



UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Jasmina HORVAT

**PRISTOPI IN OPTIMIZACIJE POSTOPKOV *in vitro*  
KLONSKEGA RAZMNOŽEVANJA ORHIDEJ IZ  
RODU *Phalaenopsis***

DIPLOMSKI PROJEKT

Univerzitetni študij - 1. stopnja

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Jasmina HORVAT

**PRISTOPI IN OPTIMIZACIJE POSTOPKOV *in vitro* KLONSKEGA  
RAZMNOŽEVANJA ORHIDEJ IZ RODU *Phalaenopsis***

DIPLOMSKI PROJEKT  
Univerzitetni študij – 1. stopnja

**APPROACHES AND OPTIMISATION OF *in vitro* PROCEDURES OF  
ORCHID PROPAGATION IN GENUS *Phalaenopsis***

B. SC. THESIS  
Academic Study Programmes

Ljubljana, 2011

Diplomski projekt je zaključek Univerzitetnega študija Kmetijstvo – agronomija – 1. stopnja. Delo je bilo opravljeno na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Boruta Bohanca.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Dominik Vodnik  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Borut Bohanec  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za agronomijo

Član: izr. prof. dr. Gregor Osterc  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za agronomijo

Datum zagovora: 26. 9. 2011

Diplomski projekt je rezultat lastnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svojega diplomskega projekta na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddal v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Jasmina Horvat

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du1
- DK UDK 582.594:631.532:591.165(043.2)
- KG *Phalaenopsis*/ mikropropagacija/ PLB/ somatska embriogeneza/ kultura poganjkov/ kalus
- AV HORVAT, Jasmina
- SA BOHANEK, Borut (mentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
- LI 2011
- IN PRISTOPI IN OPTIMIZACIJE POSTOPKOV *in vitro* KLONSKEGA RAZMNOŽEVANJA ORHIDEJ IZ RODU *Phalaenopsis*
- TD Diplomski projekt (Univerzitetni študij – 1.stopnja)
- OP VII, 20 str., 2 pregl., 3 sl., 23 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Za orhideje je značilno, da so relativno počasi rastoče rastline, zato so skozi različna obdobja raziskovalci poskušali z odkritjem in razvojem *in vitro* tehnik pospešiti proces razmnoževanja le teh. Ker so orhideje tujeprašne rastline, njihovo razmnoževanje s semeni vodi do nastanka heterozigotnih potomcev, katerih lastnosti so odvisne od starševskih linij. Za masovno produkcijo orhidej se ta način več ne uporablja, saj so razvite tehnike vegetativnega razmnoževanja, s katerimi lahko razmnožimo večje število uniformnih potomcev. V nalogi bom predstavila pristope *in vitro* razmnoževanja orhidej iz rodu *Phalaenopsis*. Za razmnoževanje orhidej *Phalaenopsis* se je razvilo mnogo tehnik razmnoževanja *in vitro*, vključno s kulturo cvetnih poganjkov z aksialnimi brsti, meristemi, izsečki internodijskih segmentov cvetnih poganjkov, listnih segmentov in koreninskih vršičkov. Najpomembnejša skupina snovi, ki omogoča celoten razvoj metod so rastlinski rastni regulatorji. Koncentracija avksinov in citokininov v gojišču ima največji vpliv na indukcijo, diferenciacijo oz. regeneracijo, multiplikacijo, podaljšanje in ukoreninjenje poganjkov orhidej iz rodu *Phalaenopsis*.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Du1
- DC UDC 582.594:631.532:591.165(043.2)
- CX *Phalaenopsis*/ micropropagation/ PLB/ somatic embryogenesis/ shoot culture/ callus
- AU HORVAT, Jasmina
- AA BOHANEK, Borut (supervisor)
- PP SI-1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
- PY 2011
- TI APPROACHES AND OPTIMISATION OF *in vitro* PROCEDURES OF ORCHID PROPAGATION IN GENUS *Phalaenopsis*
- DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes)
- NO VII, 20 p., 2 tab., 3 fig., 23 ref.
- LA sl
- Al sl/en
- AB The orchids are relatively slow-growing plants, thus through different periods the researchers have tried to accelerate the propagation process of orchids with the discovery and research of *in vitro* techniques. As the orchids are cross-pollinated plants, their propagation from seeds leads to the creation of heterozygous progenies, the characteristics of which depend on the parental lines. This technique is no longer used for the mass production of orchids, since vegetative propagation techniques, with which we can propagate a larger number of uniform progenies, have been developed. In my diploma project I am going to present the approaches to *in vitro* propagation of orchids of the genus *Phalaenopsis*. Numerous techniques of *in vitro* propagation have been developed for the propagation of *Phalaenopsis* orchids, including the culture of flower shoots with axial buds, meristems, and the explants of flower shoots, internodal segments of flower shoots, leaf segments and root tips. The most important group of substances enabling the full development of methods are the plant growth regulators. The concentration of auxins and cytokinins in the culture medium influences the induction, differentiation and regeneration respectively, multiplication, extension and rooting of the orchid shoots of the genus *Phalaenopsis*.

## KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION .....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VI
KAZALO SLIK.....	VI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....	VII
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2 ROD <i>Phalaenopsis</i> .....</b>	<b>1</b>
<b>3 POMEMBNI DEJAVNIKI <i>in vitro</i> RAZMNOŽEVANJA RASTLIN .....</b>	<b>3</b>
3.1 <i>in vitro</i> RAZMNOŽEVANJE ORHIDEJ <i>Phalaenopsis</i> .....	4
<b>3.1.1 Vzgoja neposredno iz semena.....</b>	<b>4</b>
<b>3.1.2 Vegetativno razmnoževanje - mikropropagacija.....</b>	<b>6</b>
3.1.2.1 Faze mikropropagacije .....	6
3.1.2.2 Uporabne tehnike za mikropropagacijo orhidej rodu <i>Phalaenopsis</i> .....	9
3.1.2.2.1 Regeneracija rastlin po poti iz apikalnih in aksialnih meristemov .....	10
3.1.2.2.2 Regeneracija rastlin po poti iz adventivnih meristemov .....	12
3.1.2.3 Vpliv citokininov in avksinov na razmnoževanje .....	14
3.1.2.4 Vpliv sladkorjev na indukcijo kalusa in formacijo PLB-jev .....	16
3.2 TEŽAVE <i>in vitro</i> RAZMNOŽEVANJA ORHIDEJ <i>Phalaenopsis</i> .....	17
<b>4 SKLEPI.....</b>	<b>18</b>
<b>5 VIRI .....</b>	<b>19</b>
ZAHVALA	

## KAZALO PREGLEDNIC

	Str.
<b>Preglednica 1:</b> Mikropropagacija orhidej <i>Phalaenopsis</i> iz različnih izsečkov .....	10
<b>Preglednica 2:</b> Vpliv NAA in TDZ na direktno embriogenezo iz listnih izsečkov orhideje <i>Phalaenopsis amabilis</i> .....	15

## KAZALO SLIK

	Str.
<b>Slika 1:</b> Postopek mikropropagacije s kulturo nodijev .....	11
<b>Slika 2:</b> Direktna somatska embriogeneza iz listnih izsečkov orhideje <i>Phalaenopsis</i> .....	14
<b>Slika 3:</b> Vpliv različne konc. saharoze na regeneracijo PLB-jev iz listnih izsečkov orhideje <i>Phalaenopsis</i> 'Taisuco Hatarot' po 12. tednih kultiviranja .....	16

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

$\mu\text{M}$  - mikromol  
PLB - protokormu podobne strukture  
IAA - indol-3-očetna kislina  
IBA - indol-3-maslena kislina  
NAA -  $\alpha$ -naftalen očetna kislina  
2,4-D - 2,4-diklorofenoksiocetna kislina  
BAP - 6-benzilaminopurin  
TDZ - tidiazuron  
KIN - kinetin (6- furfuralaminopurin)  
2iP - ( $\text{N}^6$ -( $\alpha^2$  - izopentelin) adenin)  
NPK - dušik, fosfor, kalij  
DCCA - dikloroizocianurna kislina  
NaClO - natrijev hipoklorit  
*P.* - *Phalaenopsis*  
CW - kokosovo mleko



## 1 UVOD

Orhideje predstavljajo eno izmed najbolj razširjenih družin cvetočih rastlin na svetu. Spadajo v družino Orchidaceae oz. kukavičevke. Ocenjujejo, da družina obsega preko 800 različnih rodov in 25.000 različnih vrst, katerih število se dodatno povečuje zaradi različnih novih križancev, ki jih vrtnarji vzgajajo v okrasne namene. Orhideje so cenjene predvsem zaradi svojih lepih dolgocvetočih cvetov, ki kažejo neverjetno paleto raznolikosti v velikosti, obliki in barvi (Chugh in sod., 2009).

Danes je gojenje orhidej več kot le hobi, gre za mednarodno proizvodnjo, ki predstavlja 8 % svetovne trgovine s cvetjem (Chugh in sod., 2009). V zadnjih letih je na svetovnih trgih okrasnih rastlin opazen trend naraščanja povpraševanja po orhidejah. Svetovna proizvodnja orhidej zato postaja vse večja in zanesljivejša. Gojitelji vse več časa posvečajo tehnologiji pridelovanja rastlin, ki je ključnega pomena. Od nje je namreč odvisno, koliko časa bo preteklo, da se zaključi en proizvodni cikel, ki lahko pri orhidejah traja več let in bistveno podraži gojenje (Košir, 2003).

Med vsemi orhidejami imajo največjo ekonomsko vrednost na svetovnem trgu okrasnih rastlin orhideje iz rodu *Phalaenopsis*. Le te so postale ena izmed najpopularnejših okrasnih lončnic v Evropi. Uvajanje novih, atraktivnejših kultivarjev z manjšimi listi, večjim številom cvetov na stebelu in bolj robustnimi koreninami ter boljšimi poganjki je povzročilo povečanje povpraševanja na trgu. Poleg tega so se izboljšale tehnike pridelovanja v rastlinjakih. V Nemčiji so tako leta 2004 v *in vitro* laboratorijih proizvedli 31 milijonov različnih vrst in hibridov rodu *Phalaenopsis* (Winkelmann in sod., 2006).

