinami (Petauer, 1998). Oprašujejo jih večinoma žuželke. Žuželka, ko hoče priti do nektarja v ostrogi, se usede na medeno ustno (labellum) in z glavo ali trupom zadene ob lepljivo ploščico polinarija. Ta se prilepi nanjo in žuželka ga odnese na drugi cvet, kjer z glavo, na kateri nosi prilepljen polinarij, zadene ob lepljivo brazdo. Polinarij s poliniji se prilepi na brazdo in cvet je oprashaen. Avtogamne orhideje se oprashauejo same oz. znotraj istega cveta, kjer se kavdikula upogne in polinarij s poliniji se prilepi na brazdo znotraj istega cveta. Kleistogamna oprashaitev se zgodi še preden se cvet odpre. V obeh primerih gre za samooprašitev. Pri apogamnih pa se seme oz. semenska glavica razvije brez oprashaitev oz. oploditve.

Poleg naravnega oprashaevanja poznamo še umetno oprashaevanje, ki ga opravi človek na prostem ali v zaprtem prostoru. Prednost le tega je, da ga lahko opravimo kadarkoli podnevi ali ponoči. Umetno oprashaevanje poteka tako, da najprej odberemo »starševski rastlini«. Ena bo tvorila semensko glavico s semeni, druga pa bo prispevala oz. bo donor peloda, ki bo omogočil oploditev. Bistvo umetne oploditve je, da polinij namestimo na brazdo pestiča in da se po oploditvi razvije semenska glavica. Če oprashaujemo rastline z različno velikostjo cvetov izberemo za ženske rastline tiste z manjšimi cvetovi in za moške rastline tiste z večjimi cvetovi. Te imajo tudi večji pelod in oblikujejo daljšo pelodno cev, ki zanesljivo prodre do jajčne celice.

2.5 OPLODITEV IN RAZVOJ SEMENA ORHIDEJ

Oploditev se začne, ko pelodno zrno na brazdi pestiča začne kaliti in se konča ko pelodna cev s spermalnima celicama doseže plodnico in se spolni celici združita ter tvorita zigoto (Moore in sod., 1998). Pri orhidejah se ena spermalna celica, tako kot pri vseh ostalih cvetnicah, združi z jajčno celico in nastane kalček. Druga spermalna celica degenerira in se ne more združi s polarnim jedrom oz. sekundarnimi jedri, kar ima za posledico preprečitev nastanka sekundarnega endosperma (Arditti, 1992). Zrelo seme pri večini orhidej je sestavljeno iz kalčka in teste ter z veliko praznega prostora, ki je izpolnjen z zrakom (Pridgeon, 1999). Pri večini orhidej pride do ploditve 50 do 80 dni po oprashaitvi, delitev zigote pa šele 2 do 30 dni za tem. Prva delitev celic je pri večini orhidej transversalna in rezultat te delitve so bazalne in terminalne celice. Po tej delitvi se kalček razdeli na vrhnji del iz katerega se razvije poganjek in bazalni del iz katerega se razvije korenina (Arditti, 1992).

Pri večini orhidej ima zrelo seme kalček z nediferenciranim tkivom, pred in med kalitvijo se celice diferencirajo in so različnih velikosti, kar je odvisno od njihove lokacije. Celice, ki sestavljajo meristemski del so manjše v premeru 8 do 10 μm , ostale so večje. Celice vsebujejo hranila v obliki lipidov in beljakovinskih telesc, škroba je zelo malo ali ga sploh

ni (Arditti, 1992) razen 10 vrst, ki vsebujejo nekaj endospermalnih celic (Plant ..., 2000), kar pa ni dovolj za kalitev.

Semena orhidej so dolga od 0,05 do 6,0 mm in široka od 0,01 do 0,9 mm ter masa semen niha med 0,31 in 24 µg. Kalček pred poškodbami varuje semenska ovojnica ali testa, ki ima veliko večji volumen kot kalček. Testa je vodoodporna in notranjost semena je izpolnjena z zrakom in zaradi tega je lahko dolgo na površini vode, kar mu omogoča premikanje z vodo po vejah in deblih dreves ter rekah in verjetno tudi morjih.

2.6 POMEN MIKORIZE ZA KALITEV ORHIDEJ

2.6.1 *In vivo* kalitev

Semena orhidej so zelo majhna, brez sekundarnega endosperma, samo 10 vrst vsebuje nekaj celic endosperma, kar pa ni dovolj za uspešno kalitev (Plant ..., 2000). Zato so za kalitev in razvoj potrebne simbiotske glive. Pomembno je, da se simbioza vzpostavi zelo hitro ko seme začne nabrekati, preden protokormi ozelenijo (Sinkovič, 2000).

Mikoriza je sožitje ali simbioza med rastlinskimi koreninami in glivo. To je povezano življenje dveh organizmov različnih vrst, pri katerem imata oba organizma korist, ki je lahko začasna ali pa poteka brez prekinitve. Mikorizne glive tvorijo v tleh omrežje nitastih hif, ki tvorijo micelij. Znana sta dva tipa mikorize: ektotrofna in endotrofna. Pri ektotrofni mikorizi se hife gliv naselijo na površini korenin. Pri endomikorizi pa hife gliv prodrejo v rastlino. Endomikoriza je posebej pogosta pri tropskih rastlinah, kjer gliva učinkovito črpa fosfor in druge minerale iz sicer zelo revnega okolja, ki višjim rastlinam brez glive niso dostopni (Sinkovič, 2000).

Mikoriza je najbolj razvita na negojenih tleh. Korenine, ki jih naselijo glive so brez koreninskih laskov, ker njihovo funkcijo, sprejema vode in mineralne prehrane iz tal prevzamejo glive. Poveča se sprejem fosforja in dušika. Pri mikorizi imata oba, tako rastlina kot gliva, koristi. Mikorizne glive dajejo rastlinam predvsem mineralna hranila in vodo, same pa črpajo iz korenin ogljikove hidrate in druge organske spojine. Med njima nastopa tudi hormonska izmenjava. Gliva sintetizira predvsem citokinine, ki vplivajo na nastanek korenin, korenine rastlin pa izločajo citokinine in avksine, ki pospešujejo razvoj micelija in sprejem ionov (Sinkovič, 2000).

2.6.2 *In vitro* kalitev

Seme vzkali 7 do 235 dni po tem, ko ga inokuliramo na gojišče s sladkorjem. Celice terminalnega dela se začno hitro deliti in tvorijo meristem. Lipidna telesca postanejo redkejša in se začno združevati. Po nekaj dneh, ko se izčrpajo, se iz njih razvijejo vakuole. Celice pod meristemom se ne delijo, ampak se le povečajo. Zato je embrij sprva hruškaste

oblike, nato pa postane okroglast. V tej fazi embrij zapusti semensko ovojnico ali testo. Imenujemo ga protokorm. Iz njega poženejo številni lasasti rizoidi, ki so najprej enocelični in nato večcelični. Nekaj celic na zgornji strani tvori zametke primordialnega lista. Prokambijsko tkivo v tej fazi poveže protokorm in formirajoči list (po 50–60 dneh). Prvi list predstavlja ovoj mlade rastline. Kmalu zatem nasproti prvemu požene drugi list. Prva korenina se tvori znotraj protokorma in ga predre na spodnji, bazalni strani. Od ostalih rastlin se semena orhidej ločijo po tem, da nimajo endosperma in imajo v splošnem zelo občutljivo strukturo. Razen nekaj škrobnih zrn semena orhidej ne vsebujejo zaloge ogljikovih hidratov. V naravi semena orhidej kalijo le, če jih okužijo mikorizne glive iz rodu *Rhizoctonia*, *Tulasnella*, *Ceratobasidium*. V laboratorijih pa kalijo relativno dobro na specifičnih gojiščih (Arditti, 1992).

2.7 STERILIZACIJA SEMEN

Tako kot vse ostale dele, ki se jih uporabi kot izsečke se tudi semena pred inokulacijo na gojišče razkuži. Uspešno razkuževanje je prva faza, od katere je odvisen nadaljnji potek *in vitro* gojenja. Pri rokovanju zahtevajo semena orhidej, zaradi svoje majhnosti, prilagojene postopke dela tudi pri razkuževanju. Semena so za vodo obdana z nepropustno testo in zaradi tega se pri razkuževanju z različnimi kemičnimi sredstvi notranjost, kalček običajno ne poškoduje. Za sterilizacijo se največkrat uporablja raztopina kalcijevega hipoklorita, ki je kemično nestabilna raztopina ter raztopini natrijevega hipoklorita in vodikovega peroksida (Hicks, 2000). V našem primeru smo uporabili dikloroizocianurno kislino natrijeve soli in postopek razkuževanja kot ga navaja že Jevšnik (2002).

2.8 SESTAVA GOJIŠČ

Gojišča za kalitev in rast orhidej v tkivnih kulturah so navadno sestavljena iz makrohranil, mikrohranil, ogljikovih hidratov, organskih snovi in vitaminov ter strjevalca.

2.8.1 Makrohranila

Rastlina oz. izsečki potrebujejo makrohranila v večjih količinah. To so dušik, fosfor, kalij, kalcij, magnezij in žveplo (Thompson, 1996). Pri gojenju orhidej se dušik uporablja v amonijski (NH_4^+), nitratni (NO_3^-) in organski obliki (aminokislina, urea in njene sestavine). Rastlini je bolj dostopna nitratna oblika, vendar šele ko dosežejo neko stopnjo razvoja, v kateri začno delovati encimi (nitratne reduktaze). Pri kalitvi je zato priporočljivo dodati tudi amonijsko obliko.

2.8.2 Mikrohranila

Mikrohranila so potrebna v zelo majhnih količinah oz. koncentracijah. Za normalno kalitev ter rast so ne obhodno potrebna. K mikroelementom spadajo mangan, baker, cink, bor in molibden ter železo (Thompson, 1996).

2.8.3 Ogljikovi hidrati

Ogljikovi hidrati (sladkorji) predstavljajo vir ogljika in energije za kalitev in razvijajoče rastline. Kot ogljikov hidrat se najpogosteje uporablja saharoza, ki delno med avtoklaviranjem razpade na glukozo in fruktozo zlasti v kislih raztopinah. Fruktoza je boljši sladkor, saj zagotavlja boljšo rast in razvoj korenin in listov (Hicks, 2000).

2.8.4 Organske snovi in vitamini

Med organske snovi in vitamine, ki se dodajajo v gojišča za kalitev in rast orhidej štejemo inozitol, pepton, bananin prašek, oglje, MES, piridoksin, tiamin, nikotinsko kislino, α -naftalen očetno kislino in 6-benzil aminopurin.

Inozitol po učinku uvrščamo med vitamine. Po strukturni formuli je podoben pentozam. Pospešuje izgradnjo celične stene in tako rast rastlin na gojišču.

Piridoksin, tiamin in nikotinska kislina so vitamini. Termično vitamini niso stabilni in se pri segrevanju razgradijo. Tiamin in nikotinska kislina spodbujata rast mlade rastline (Hicks, 2000).

Med organske snovi uvrščamo tudi rastlinske hormone ali rastne regulatorje. Rastlinske rastne substance so najpomembnejša skupina snovi, ki je omogočila celoten razvoj metod tkivnih kultur. Poznamo več skupin rastlinskih hormonov. Za tehnike tkivnih kultur sta najpomembnejši skupini avksinov in citokininov. Obstajajo poročila, kjer majhne koncentracije avksinov in citokininov spodbujajo kalitev in rast mladih rastlin, vendar hormonov v večino kalitvenih gojišč ni potrebno dodajati (Bohanec, 1992).

Avksini (v našem primeru α -naftalen očetna kislina) so pomembni za indukcijo celičnih delitev, povečanje celic in koreninjenje. Pogosto se uporabljajo v kombinaciji s citokinini. Citokinini pospešujejo delitev celic in nastanek kalusa, poganjkov ter zavirajo nastanek adventivnih korenin.

Dodatek gojišču je tudi oglje, ki ima velike adsorpcijske sposobnosti. Nase veže odpadne snovi, predvsem polifenole, ki jih v gojišče izloča rastlina (Arditti in Krikorian, 1996). Orhideje so znane, da izločajo veliko izločkov, ki lahko toksično vplivajo na rast in razvoj.

Oglje v kombinaciji z dodatkom banane pomembno vpliva na povečanje rasti korenin in poganjkov (Hicks, 2000). Kot dodatek se lahko uporablja tudi banana, ki je dobrodošla sestavina in je prisotna v že pripravljenih gojiščih posameznih dobaviteljev. Uporablja se za rast rastlin. Dodaja se lahko kot sveža ali posušena v obliki bananinega praška.

2.8.5 Strjevalci gojišč

Poznamo 3 različne strjevalce gojišč, agar, agarozo in Gellun gum. Gellun gum je izvleček posebnega seva bakterij in je sestavljen iz glukuronske kisline, ramnoze in glukoze. Občutljiv je na pH gojišča, pri zvečani kislosti se postopno utekočini. V vodi se ne strjuje, za strjevanje potrebuje določeno koncentracijo soli (Bohanec, 1992).

2.8.6 pH vrednost gojišča

Optimalen pH za rast in razvoj večine vrst je med 5,0 in 6,5. V tem območju naj bi bile dodane organske snovi najboljše dostopne rastlinskim celicam, kar velja zlasti za dostopnost nitratnega in amonijskega dušika. Na pH vpliva tudi prisotnost aktivnega rastlinskega oglja in bananinega ekstrakta. Raziskave so pokazale, da ima aktivno oglje majhno sposobnost stabilizacije pH gojišča, bananin ekstrakt pa visoko. V velikih primerih je kontrola gojišča pokazala, da je pH padel s 5,2 na 4,6. Če ne bi bilo v gojišču prisotnega bananinega ekstrakta in MES (2-(N-morfolin) etansulfonska kislina) pufra, bi pH padel pod 3, kar bi slabo vplivalo na rast in razvoj rastline (Hinnen in sod., 1989).

2.9 RAZVOJ SEJANCEV

Sejanci se pri orhidejah *in vitro* razvijajo od 50 do 724 dni in vegetativni del razvoja poteka še 4,2 do 31,5 mesecev, odvisno od vrste. Po tem obdobju jih aklimatiziramo in prestavimo v avtotrofne razmere. Nekateri sejanci prvič zacvetijo že po enem letu, nekatere vrste tudi po enajstih letih (Arditti, 1992). Eden večjih problemov po pridobitvi uspešnega potomca po križanju je običajno dolgo obdobje, ko prvič zacveti, da se spremlja še zadnjo morfološko fazo, ki je pri okrasnih rastlinah ena najpomembnejših (Duan in Yazawa, 1995).

3 MATERIALI IN METODE

Asimbiotsko v *in vitro* razmerah smo generativno razmnožili tropsko orhidejo *Anguloa clowesii* Lindl.

3.1 SEMENSKI MATERIAL

V poskus smo vključili semena orhideje *Anguloa clowesii* Lindl. (slika 2), ki raste na prostem v Kolumbiji. Zrela semena so bila nabrana leta 2008 in spomladi 2009 smo jih inokulirali na gojišča.



Slika 2: Semena tropske orhideje *Anguloa clowesii* Lindl.

3.2 SESTAVA IN PRIPRAVA GOJIŠČ

Vsa tri gojišča so bila od proizvajalca Sigma-Aldrich. Gojišče P 6793 smo označili s črko A, gojišče P 6668 s črko B in gojišče P 1056 s črko C. Količina makro- in mikroelementov, saharoze, inozitola, peptona, 2-(N-morfolin) etansulfonske kisline (MES), strjevalca Gellun gum in pH vrednost so bili enaki pri vseh gojiščih.

Gojišča so se razlikovala v bananinem prašku 30 g/l, ki je bil v obliki 50 % maltodekstrina dodan samo gojišču C, oglju 2 g/l, dodan v gojišči B in C, hormonu α -naftalen očetni kislini 0,5 mg/l in 6-benzil maninopurinu 2 mg/l dodana samo gojišču A.

Vitamini piridoksin, tiamin in nikotinska kislina so bili dodani v gojišče A v koncentraciji 0,5, 1 in 0,5 mg/l, medtem ko v gojišče B in C v koncentraciji 1, 10 in 1 mg/l.

Gojišča so vsebovala dušik v nitratni obliki (amonijev nitrat in kalijev nitrat). Fosfor in magnezij sta bila prisotna v vseh gojiščih, fosfor v obliki kalijevega hidrogen fosfata, magnezij pa v obliki magnezijevega sulfata (preglednica 1).

Preglednica 1: Sestava A, B in C gojišč za kalitev, rast in razvoj tropske orhideje *Anguloa clowesii* Lindl.