Za orhideje je značilno, da jih v *in vitro* razmerah lahko razmnožujejo generativno in vegetativno. Danes se za masovno produkcijo orhidej *Phalaenopsis* uporablja le vegetativno razmnoževanje oz. mikropropagacija, s katero se v krajšem časovnem obdobju producira večje število uniformnih klonskih kultivarjev.

## 2 ROD *Phalaenopsis*

Orhideje iz rodu *Phalaenopsis* zajemajo okoli 70 vrst, ki izvirajo iz območja med Indijo in Severno Avstralijo. Največ jih lahko najdemo na širšem območju Filipinskega otočja.

Rod sodi v skupino orhidej z monopodialno rastjo, kamor uvrščamo orhideje, ki imajo praviloma eno os rasti in lahko rastejo v neskončnost. V naravnem okolju so orhideje rodu *Phalaenopsis* epifiti ali litofiti, kar pomeni, da se s koreninami ovijajo debel in vej drugih

rastlin ali pa rastejo na skalnatih predelih, ki so porasli z mahom. Ker orhideje od svojih gostiteljskih rastlin ne sprejemajo hranilnih snovi, jih ne uvrščamo med parazite. Prehranjujejo se s hranilnimi snovmi, ki so raztopljene v vodi, ki jo oddajajo mahovi in druge rastline (Jevšnik, 2006).

Semena orhidej so zelo majhna in lahka. V enem plodu oz. kapsuli lahko najdemo izjemno število drobnih semen, ki spominjajo na prah, saj merijo le okrog 0,4 mm x 0,08 mm (Mweetwa in sod., 2008). Seme je zgrajeno iz majhnega nediferenciranega embrija, ki ga sestavlja nekaj deset celic in je obdan s semensko ovojnico oziroma testo. Semena so brez endosperma in niso sposobna izkoristiti lastnih lipidnih rezerv in razgraditve škroba (Chugh in sod., 2009).

Kalivost in razvoj semen v naravnem okolju je mogoča zaradi pojava mikorize med kukavičevkami in glivami. Gre za povezano življenje dveh organizmov različnih vrst, pri čemer imata oba organizma korist, kar z drugo besedo imenujemo mutualizem. Glive v zgodnji fazi razvoja orhidej prodrejo v razvijajoči se protokorm rastline in jo oskrbujejo z ogljikovimi hidrati in mineralnimi snovmi, medtem ko rastline za glive predstavljajo vir ogljikovih hidratov (Jevšnik, 2006).

Listi so mesnati, celorobi in jezičasti. Dolgi so lahko do 40 cm in široki od 60 do 100 mm in več. Pojavljajo se v različnih zelenih odtenkih s sivimi lisami (Davidson, 1994, cit. po Košir 2003). Služijo shranjevanju hranilnih snovi in vlage.

Ker prihajajo iz razmer, kjer vladajo skoraj konstantno enake temperaturne, ne potrebujejo pseudobulb, zato pa veliko korenin, ki ne rastejo po principu geotropizma (rast navpično navzdol), ampak se razraščajo v vse smeri kar jim omogoča, da se lahko močno oprimejo in se zasidrajo v podlago.

Orhideje rodu *Phalaenopsis* so enodomne rastline z dvospolnimi cvetovi, torej nosijo tako ženske kot moške spolne organe. Cvetovi so zigomorfni, kar pomeni da so bilaterarno simetrični oz., da je simetrična prepolovitev cveta možna le v eni osi.

V preteklosti so bili bolj priljubljeni večji in ploščati cvetovi čistih barv. Zadnja leta pa se pojavljajo manjši križanci rumene, oranžne in živo rdeče barve, kjer površina celotnega cveta ni v eni ravnini. Pri optimalno oskrbovani rastlini, se pojavljajo cvetovi skoraj vse leto. Cvetovi se odpirajo postopoma. Od začetka oblikovanja poganjka pa do cvetenja potrebuje rastlina mesec in pol do dva meseca. Nekateri cvetovi modernih križancev so postali zanimivi tudi zaradi svojih dišav, kar predstavlja novo dimenzijo pri gojenju falenopsisov (Jevšnik, 2006).

### 3 POMEMBNI DEJAVNIKI *in vitro* RAZMNOŽEVANJA RASTLIN

Rastline lahko v *in vitro* razmerah razmnožujemo na dva načina: generativno in vegetativno. Generativno razmnožujemo rastline s pomočjo semen, medtem ko za vegetativno razmnoževanje uporabljamo različne dele rastlin iz katerih se regenerirajo brsti iz katerih se razvijejo mlade rastlinice (George in sod., 2008).

Pri tem uporabljamo tako imenovano tehniko rastlinskih tkivnih kultur, pri kateri gojimo rastline, organe, tkiva ali posamezne celice v sterilnem okolju na definiranih trdnih ali tekočih hranilnih podlagah ali gojiščih (Ravnikar, 1996).

Proces *in vitro* razmnoževanja poteka v laboratorijih, kjer so zagotovljene sterilne razmere za uspešen razvoj rastlinic v rastnih komorah. Ker rastlinsko tkivo na gojišču raste počasneje kot bakterije in glive je potrebna sterilizacija orodja, steklovine, gojišč in izvornega materiala (Bohanec in sod., 2004).