Sestavine	Gojišča		
	A (P 6793)	B (P 6668)	C (P 1056)
MAKROELEMENTI			
KH ₂ PO ₄	85	85	85
NH ₄ NO ₃	825	825	825
KNO ₃	950	950	950
CaCl ₂	166	166	166
MgSO ₄ × 7H ₂ O	90,35	90,35	90,35
MIKROELEMENTI			
H ₃ BO ₄	3,1	3,1	3,1
ZnSO ₄ × 7H ₂ O	5,3	5,3	5,3
MnSO ₄ × H ₂ O	8,45	8,45	8,45
KJ	0,415	0,415	0,415
CuSO ₄ × 5H ₂ O	0,0125	0,0125	0,0125
CoCl ₂ × 6H ₂ O	0,0125	0,0125	0,0125
Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O	0,125	0,125	0,125
FeSO ₄ × 7H ₂ O	27,85	27,85	27,85
Na ₂ Fe - EDTA	37,3	37,3	37,3
OGLJIKOVI HIDRATI			
Saharoza	20,000	20,000	20,000
ORGANSKE SNOVI IN VITAMINI			
Inozitol	100	100	100
Pepton	2000	2000	2000
Bananin prašek, 50% maltodekstrin	-	-	30,000
Oglje	-	2000	2000
MES	1000	1000	1000
Piridoksin – HCl	0,5	1	1
Tiamin – HCl	1	10	10
Nikotinska kislina	0,5	1	1
α-naftalen ocetna kislina (NAA)	0,5	-	-
6-benzil aminopurin (BAP)	2	-	-
STRJEVALEC (g/l) IN pH VREDNOST			
Gellun gum	2,6	2,6	2,6
pH	5,4	5,4	5,4

Komercialna gojišča A, B in C smo pripravili tako, da smo natehtali polno, polovično in četrtinsko koncentracijo vseh treh gojišč, pretresli v čaše ter prelili z bidestilirano vodo. Gojišča smo raztopili z mešanjem s teflonskim magnetom na električnem mešalniku. Z bučko smo določili volumen gojišč. S pH metrom smo uravnali pH vrednost gojišč z 1N KOH oz. 1N HCl. Optimalen pH je bil 5,4. Pred avtoklaviranjem smo dodali še strjevalec Gellun gum. Gojišče smo avtoklavirali 20 minut pri 121 °C in tlaku 1,1 bar. Avtoklavirano gojišče smo v brezprašni komori prelili v petrijevke in pustili, da se je gojišče strdilo.

3.3 RAZKUŽEVANJE IN INOKULACIJA SEMEN NA GOJIŠČE

Semena smo površinsko razkužili in inokulirali 12. 03. 2009 na komercialna gojišča, proizvajalca Sigma-Aldrich P-6793 z delovno oznako A, P-6668 z oznako B in P-1056 z oznako C, s polno, polovično in četrtinsko koncentracijo hranil (preglednica 1).

Semena smo razkužili z 1,6 % dikloroizocianurno kislino proizvajalca Sigma-Aldrich, ki je vsebovala močilo Tween 20 (Sigma-Aldrich). Seme v mikrocentrifugirki smo prelili z 0,8 ml razkuževalne tekočine in 8 minut razkuževali pri sobni temperaturi, nato pa še 2 minuti v centrifugi (Beckman J2-HS) pri 5000 obratih/min (1900 x g) in temperaturi 4 °C. Po končanem razkuževanju smo odpipetirali razkuževalno tekočino in dodali 0,8 ml avtoklavirane bidestilirane vode. Postopek centrifugiranja in spiranja smo ponovili štirikrat. Sema smo po eni uri z mikropipeto prenesli na gojišče in ga s sterilno ukrivljeno stekleno palčko porazdelili po gojišču (Jevšnik, 2002). Seme smo inokulirali na vsa tri gojišča s polno, polovično in četrtinsko koncentracijo hranil. Za vsako obravnavanje smo semena inokulirali na gojišče 8 petrijevk oz. pripravili 8 ponovitev. Skupno je bilo v poskusu 72 petrijevk, velikosti 90 x 15 mm.

Vse postopke dela, tako razkuževanje kot inokulacijo smo opravili v brezprašni komori. Orodje: pincete, skalpele in steklene palčke smo sterilizirali s suho sterilizacijo v visokotemperaturnem grelcu pri 815 °C, ki je v brezprašni komori.

3.4 KALITEV IN GOJENJE RASTLIN

Kalitev in gojenje je potekalo v rastni komori pri 16/8 urni fotoperiodi (16 ur svetlo, 8 ur tema) in osvetlitvi $40 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ter temperaturi 23 °C.

3.5 BONITIRANJE

Po inokulaciji semen na gojišča smo vsak teden s stereomikroskopom pri 20 kratni povečavi spremljali kalitev in razvoj semen ter začetne faze rasti.

V obdobju poskusa smo opravili 13 bonitiranj. Prvo bonitiranje smo opravili 7 dni po inokulaciji semen na gojišče, nato 14, 21, 28, 34, 41, 55, 63, 77, 91, 103, 131 in 155 dni po inokulaciji.

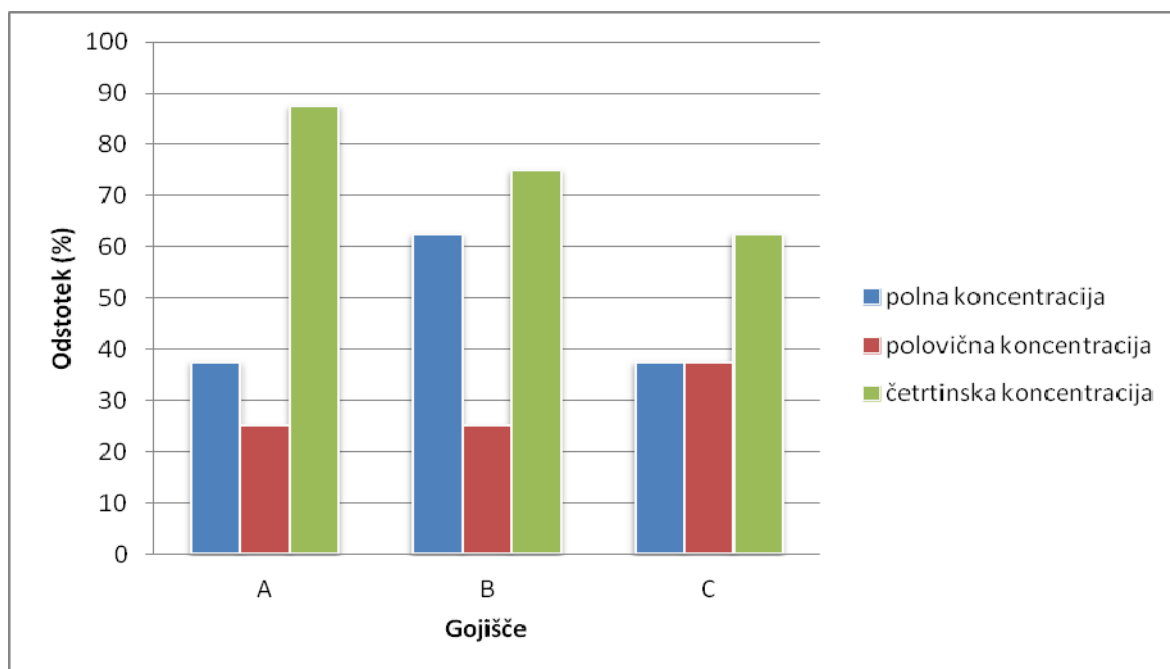
77 dni po inokulaciji semen na gojišča smo prešteli število še kaljivih in nekaljivih semen ter ocenili prisotnost protokormov in rizoidov. Štetje in ocenitev smo opravili s stereomikroskopom pri 10 kratni povečavi, na naključno označeni površini 1 cm².