Ena glavnih značilnosti gojenja rastlin v tkivnih kulturah je ta, da imajo rastline v tkivnih kulturah heterotrofni metabolizem, kar pomeni, da za rast potrebujejo že sintetizirane organske snovi.

Kot vir že sintetiziranih organskih snovi so v uporabi kompleksna gojišča, ki so sestavljena iz mineralov (makro- in mikroelementov), ogljikovih hidratov, aminokislin, vitaminov in rastlinskih rastnih regulatorjev. Najpomembnejša skupina snovi, ki je potrebna za razvoj metod tkivnih kultur so rastlinski rastni regulatorji oz. hormoni. Med njimi so najpomembnejši avksini in citokinini.

Najpogosteje uporabljeni citokinini so BAP (6-benzilaminopurin), TDZ (tidiazuron), KIN kinetin (6- furfurilaminopurin), 2iP (N<sup>6</sup>-( $\alpha^2$  - izopentelin) adenin) in zeatin. Avksini, ki se najpogosteje uporabljajo pa so IAA (indol-3-ocetna kislina), IBA (indol-3-maslena kislina), NAA ( $\alpha$ -naftalen oacetna kislina) in 2,4-D (2,4-diklorofenoksiocetna kislina).

Gojišča so lahko v trdni ali tekoči obliki. Za pripravo trdnih gojišč se hranilnim raztopinam dodajajo strjevalci kot so agar, agarozna in gellan-gum.

Ishii in sod. (1998) so v svoji raziskavi ugotovili, da so gojišča z gellan-gumom primernejša za indukcijo kalusa in PLB-jev kot gojišča, ki vsebujejo agar. Za *in vitro* razmnoževanje orhidej se večinoma uporablja strjevalec gellan-gum.

Za uspešen razvoj rastlinic v tkivnih kulturah je potrebna kontrola zunanjih dejavnikov v tako imenovanih rastnih komorah. Pomembni zunanji dejavniki, ki vplivajo na rast in razvoj rastlinic so svetloba, intenziteta svetlobe, sestava in dolžina dnevnega osvetljevanja, pH gojišča, koncentracija CO<sub>2</sub> in O<sub>2</sub>, temperatura ter vlaga.

Razmnoževanje rastlin *in vitro* je prav tako pogojeno z lastnostmi rastlin, ki jih razmnožujemo. Ena glavnih lastnosti rastlin za rast in razvoj *in vitro* je totipotentnost oz. potencial vsake posamezne celice, da se na podlagi svoje genske informacije razvije v popolno rastlino. Razvoj od zigote do odrasle rastline je pogojen z tremi procesi: delitev, rast in diferenciacija. Celična delitev in celična rast pogojujeta morfogenezo rastline. Na morfogenezo pa vplivajo notranji (rastlinski rastni regulatorji) zunanji dejavniki. S poznavanjem vseh dejavnikov lahko usmerjamo razvoj rastlin, diferenciacijo organov ali celih rastlin iz posameznih izoliranih rastlinskih celic v tkivni kulturi (Ravnikar, 1996).

### 3.1 *in vitro* RAZMNOŽEVANJE ORHIDEJ *Phalaenopsis*

Za orhideje je značilno, da so relativno počasi rastoče rastline zato so skozi različna obdobja raziskovalci poskušali z odkritjem in razvojem *in vitro* tehnik pospešiti proces razmnoževanja le teh.

#### 3.1.1 Vzgoja neposredno iz semena

Najenostavnejši način razmnoževanja s pomočjo *in vitro* postopkov je vzgoja mladih rastlinic neposredno iz semena, ki sicer v naravnih razmerah kali le ob prisotnosti simbiotske glive. Z odkritjem Lewisa Knudsona, ki je leta 1922 ugotovil formulo snovi, ki jih semena orhidej pridobijo od gliv v fazi rasti, se je začelo obdobje masovne produkcije orhidej v *in vitro* razmerah. Prišlo je do razvoja uporabe asimbiotske kalitve pri kateri z ustreznimi hranili v gojišču nadomestimo glive.

V poskusih asimbiotske kalitve je najprej potrebna uspešna oprášitev cvetov. Iz oprášenih cvetov se potem razvije plod oz. kapsula s semeni. Kapsule odrežemo iz rastline ob polni zrelosti ali v času, ko kapsule preidejo dve tretjini časa od oploditve do polne zrelosti. Orhideje rodu *Phalaenopsis* potrebujejo do polne zrelosti kapsul približno 6 mesecev. Ob polni zrelosti kapsul se semena sama usipajo iz njih, v primeru nezrelih kapsul pa je potrebna vzdolžna razcepitev le teh s pomočjo skalpela in pincete (Bohanec, 1992). Semena pridobljena iz kapsul nato iniciramo na ustrezna gojišča, kjer v *in vitro* razmerah začnejo kaliti.

Preden semena inokuliramo na gojišča je potrebna sterilizacija semen. Ker so semena orhidej zelo majhna, so potrebni posebni postopki sterilizacije. Poznamo več tehnik sterilizacije semen: večkratno spiranje z vodo, filtriranje in odcejevanje. Pri tem ne smemo poškodovati embrija, ki je zaščiten le s tanko semensko ovojnico, in ne prenese močnejših fizičnih poškodb.