4 REZULTATI

4.1 RAZKUŽEVANJE SEMEN

Preglednica 2: petrijevk z okuženimi semeni orhideje *Anguloa clowesii* Lindl. na A, B in C gojiščih

Št. dni po inokulaciji	Gojišče									Skupaj
	A	½A	¼A	B	½B	¼B	C	½C	¼C	
7	2	2	5	5	2	3	3	3	2	27
14			1			2			1	4
21			1					1	1	3
28						1				1
34									1	1
41										
55									1	1
Skupaj	2	2	7	5	2	6	3	4	6	37



Slika 3: Odstotek petrijevk z okuženimi semeni orhideje *Anguloa clowesii* Lindl. 55 dni po inokulaciji na A, B in C gojiščih

Okužba se je pojavljala do 55 dne po inokulaciji. Iz preglednice 2 je razvidno, da je bilo 37 petrijevk z okuženimi semeni, kar pomeni, da je bila dobra polovica 51,4 % izločenih. Od tega je bilo največ 27 oz. 37,5 % petrijevk s semeni izločenih 7 dni po inokulaciji. V naslednjih obdobjih bonitiranja se je odstotek okužbe zmanjšal. 14 dni po inokulaciji je

bilo izločenih 5,5 % petrijevk z okuženimi semeni in 21 dni po inokulaciji je bilo izločenih 4,2 % petrijevk z okuženimi semeni ter 28 dni po inokulaciji samo 1,4 %, prav tako je bil odstotek petrijevk z okuženimi semeni enak 34 in 55 dni po inokulaciji (preglednica 2, slika 3).

4.2 VPLIV GOJIŠČA NA GENERATIVNO RAZMNOŽEVANJE

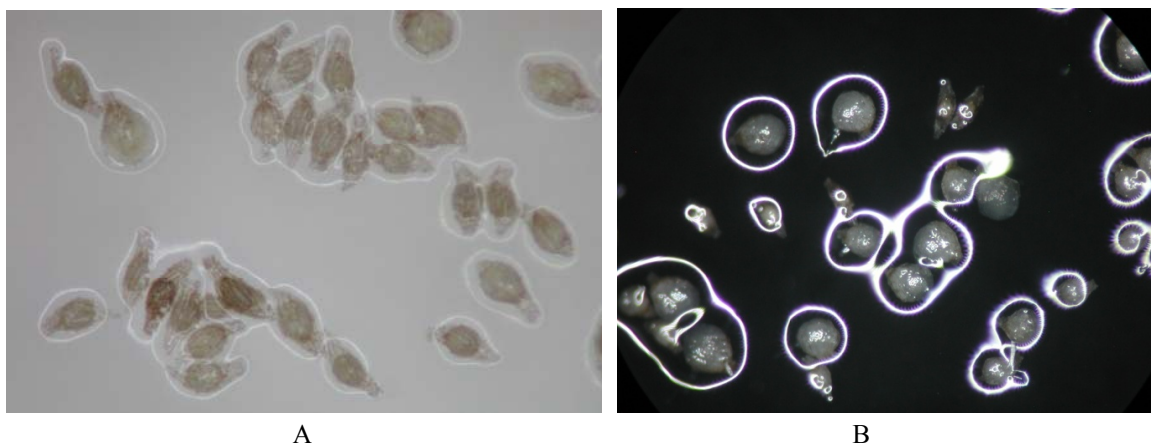
V obdobju 14 kratnega spremljanja v razmaku enega tedna smo opazovali in sledili naslednjim spremembam na semenu oz. morfološkim fazam: nekaljivo seme (NS) in kaljivo seme (KS), protokorm (P), rizoid (R) in list (L).

4.2.1 7 dni po inokulaciji semen na gojišču

Ne glede na gojišče, 7 dni po inokulaciji, na semenih ni bilo vidnih sprememb.

4.2.2 14 dni po inokulaciji semen

14 dni po inokulaciji, so semena oz. kalčki na vseh gojiščih nabrekli. Začeli so se pojavljati protokormi – okrogle strukture značilne za kalitev orhidej (slika 4). To smo šteli kot začetek kalitve. V tem obdobju ni bilo bistvenih razlik v kalitvi in razvoju na gojiščih, razen oblike protokormov. Na gojišču A so bili protokormi bolj podolgovati, elipsasti (slika 4A), medtem ko so bili na gojiščih B in C bolj okrogli (slika 4B in C).

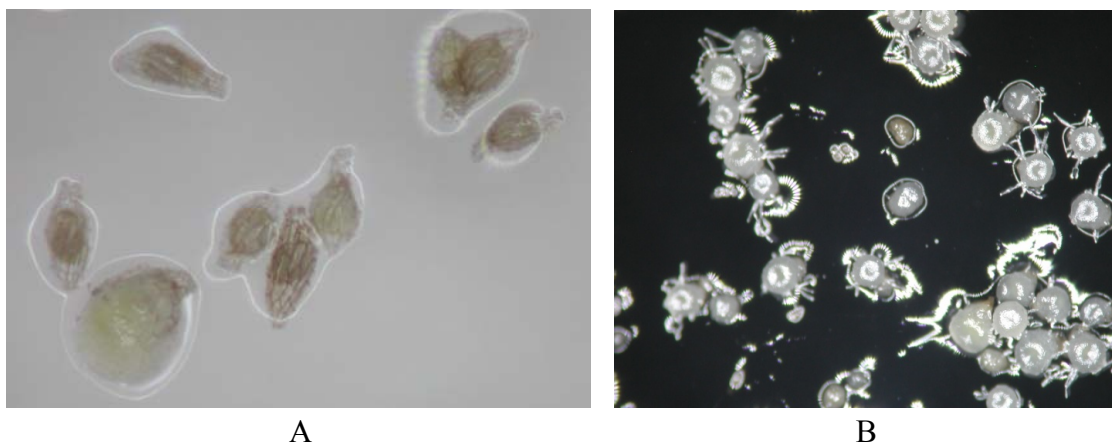


Slika 4: Nabrekli kalčki oz. kaljiva semena ter pojav protokormov 14 dni po inokulaciji semen orhideje *Anguloa clowesii* Lindl.: A – gojišče A; B – gojišče B in C z ogljem

4.2.3 21 dni po inokulaciji semen

21 dni po inokulaciji, so semena še bolj nabrekli in se povečala ter protokormi so pri večini semen zapustili testo in začeli zeleneti, v primerjavi pred enim tednom. Ta faza

kalitve se pri orhidejah imenuje protokorm. Na gojišču B so se pojavili že prvi rizoidi, faza rizoidov (slika 5B), medtem ko jih na gojišču A v tem obdobju še ni bilo (slika 5A). Tudi v tem obdobju ni bilo bistvenih razlik v kalitvi med gojišči, razen v morfoloških fazah, saj so se na gojišču B pojavili že rizoidi, ki jih na gojišču A in C, ne glede na koncentracijo hranil, še ni bilo.



Slika 5: Kaljiva semena s povečanimi in ozelenelimi protokormi ter posameznimi rizoidi 21 dni po inokulaciji semen orhideje *Anguloa clowesii* Lindl.: A – gojišče A; B – gojišče B z ogljem

4.2.4 28 dni po inokulaciji semen

28 dni po inokulaciji, so na gojiščih A in C semena še bolj nabrekli oz. se povečala, medtem ko so bila na gojišču B že veliko večja in z več rizoidi, v primerjavi pred enim tednom.

4.2.5 36 dni po inokulaciji semen

36 dni po inokulaciji na gojiščih v razvoju semen ni bilo sprememb, v primerjavi pred enim tednom.