V primeru, da odberemo še nezrele kapsule lahko uporabimo metodo sterilizacije še zelenih zaprtih kapsul, ki jo v svoji raziskavi navajajo tudi Mweetwa in sod. (2009). Zaprte še nedozorele kapsule so 30 minut tretirali z 15% kalcijevim hipokloritom. Nato so jih s pomočjo razkuženega skalpela odprli in semena neposredno inicirali na sterilno gojišče. Ker so semena v notranjosti plodu sterilna, razkuževanje posameznih semen ni bilo potrebno. V primeru, da so kapsule že odprte je potrebna površinska sterilizacija semen s kemičnimi sredstvi kot so: raztopina natrijevega hipoklorita v kombinaciji s detergentom (tween 20 ali 80), raztopina kalcijevega hipoklorita, raztopina vodikovega peroksida in dikloroizocianurna kislina (DCCA).

Seme orhidej vzkali 7 do 235 dni po tem, ko ga iniciramo na gojišče s sladkorjem. Celice terminalnega dela se začno hitro deliti in tvorijo meristem. Celice pod meristemom se ne delijo, ampak se le povečujejo. Embrij je sprva hrušaste oblike, nato pa postane okrogel in zapusti semensko ovojnico ali testo. Nastane protokorm iz katerega poženejo številni lasasti rizoidi. Nekaj celic na zgornji strani tvori zametke primordialnega lista. V tej fazi se s pomočjo prokambijskega tkiva povežeta protokorm in nova listna struktura. Nastane prvi list, ki predstavlja ovoj mlade rastline. Prva korenina se tvori znotraj protokorma, ki ga predre na spodnji, bazalni strani (Lee in sod., 2008).

Novonastale rastlinice po potrebi, glede na gostoto rastlinic in glede na izčrpanost gojišča, presajamo. Sledi zadnja faza, ki jo imenujemo aklimatizacija. Gre za proces v katerem rastlinice, ki so zrasle v heterotrofnih razmerah, navajamo na rast v avtotrofnih razmerah.

Ker so orhideje tujeprašne rastline, njihovo razmnoževanje s semeni vodi do nastanka heterozigotnih potomcev, katerih lastnosti so odvisne od starševskih linij (Chugh in sod., 2009). Iz vsakega semena se razvije ena sadika.

Razmnoževanje s pomočjo semena se danes uporablja le v postopkih žlahtnjenja za pridobitev novih križancev. Za masovno produkcijo orhidej se ta način več ne uporablja, saj so razvite tehnike vegetativnega razmnoževanja, s katerimi lahko razmnožimo večje število uniformnih potomcev.

### 3.1.2 Vegetativno razmnoževanje - mikropropagacija

Vegetativno razmnoževanje in ohranjanje rastlin v zaprtih in *in vitro* razmerah se imenuje mikropropagacija. Z mikropropagacijo lahko vegetativno razmnožimo skoraj vse vrste rastlin in ohranimo v vegetativni fazi rastlinske vrste, ki sicer v naravi hitro zaključijo svoj razvoj (Bohanec in sod., 2004).

Razmnoževanje rastlin na tak način lahko poteka veliko hitreje kot klasično razmnoževanje rastlin, omogoča vzgojo rastlin na majhnem prostoru, neodvisno od letnega časa in vzgojo genetsko enotnega materiala - kloniranje (Bohanec in sod., 2004).

Za vegetativno razmnoževanje s pomočjo tkivnih kultur poznamo več poti za regeneracijo brstov: po poti iz apikalnih in aksialnih meristemov in po poti iz adventivnih meristemov, ki lahko nastanejo neposredno iz inokuliranega izsečka ali pa nastopa vmesna faza nediferenciranih celic v obliki celične suspenzije ali kalusa (George in sod., 2008).

Strokovnjaki poskušajo doseči direktno regeneracijo brstov v rastlinice brez vmesnega razvoja kalusa, saj tako znatno zmanjšajo čas od indukcije izsečka do pojava prvih regenerentov ter zmanjšajo možnost samaklonske variabilnosti (Košir in sod., 2004).

Trenutno se v praksi največ rastlin razmnožuje s pomočjo mikropropagacije, po poti iz apikalnih in aksialnih meristemov, saj je možnost genetskih sprememb majhna, uspeh iniciacije pa velik.

Najprimernejša in ekonomsko najdostopnejša metoda za posamezno vrsto, se lahko s časom spreminja. Mikropropagacija bo napredovala z boljšim razumevanjem kontrolnih faktorjev, morfogeneze rastlin in genetske stabilnosti v *in vitro* pogojih (George in sod., 2008).

#### 3.1.2.1 Faze mikropropagacije

- SELEKCIJA IN PRIPRAVA MATIČNIH RASTLIN

Pred začetkom mikropropagacije je potrebna selekcija donorskih rastlin. Donorske rastline morajo imeti tipične lastnosti sorte, ki jo želimo razmnožiti, prav tako pa ne smejo kazati nobenih simptomov bolezni. Optimalne razmere za rast in kemično pred-tretiranje donorskih rastlin lahko izboljšajo rast, morfogenezo in stopnjo razmnožitve v *in vitro* pogojih (George in sod., 2008).

- INICIACIJA KULTURE NA GOJIŠČE

Prva stopnja mikropropagacije je vzpostavitev aseptične kulture odbranih izsečkov, s katero preprečujemo okužbo z bakterijami in mikroorganizmi. Izseček, ki izvira iz donorske rastline, ki je rasla v *in vivo* razmerah, je potrebno pred iniciacijo na gojišče razkužiti. Kontaminacija izsečka je lahko površinska ali notranja. Nekateri avtorji kot predhodno fazo razkuževanja navajajo pomočitev v 70% alkohol, kar odpravi zračne mehurčke, vendar pa lahko močno poškoduje izbrano tkivo (Bohanec, 1992).

Večina avtorjev navaja sterilizacijo tkiv s pomočjo natrijevega hipoklorita (NaOCl) v kombinaciji z detergentom (tween 20 ali 80), ki izboljša omočljivost. Poleg natrijevega se uporablja tudi kalijev hipoklorit. Koncentracija sterilizatorja in čas tretiranja vplivata na stopnjo kontaminacije tkiv pri orhidejah. Mweetwa in sod. (2008) so v svoji študiji ugotovili, da je hipoklorit učinkovitejši pri nižji koncentraciji in krajši izpostavitvi tkiva, kot pri višji koncentraciji.

Za razkuževanje so v uporabi še živosrebrov klorid, raztopina vodikovega peroksida in dikloroizocianurna kislina (DCCA). Po končanem tretiranju izsečkov v razkužilu, večina avtorjev navaja še 3-kratno spiranje izsečkov v avtoklavirani bidestilirani vodi.

Notranje okužbe izsečka se ne da razkužiti s prej omenjenimi postopki. Nekatere bakterijske okužbe lahko odstranimo le s kultiviranjem meristemov in uporabo antibiotikov, ki pa večinoma škodujejo tudi rastlinskemu tkivu (Bohanec, 1992).

Faza iniciacije kulture na gojišče je uspešna, če je preživelo zadostno število sterilnih izsečkov, ki so nadaljevali svojo rast. Torej ni nujno, da faza iniciacije uspe 100% (George in sod., 2008).

- DIFERENCIACIJA OZ. REGENERACIJA

Začetni fazi iniciacije kulture na gojišče sledi rast, ki je lahko organizirana ali neorganizirana. Organizirana rast je, ko del rastline nadaljuje s svojim razvojem ali kadar se organi razvijajo na novo. Za neorganizirano rast v tkivni kulturi je značilno, da se ne tvorijo znani organi in rastlinske strukture in da se diferencira le nekaj celic. Kot primer neorganizirane rasti lahko navedemo kulturo kalusa in celične suspenzije.

Diferenciacija je lahko intracelularna in vodi do specializacije celic ali intercelularna, pri kateri lahko pride do razvoja organov in somatskih embrijev (embrioidov) (Ravnikar, 1996).

- RAZMNOŽEVANJE POGANJKOV

V tej fazi se inokulum povečuje in začne oblikovati nove poganjke, glede na določeno pot razvoja. Postopek je uspešen, če v čim krajšem času zraste čim večje število normalnih poganjkov. Gojišču v tej fazi dodajamo citokinine, medtem ko avksine dodajamo v nižjih koncentracijah ali pa jih izpustimo (Bohanec, 1992). Velika koncentracija citokininov je v tej fazi pomembna, saj so citokinini tisti rastni hormoni, ki premagujejo apikalno dominanco poganjkov in vzpodbujajo rast aksialnih poganjkov (George in sod., 2008).

- PODALJŠANJE IN KORENINJENJE POGANJKOV

Ukoreninjanje poganjkov je zelo pomembna faza pri vsakem *in vitro* razmnoževanju. V nekaterih primerih se formirajo adventivne korenine že na gojiščih za razmnoževanje poganjkov. Te korenine nastanejo iz kalusa in nimajo neposrednega stika s poganjkom, zato sadike kasneje propadejo. Formiranje korenin vzpodbujamo s posebnimi metodami na posebnih gojiščih, običajno z znižano koncentracijo makro- in mikroelementov in brez hormonov oz. z nižjo koncentracijo avksinov (George in sod., 2008).

Če so poganjki, ki jih razmnožujemo premajhni, je potrebno le te pred ukoreninjenjem podaljšati. Velikost poganjkov vpliva tako na koreninjenje kot tudi na poznejšo fazo aklimatizacije (Bohanec, 1992).

Da bi zvišali uspeh in stroške mikropropagacije se mnogi laboratoriji vedno pogosteje odločajo za koreninjenje poganjkov *in vivo*. Še neukoreninjene poganjke prenesejo iz *in vitro* pogojev in jih neposredno gojijo na substratu za aklimatizacijo (George in sod., 2008).

- AKLIMATIZACIJA

Zadnja faza mikropropagacije se imenuje aklimatizacija. Rastline, ki so rasle v heterotrofnih razmerah privajamo na rast v avtotrofnih razmerah. Da je celoten postopek mikropropagacije uspešno zaključen in ekonomsko upravičen, je potrebna uspešna aklimatizacija z velikim odstotkom preživelih vitalnih rastlin (George in sod., 2008).