4.2.6 41 dni po inokulaciji semen

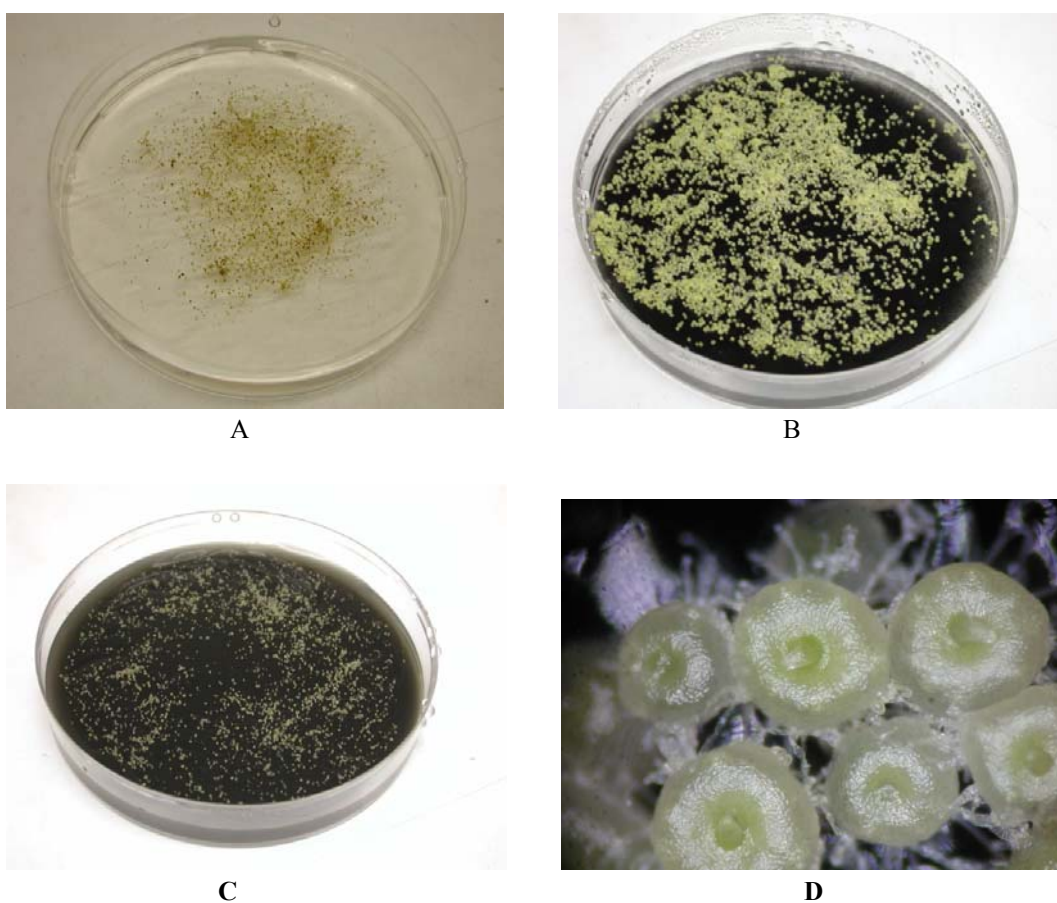
41 dni po inokulaciji so bile opazne razlike v velikosti protokormov in številu rizoidov med gojišči. Na gojišču B so bila semena oz. protokormi nekoliko večji in z več rizoidi kot na gojiščih A in C.

4.2.7 55 dni po inokulaciji semen

55 dni po inokulaciji v razvoju semen med gojišči ni bilo sprememb, v primerjavi pred enim tednom.

4.2.8 63 dni po inokulaciji semen

63 dni po inokulaciji semen je prišlo do velikih sprememb v rasti in razvoju. Protokormi so se bistveno povečali, vidni si bili tudi s prostim očesom (slika 6). Nastali so številni podaljšani rizoidi, pojavili so se tudi prvi zametki za liste (slika 6D). Zelo velika razlika v morfoloških fazah je bila tudi med gojišči. Protokormi so najbolje uspevali na gojiščih B in $\frac{1}{2}B$ (slika 6B), na ostalih malo slabše (slika 6A in C), zametki za liste pa so bili vidni na vseh gojiščih z različno koncentracijo hranil, največji so bili na gojišču $\frac{1}{2}B$ (slika 6D). Na gojišču A so protokormi zaostajali v rasti in začele so se pojavljati nekroze oz. odmiranje protokormov, predvsem na gojišču A (slika 6A).



Slika 6: Razvoj protokormov z rizoidi in pojav prvih listov 63 dni po inokulaciji semen orhideje *Anguloa clowesii* Lindl. na gojišča s celotno koncentracijo hranil: A – gojišče A; B – gojišče B; C – gojišče C; D – protokormi z listi na gojišču $\frac{1}{2}B$

4.2.9 77 dni po inokulaciji semen

77 dni po inokulaciji semen na gojišča smo prešteli še kaljiva in nekaljiva semena ter ocenili prisotnost protokormov in rizoidov. Štetje in ocenitev smo opravili s stereomikroskopom pri 10 kratni povečavi, na označeni površini 1 cm².

Preglednica 3: Število še kaljivih in nekaljivih semen ter ocenitev protokormov in rizoidov 77 dni po inokulaciji semen orhideje *Anguloa clowesii* Lindl. na gojišče A

Oznaka petrijevk	Gojišče											
	A				$\frac{1}{2}A$				$\frac{1}{4}A$			
	KS	NS	P	R	KS	NS	P	R	KS	NS	P	R
1	13	42	++		10	28	+	+	5	22	+	+
2	12	46	++		19	48	++	+				
3	9	16	+		28	63	+++	+				
4	7	26	+		19	47	++	+				
5	14	63	++		17	18	++	+				
6	10	28	+		9	25	+	+				

LEGENDA:

KS – kaljivo seme, NS – nekaljivo seme, P – protokormi, R – rizoidi

+ - malo, ++ - srednje, +++ - veliko

Najboljše med gojišči A, 77 dni po inokulaciji, je bilo gojišče $\frac{1}{2}A$ na katerem je ostalo najmanj 66,2 % nekaljivih semen in tudi glede ocene protokormov in rizoidov je bilo boljše od stalih dveh. Sledilo je gojišče A s 77,3 % še nekaljivih semen, nekoliko je zaostajalo po oceni protokormov, medtem ko rizoidov še ni bilo. Najslabše s samo eno petrijevko je bilo gojišče $\frac{1}{4}A$, na katerem je ostalo še 81,5 % nekaljivih semen in ocena prisotnosti protokormov in rizoidov je bila nizka (preglednica 3, slika 7). Nadaljeval se je zaostanek v rasti in odmiranje protokormov.

Preglednica 4: Število še kaljivih in nekaljivih semen ter ocenitev protokormov in rizoidov 77 dni po inokulaciji semen orhideje *Anguloa clowesii* Lindl. na gojišče B

Oznaka petrijevk	Gojišče											
	B				$\frac{1}{2}B$				$\frac{1}{4}B$			
	KS	NS	P	R	KS	NS	P	R	KS	NS	P	R
1	31	1	+++	+++	36	3	+++	+++	27	2	+++	+++
2	55	2	+++	+++	28	0	+++	+++	31	1	+++	+++
3	21	1	+++	+++	46	0	+++	+++				
4					48	2	+++	+++				
5					38	0	+++	+++				
6					0	49	+++	+++				

LEGENDA:

KS – kaljivo seme, NS – nekaljivo seme, P – protokormi, R – rizoidi

+ - malo, ++ - srednje, +++ - veliko

Med gojišči B je ostalo, 77 dni po inokulaciji, največ 21,6 % nekaljivih semen na gojišču $\frac{1}{2}B$, medtem ko na gojišču $\frac{1}{4}B$ 4,9 % in na gojišču B samo 3,7 %. Glede kaljivosti je bilo najboljše gojišče B s polno koncentracijo hranil, na katerem je kalilo kar 96,3 % semen. Ocena protokormov in rizoidov je bila zelo visoka in izenačena na gojišču B, ne glede na koncentracijo hranil (preglednica 4, slika 7).

Preglednica 5: Število še kaljivih in nekaljivih semen ter ocenitev protokormov in rizoidov 77 dni po inokulaciji semen orhideje *Anguloa clowesii* Lindl. na gojišče C

Oznaka petrijevk	Gojišče											
	C				$\frac{1}{2}C$				$\frac{1}{4}C$			
	KS	NS	P	R	KS	NS	P	R	KS	NS	P	R
1	105	13	+++	++	62	2	+++	++	25	2	++	++
2	30	8	+++	++	31	3	+++	++	16	8	++	++
3	51	9	+++	++	37	11	+++	++				
4	36	7	+++	++	86	8	+++	++				
5	26	5	+++	++								
6												