Gre za najzahtevnejšo stopnjo mikropropagacije, ki je odvisna tako od vpliva predhodnih postopkov v *in vitro* razmerah, kot od dejavnikov v *ex vitro* pogojih v procesu aklimatizacije. Glavni dejavniki, ki jih poskušamo uskladiti pri procesu aklimatizacije so temperatura, substrat, svetloba, kroženje zraka in vlaga.



Orhideje *Phalaenopsis* v fazi aklimatizacije prenesejo v lonce z šotnim mahom, ki jih prenesejo v rastlinjake. Zračna vlaga v rastlinjaku znaša 60%, dnevna temperatura je 30°C, nočna temperatura pa okrog 25°C. Intenziteto svetlobe uravnajo na 500  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  pri 16-urni fotoperiodi (Park in sod., 2002).

Po prenosu v rastlinjake se izvaja enoletni proces fertigacije z raztopino NPK v 10 – 15 dnevni intervalih, ki pospešuje rast mladih rastlinic in vzpodbuja cvetenje falenopsisov (Sinha in sod., 2010).

### 3.1.2.2 Uporabne tehnike za mikropropagacijo orhidej rodu *Phalaenopsis*

Leta 1960 je Morel uvedel vzgojo orhidej rodu *Cymbidium* iz vršičkov poganjkov v *in vitro* razmerah. Od takrat in do danes so strokovnjaki poročali o številnih tehnikah mikropropagacije v raznih rodovih družine Orchidaceae. Do danes se je stopnja razmnožitve znatno izboljšala zaradi uporabe kompleksnejših gojišč in prisotnosti rastnih rastlinskih regulatorjev v gojiščih (George in sod., 2008).

Za razmnoževanje orhidej *Phalaenopsis* se je razvilo mnogo tehnik razmnoževanja *in vitro*, vključno s kulturo cvetnih poganjkov z aksialnimi brsti, meristemi, izsečki cvetnih poganjkov, internodijskih segmentov cvetnih poganjkov, listnih segmentov in koreninskih vršičkov (Tokuhara in Mii, 2001).

V poskusih različnih tehnik je stopnja razmnožitve orhidej lahko različna. V poskusih se lahko izkaže, da določena tehnika ni primerna za *in vitro* razmnoževanje zaradi slabe ponovljivosti, regeneracije in nizkega odstotka preživelih rastlin. Različni genotipi rodu *Phalaenopsis* se lahko različno odzivajo na identične pogoje v gojišču oz. kulturi (Park in sod., 2002). Znanstveniki poskušajo izboljšati *in vitro* tehnike razmnoževanja in pridobiti čim več uniformnih rastlinic v čim krajšem času.

Veliko avtorjev v svojih raziskavah raziskuje razmnoževanje z uporabo tkivnih kultur preko formacije protokormov in PLB-jev oz. protokormu podobnih struktur (Tokuhara in Mii, 2001). PLB-ji so začetne strukture v procesu regeneracije iz različnih tkiv in organov orhidej in po svoji strukturi in načinu rasti v rastlinico spominjajo na protokorme, ki se formirajo pri razmnoževanju s semeni (George in sod., 2008).

Vendar pa večina komercialnih laboratorijev za razmnoževanje orhidej ni naklonjena uporabi PLB-jev zaradi manjše stopnje preživetja in pogostejšega pojava genske variabilnosti (George in sod., 2008).

Preglednica 1: Mikropropagacija orhidej *Phalaenopsis* iz različnih izsečkov

sorta	izbrani izsečki	gojišče	regenerenti	avtor
PP625, PP1068, PP1674, PP1954, PP1985, PP2352, PP2182, PP2439	vršiček poganjka	NDM+ 0.5 $\mu$ M NAA+4.4 $\mu$ M 6BAP+ 29.2 mM saharoza	embriogeni kalus in celična suspenzija, PLB	Tokuhara K. in Mii M. (2001, 2003)
<i>Phalaenopsis</i> sp.	nodiji cvetnih poganjkov	P 6793 (Sigma)+ 2 mg/l BAP+0.5 mg/l NAA; MS+4.41 mg/l BAP; B5+2 mg/l BAP	vegetativni in generativni poganjki, protokormi	Košir in sod. (2004)
<i>P. 'Taisuco Hatarot'</i> , <i>P.</i> <i>Tinny Sunshine 'Annie'</i> , <i>P.</i> <i>Taipei Gold 'Golden Star'</i> , <i>P. Tinny Galaxy 'Annie'</i>	listni segmenti	1/2 MS+ 88.8 $\mu$ M BA+ 5.4 $\mu$ M NAA+ 30 mg/l saharoze+ 10 % CW	PLB	Park in sod.(2002)
<i>Phalaenopsis Blume</i>	listni segmenti	1/2 MS + 2 mg/l BA+0.5 mg/l NAA+ 2% saharoza+ 10% CW	PLB	Sinha in sod. (2010)
<i>Phalaenopsis Little Steve</i>	listni segmenti	1/2 MS +4.54 $\mu$ M TDZ	somatski embriji	Kuo in sod. (2005)
<i>Phalaenopsis amabilis</i> <i>Shimadzu</i> var. Formosa	listni segmenti	1/2 MS + TDZ (0.1, 1, 3 mg/l)+ NAA (0.1, 1 mg/l)	somatski embriji	Chen in Chang (2006)
<i>P. amabilis</i> in <i>P. Nebula</i>	listni segmenti	1/2 MS+ 13.32 $\mu$ M BA ali 13.62 $\mu$ M TDZ	somatski embriji	Gow in sod. (2008, 2009)
<i>Phalaenopsis Richard</i> <i>Shaffer 'Santa Cruz'</i>	PLB, listni segmenti	VW+ 2,4-D (0.1, 1 mg/l)+BA (0.01, 0.1 mg/l)+ 40 g/l saharoza+ gellum gum	kalus, somatski embriji	Ishii Y in sod. (1998)
<i>Phalaenopsis amabilis</i> <i>Shimadzu</i> var. Formosa	protokormi	1/2 MS + TDZ (0.45, 4.54,13.62 $\mu$ M)+ NAA (0.54, 5.37 $\mu$ M)	somatski embriji	Chen in Chang (2004)