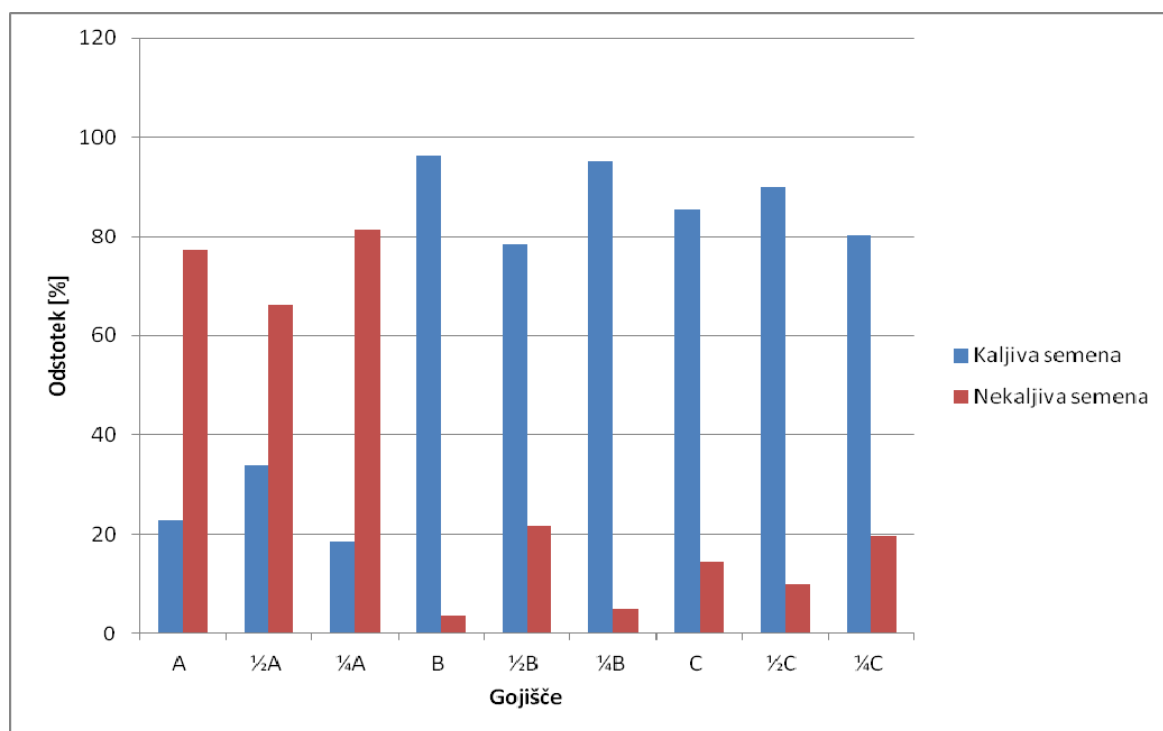
LEGENDA:

KS – kaljivo seme, NS – nekaljivo seme, P – protokormi, R – rizoidi

+ - malo, ++ - srednje, +++ - veliko

Najboljše med gojišči C je bilo gojišče $\frac{1}{2}C$ s še 10 % nekaljivih semen, sledilo je gojišče C s 14,5 % nekaljivih semen in najslabše z 19,6 % nekaljivih semen je bilo gojišče $\frac{1}{4}C$. Gojišči C in $\frac{1}{2}C$ sta imeli visoko oceno prisotnosti protokormov in srednjo oceno prisotnosti rizoidov, medtem ko je gojišče $\frac{1}{4}C$ imelo srednjo oceno prisotnosti protokormov in rizoidov, 77 dni po inokulaciji (preglednica 5 in slika 7).

Glede kaljivosti je bilo najboljše gojišče B s polno koncentracijo hranil, saj je 77 dni po inokulaciji kalilo kar 96,3 % semen, sledilo je gojišče $\frac{1}{4}B$ s 95,1 % kaljivih semen, gojišče $\frac{1}{2}C$ z 90 %, gojišče C s 85,5 %, gojišče $\frac{1}{4}C$ z 80,5 % in gojišče $\frac{1}{2}B$ z 78,4 % kaljivih semen (slika 7). Gojišče B je bilo najboljše med vsemi uporabljenimi gojišči tudi po morfoloških fazah, saj je bilo v tem obdobju ne glede na koncentracijo hranil prisotnih veliko protokormov z veliko rizoidi (oznaka +++). Podobno je bilo na gojišču C in $\frac{1}{2}C$ s prisotnostjo protokor, saj je bilo veliko protokormov s srednje gostimi rizoidi (oznaka ++) ter na gojišču $\frac{1}{4}C$ je bila prisotno protokormov in rizoidov srednja (oznaka ++) (preglednica 4 in 5).

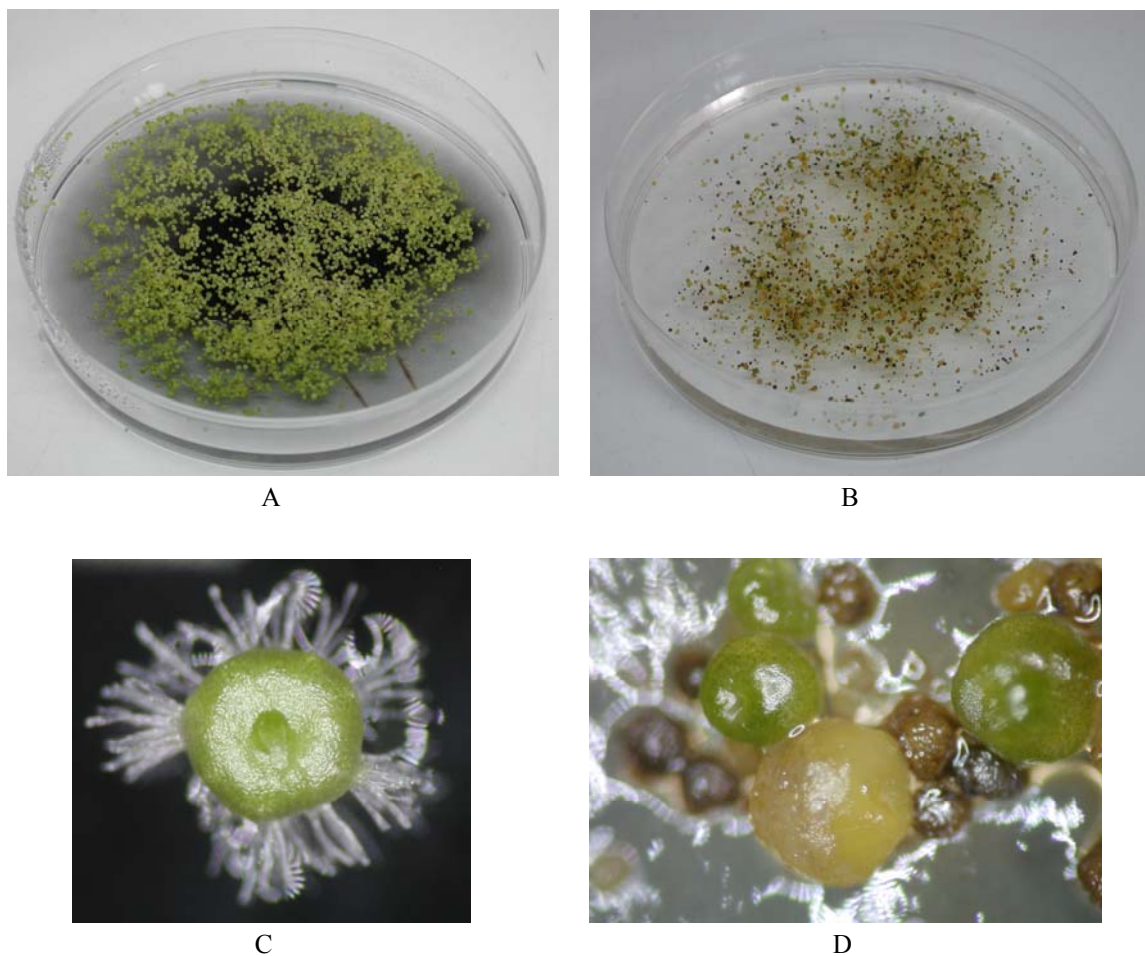


Slika 7: Odstotek še kaljivih in nekaljivih semen 77 dni po inokulaciji semen orhideje *Anguloa clowesii* Lindl. na gojišče A, B in C

Najslabše so semena kalila na gojišču A, in sicer na gojišču $\frac{1}{2}A$ je kalilo 33,8 % semen, na gojišču A s polno koncentraciji hranil 22,7 % semen in najmanj samo 19,8 % semen je kalilo na gojišču $\frac{1}{4}A$ (slika 7). Glede prisotnosti posameznih morfoloških faz je bilo najboljše gojišče $\frac{1}{2}A$, saj je bilo prisotnih protokormov od malo do veliko odvisno od petrijevke oz. ponovitve ter malo rizoidov. Na gojišču $\frac{1}{4}A$ je bilo malo protokormov in prav tako malo rizoidov, medtem ko na gojišču A s polno koncentracijo hranil je bilo malo do srednje protokormov brez rizoidov (preglednica 3). Nadaljeval se je zaostanek v rasti in odmiranje protokormov.

4.2.10 91 dni po inokulaciji semen

91 dni po inokulaciji semen na gojiščih B in C ni bilo vidnih večjih sprememb, le listi so bili malo večji v primerjavi pred dvema tednoma (slika 8C). Na gojišču A se je nadaljevalo propadanje. Protokormi so postajali rjavi in zaostajali v rasti (slika 8B in D). Največ protokormov je propadlo na gojišču A, medtem ko na gojiščih $\frac{1}{2}A$ in $\frac{1}{4}A$ v tem obdobju ni bilo opaznih propadanj, ampak samo zaostanek v rasti.



Slika 8: 91 dni po inokulaciji semen orhideje *Anguloa clowesii* Lindl.: A in C – gojišče B, brez propadajočih protokormov; B in D – gojišče A, s propadajočimi protokormi

4.2.11 103 dni po inokulaciji semen

103 dni po inokulaciji semen je bilo več protokormov z listi na gojiščih B in C, medtem ko so protokormi na vseh treh koncentracijah gojišča A skoraj čisto porjaveli, v primerjavi pred 12 dnevi.

4.2.12 131 in 155 dni po inokulaciji semen

131 in 155 dni po inokulaciji semen na gojišča ni bilo opaznih sprememb v morfoloških fazah v primerjavi s 103 dnevi. Opazili smo, da je kultura postala rahlo svetlejša, verjetno je prišlo do pomanjkanja hranil oz. gojišče se je počasi izčrpalo in kulturo bi bilo potrebno prestaviti na sveže gojišče.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Orhideja *Anguloa clowesii* Lindl. je zanimiva zaradi oblike cvetov, predvsem pa zaradi rumene barve, ki je zelo priljubljena pri orhidejah rodu *Phalaenopsis*. Sorte rodu *Phalaenopsis* s popolnoma rumenimi cvetovi so zelo občutljive na rastne razmere, s krajšo dobo cvetenja in tudi življensko dobo ter zelo redko pri sobnih razmerah ponovno zacvetijo v primerjavi s sortami z drugo barvo cvetov. Nekoliko manj občutljivi so križanci, ki imajo v cvetu, razen popolnoma rumene, prisotno še drugo barvo. Znano je, da se orhideje dokaj uspešno medvrstno križajo, obstajajo pa tudi primeri medrodovnih križanj, predvsem med sorodnimi rodovi, križanci pa imajo različno stopnjo fertilitnosti (Sweet, 1980). Zato bi lahko orhidejo *A. clowesii* Lindl. uporabili, kot vir genov v križanjih za izboljšanje prej navedenih lastnosti orhidej *Phalaenopsis*, ki so tržno zanimivejše od *A. clowesii* Lindl., ki pa vedno bolj pridobiva na pomenu (Absolute astronomy ..., 2012). Žlahtnjenje novih sort poteka zelo načrtno z izbiro ustreznih starševskih rastlin, katerih lastnosti se lahko uspešno združijo in poudarijo v križancih ter z izbiro najprimernejših potomcev (Wing Yam in Arditti, 2009). V konkretnem primeru lahko medrodovno bariero premagamo tudi s pomočjo biotehnologije, z reševanje nedozorelih embrijev ali transformacijo.

5.1.1 Aseptičnost kulture semen

Postopek razkuževanja semen smo opravili z 1,6 % dikloroizocianurno kislino ob prisotnosti nekaj kapljic močila Tween 20. Semena smo v raztopini razkužila pustili 8 minut pri sobni temperaturi in nadaljevali 2 minuti s hladnim centrifugiranjem pri 5000 obratih/min. S tem postopkom smo dobili 48,6 % aseptično kulturo in jo obdržali do konca poskusa. Največ 37,5 % petrijevok z okuženimi semeni smo izločili en teden po inokulaciji, nato se je odstotek izločenih petrijevok zmanjševal vse do 55 dne po inokulaciji, ko se je pojav okužbe zaustavil. Sterilizacijsko sredstvo in centrifugiranje nista pustila vidnih poškodb na semenih, ki bi negativno vplivale na kalitev. Jevšnik (2002) navaja, da je z enakim postopkom razkuževanja, katerega smo uporabili v našem poskusu, dobil 100 % aseptično kulturo. Hicks (2000) priporoča in poudarja vsestranskost uporabe kalcijevega hipoklorita. Glede na to, da smo dobili semena iz naravnega rastišča Kolumbije, smo predvidevali, da je okuženost zaradi podnebnih razmer velika, smo bili s skoraj polovičnim izplnom aseptične kulture zelo zadovoljni.

5.1.2 Vpliv gojišča in koncentracije hranil na kalitev in razvoj

Gojišča so so med seboj razlikovala po nekaterih sestavinah (preglednica 1) in predvsem po koncentraciji hranil (polna, polovična in četrtinska). Za nekatere orhideje je značilno, da bolje kalijo in uspevajo na skromnejših gojiščih. Za orhidejo *Anguloa clowessii* Lindl. v

literaturi nismo dobili podatka o potrebi hranil za *in vitro* razmnoževanje, zato smo v poskus vključili tri različne koncentracije hranil vsakega gojišča.

Prvih 7 dni po inokulaciji na semenih ni bilo opaznih sprememb ne glede na gojišče. Po 14 dneh je večina kalčkov nabreknila oz. so se začeli pojavljati protokormi, ki so bili na gojišču A podolgovati na gojiščih B in C okrogli. Obdobje med 7 do 14 dnev po inokulaciji smo šteli za kalitev in v tem obdobju je večina semen kalila. Kalčki so nabrekli oz. začela se je morfološka faza protokorma, ne glede na gojišče. To obdobje kalitve je bilo za polovico krajše kot ga za *Phalaenopsis* navajajo Bhattacharjee in sod. (1999).

Po 21 dneh so bili kalčki oz. protokormi že tako veliki, da jih je večina zapustila testo ter na gojišči B in C so se začeli pojavljati posamezni rizoidi. Nadaljnjih 42 dni ni bilo velikih sprememb v rasti in razvoju.

Prvi zametki listov so se pojavili 63 dni po inokulaciji. Na gojišču A so protokormi zaostajali v rasti in začele so se pojavljati nekroze predvsem na gojišču s polno koncentracijo hranil. Gojišče A se je od ostalih dveh gojišč B in C razlikovalo po manjši koncentraciji vitaminov, vsebovalo je enkrat manj piridoksina in nikotinske kisline ter desetkrat manj tiamina. Vsebovalo je tudi dva hormona NAA 0,5 mg/l in BAP 2 mg/l, medtem ko gojišči B in C nista vsebovali hormonov. Hinnen in sod. (1989) izpostavljajo in pripisujejo dušiku v gojišču najpomembnejšo vlogo pri rasti. Vsa tri uporabljena gojišča so vsebovala dušik v obliki amonijevega in kalijevega nitrata v enakih koncentracijah. Glede na znano dejstvo, da imajo vitamini v tkivni kulturi manjši vpliv kot hormoni, lahko pripišemo pojav zaostajanja v rasti in odmiranja protokormov prisotnosti hormonov v gojišču A.

77 dni po inokulaciji smo prešteli kaljiva in nekaljiva semena ter ocenili prisotnost protokormov in rizoidov. Najboljše so kalila semena na gojiščih B in C ter najslabše na gojiščih A. Glede prisotnosti protokormov in rizoidov je bilo najboljše gojišče B, sledilo je gojišče C in najslabše je bilo gojišče A. Gojišči B in C sta se razlikovali samo v dodanem bananinem prašku v obliki 50 % maltodekstrina v gojišče C, vse ostale sestavine v obeh gojiščih so bile enake.

91 dni po inokulaciji ni bilo opaznih večjih sprememb v morfoloških fazah. Le listi na gojiščih B in C so bili malo večji, medtem ko je bil na gojišču A zaostanek v rasti večji in prav tako pojav nekroz. Do konca spremljanja, 155 dni po inokulaciji so se listi na gojiščih B in C zelo povečali, medtem ko je na gojiščih A večina protokormov propadla. Prvič smo 131 dni po inokulaciji opazili, da je kultura na gojiščih B in C rahlo pobledela, kar je bilo opozorilo na padeč hranil in za prestavljanje oz. subkultivacijo na sveže gojišče.

5.2 SKLEPI

- Razkuževanje semen z 1,6 % dikloroizocianurno kislino je bil zadovoljiv postopek pridobitve aseptične kulture, saj je bilo 48,6 % petrijevok s semeni neokuženih.
- Kaljivost je bila najboljša 96,3 % na gojišču B s polno koncentracijo hranil, nekoliko je zaostajala na ostalih koncentracijah gojišča B in C.
- Glede prisotnosti protokormov in rizoidov sta bili najboljši gojišči B in C ne glede na koncentracijo hranil.
- Nekoliko hitreje so se pojavljale nove morfološke faze na gojišču ½B in na tem gojišču je bila kultura najvitalnejša.
- Na gojišču A so semena slabo kalila, najboljše 33,8 % na gojišču ½A, na ostalih dveh slabše.
- Na gojišču A so se po dveh mesecih kultivacije začele pojavljati nekroze oz. propadanje kulture, kar je bilo najbolj zastopano na gojišču s polno koncentracijo hranil.
- Gojišči B in C, ne glede na koncentracijo hranil, sta primerni za *in vitro* razmnoževanje orhideje *Anguloa clowesii* Lindl., medtem ko je gojišče A neprimerno za kalitev ter tudi za rast in razvoj.

6 POVZETEK

Anguloa clowesii Lindl. je tropska orhideja, ki raste v višinskih predelih Venezuele, Kolumbije, Ekvadorja in Peruja. Večinoma je terestična občasno tudi epifitska. Zaradi oblike in barve cvetov vse bolj pridobiva na tržnem pomenu in kot zanimiv vir genov za križanja. Namen dela je bil v *in vitro* razmerah razmnožiti rastline orhideje *Anguloa clowesii* Lindl.

V poskus smo vključili semena orhideje *Anguloa clowesii* Lindl., ki smo jih dobili iz naravnega rastišča Kolumbije. Pred inokulacijo semen na gojišče smo jih površinsko razkužili z 1,6 % dikloroizocianurno kislino z dodatkom močila Tween 20. Rastline so uspevale v zelo humidnem območju, zato smo pričakovali, da je okuženost semen s patogeni zelo močna.

Namen naloge je bil, s pomočjo tehnik tkivnih kultur asimbiotsko razmnožiti rastline tropske orhideje *Anguloa clowesii* Lindl., katere bi lahko v prihodnje vključili v križanja za vzgojo novih križancev.

V poskus, v katerem smo preučevali *in vitro* razmnoževanje tropske orhideje *Anguloa clowesii* Lindl., smo vključili tri različna gojišča v treh različnih koncentracijah (A, $\frac{1}{2}$ A, $\frac{1}{4}$ A, B, $\frac{1}{2}$ B, $\frac{1}{4}$ B, C, $\frac{1}{2}$ C in $\frac{1}{4}$ C).

Semena so na vseh gojiščih kalila v obdobju 7 do 14 dni in to obdobje smo šteli za kalitev. Po 14 dneh so se začeli pojavljati protokormi, ki so bili na gojišču A bolj podolgovati na gojiščih B in C bolj okrogli in nekateri so zapuščali testo in začeli zeleneti.

Prvi zametki listov so se pojavili 63 dni po inokulaciji in na gojišču A je bil opazen zastoj v rasti protokormov in rizoidov ter rjavenje oz. odmiranje protokormov, predvsem na gojišču s polno koncentracijo hranil.

Obdobje 77 dni po inokulaciji smo šteli kot neko prelomno obdobje za *in vitro* gojenje, saj smo v tem obdobju krepko prešli dobo kalitve ter razen korenin in cvetov smo imeli še vse dele rastlin. Zato smo se odločili, da preštejemo še ostanek nekaljivih semen ter ocenimo prisotnost protokormov in rizoidov. Semena so najboljše kalila na gojiščih B in C ter najslabše na gojiščih A. Glede prisotnosti protokormov in rizoidov je bilo najboljše gojišče B, sledilo je gojišče C in najslabše je bilo gojišče A. Če povzamemo vse opazovane parametre je bilo najboljše gojišče $\frac{1}{2}$ B, ki pa se ni bistveno razlikovalo od ostalih gojšč B in C.

Pri naslednjem bonitiranju, 91 dni po inokulaciji, ni bilo opaznih večjih sprememb v morfoloških fazah, le listi na gojiščih B in C so bili malo večji, medtem ko je bil na gojišču

A večji zaostanek v rasti in pojav nektoz. V obdobju 131 dni po inokulaciji je kultura na gojiščih B in C malo pobledela, kar je bilo opozorilo za prestavljenje na sveže gojišče.

Do konca spremljanj poskusa, 155 dni po inokulaciji, so se listi na gojiščih B in C zelo povečali, medtem ko je na gojiščih A večina protokormov propadla. Gojišči B in C sta primerni za kalitev in rast orhideje *Anguloa clowesii* Lindl. Za tržno uspešno *in vitro* razmnoževanje bi bilo potrebno sam postopek in tudi gojišči B in C optimizirati v smer skrajšanja ciklusa in pridobitvi vitalnih rastlin.

7 VIRI

- Absolute astronomy, Anguloa. 2012
<http://www.absoluteastronomy.com/topics/Anguloa> (11.1.2013)
- Anguloa clowesii (Orchidaceae) at The Culture Sheet. 2008
<http://culturesheet.org/orchidaceae:anguloa:clowesii> (7.1.2013)
- Arditti J. 1992. Fundamentals of Orchid Biology, New York, John Wiley & Sons: 712 str.
- Arditti J., Krikorian A.D. 1996. Orchid Micropropagation: the path laboratory to commercialization and an account of several unappreciated investigators. Botanical Journal of the Linnean Society, 122: 183-241
- Bhattacharjee S., Khan H.A., Reddy P.V. 1999. *In vitro* germination of *Phalaenopsis* hybrid seed. Seed Research, 27: 11-13
- Bohanec B. 1992. Tehnike rastlinskih tkivnih kultur. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Center za rastlinsko biotehnologijo in žlahtnenje: 168 str.
- Chase M., 2005. Classification of Orchidaceae in the age of DNA data. Curtis's Botanical Magazine, 22: 2-7
- Duan J. X., Yazawa, S. 1995. Floral induction and development in *Phalaenopsis in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 43: 71-74
- Hicks A. J. 2000. Asymbiotic technique of orchid seed germination. Chandler, the Orchid Seedbank Project: 134 str.
- Hinnen M. G. J., Pierik R. L. M., Bronsema F. B. F. 1989. The influence of macronutrients and some other factors on growth of *Phalaenopsis* hybrid seedlings *in vitro*. Scientia Horticulturae, 41: 105-116
- Jevšnik T. 2002. Asimbiotsko razmnoževanje tropskih orhidej. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za Agronomijo: 64 str.
- Kramer J. 1997. Orchid for everyone. New York, Smithmark Publisher: 208 str.
- Moore R., Clark W. D., Vodopich D. S. 1998. Botany. Boston, The McGraw-Hill Companies: 920 str.
- Oakeley H. F. 1999. *Anguloa*: The species, the hybrids and a checklist of Angulocastes. Orchid Digest, 63, 4: 1-32
- Petauer T. 1998. Mali leksikon botanike. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 390 str.
- Plant novelties: Bletilla straita. 2000
<http://www.botgard.ucla.edu/html/MEMBGNewsletter/Volume3number2/Bletilla.html>
(9.10.2012)

- Pridgeon A. 1999. The illustrated encyclopedia of orchids. The Rocks, Lansdowne Publishing Pty Ltd: 304 str.
- Ravnik V. 2002. Orhideje Slovenije. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 192 str.
- Rittershausen S., Pilcher M. 2000. A Gardner's guide to orchids and bromeliads. London, Merhurst Ltd: 96 str.
- Sinkovič T. 2000. Uvod v botaniko: za študente visokošolskega strokovnega študija kmetijstva – agronomija in hortikultura. Ljubljana, Oddelek za agronomijo Biotehniške fakultete: 176 str.
- Sweet H.R. 1980. The genus *Phalaenopsis*. Laguna Niguel, Orchid Digest Corporation, CA, ZDA: 128 str.
- Thompson P. A. 1996. Orchids from seed. Kew, Royal Botanical Gardens: 29 str.
- Vintage art print (37) - tropical orchid flower. 2012
<http://www.etsy.com/listing/84613869/vintage-art-print-37-tropical-orchid> (7.1.2013)
- Wing Yam T., Arditti J. 2009. History of orchid propagation: a mirror of the history of biotechnology. Plant Biotechnology Reports, 3: 1-56

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici izr. prof. dr. Zlati Luthar za vso pomoč, podporo in nasvete pri izdelavi diplomskega dela. Zahvalila bi se tudi recenzentu izr. prof. dr. Gregorju Ostercu in recenzentki izr. prof. dr. Marijani Jakše za strokovno mnenje o tem delu.

Zahvaljujem se tudi Marku Franku, univ. dipl. ing. agr. za posredovana semena, ki sem jih vključila v poskus.

Vsem v diplomski nalogi že imenovanim kot tudi tistim neimenovanim, ki so kakorkoli pomagali pri nastajanju tega dela, z globokim spoštovanjem, iskrena hvala.

Zahvala je namenjena tudi družini, ki mi je skozi vsa leta stala ob strani in mi omogočila uspešno šolanje.