### 3.1.2.2.1 Regeneracija rastlin po poti iz apikalnih in aksialnih meristemov

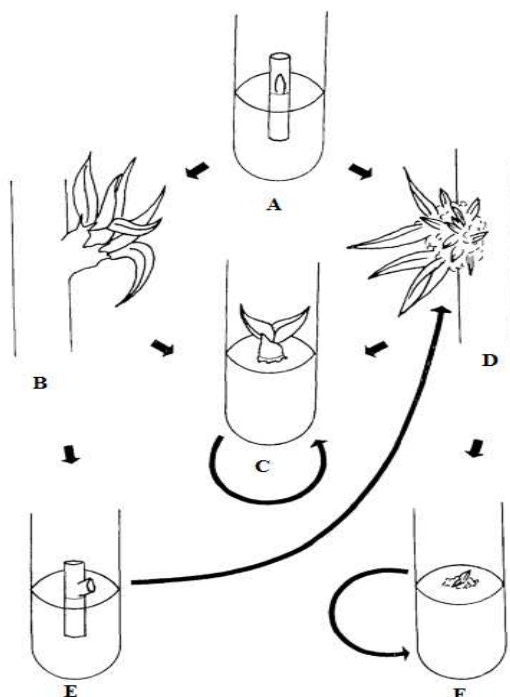
Proces mikropropagacije po poti iz apikalnih in aksialnih meristemov se začne z uporabo vršičkov, odvzetih iz glavnega ali stranskih poganjkov. Kot primarni izseček nam služi vršiček poganjka, lateratni brst ali del stebela na katerem je nekaj brstov oz. nodijev.

Metoda je odvisna od vzpodbujanja zgodnje rasti aksialnih poganjkov z namenom premagati dominanco apikalnega meristema (George in sod., 2008).

Če je postopek pravilno opravljen, nastanejo ob enem vršičku številni novi, kar imenujemo kultura poganjkov. Novonastali poganjki se nato lahko uporabijo kot izsečki za formiranje še večjega števila poganjkov ali pa za formiranje rastlinice, ki je sposobna rasti *in vivo*.

Za razmnoževanje orhidej *Phalaenopsis* strokovnjaki pogosto uporabljajo *in vitro* tehniko, ki se imenuje kultura nodijev. Za to tehniko je značilno, da cvetne poganjke razrežemo na krajše segmente z nodiji. Na vsakem nodiju leži lateratni speči brst, iz katerega se razvijejo vegetativni, generativni regenerenti ali protokormu podobne strukture (George in sod., 2008).

Brsti cvetnih stebel orhidej *Phalaenopsis* kažejo v *in vitro* razmerah tri načine rasti: dormantna, vegetativna in generativna rast. Generativni poganjki se razvijejo iz zgornjih nodijev na stebelu, medtem ko se vegetativni poganjki razvijejo na nodijih, ki ležijo nižje na steblih (Chugh in sod., 2009). Kljub temu pa nekateri avtorji poročajo, da položaj nodijev na cvetnem stebelu ne vpliva na način rasti poganjkov iz brstov (Košir in sod., 2004).



Slika 1: Postopek mikropropagacije s kulturo nodijev. A nodij z dormantnim brstom na segmentu cvetnega stebra; B namnoženi poganjki na nodiju; C ločen poganjek izvorno iz B ali D; D namnoženi poganjki s kalusom, ki se je razvil na nodiju; E subkultiviran poganjek z nodijem primeren za indukcijo kalusa na odrezku nodija; F izoliran kalus in poganjki nastali v kulturi D (Jones in Tisserat, 1990: 188)

Izsečke z nodiji najprej inicirajo na začetno gojišče. Brsti v nekaj dneh nabreknejo in se obarvajo zeleno. V približno 10 - 30 dneh se speči brsti podaljšajo in na izsečkih pojavijo razmnoženi poganjki z dobro razvitimi listi. Če se na izsečkih pojavi kalus, ga je potrebno odstraniti iz kulture nodijev in ga prenesti na gojišče za multiplikacijo kjer ga subkultiviramo tako dolgo dokler ne dosežemo zadostega volumna kalusa (Chugh in sod., 2009). Za subkultivacijo kalusa se uporabljajo gojišča z dodatkom avksina 2,4-D in citokininov TDZ in BA (Chen in sod., 2000).

Novonastale poganjke, na katerih se ne formira kalus je potrebno ločiti od segmentov cvetnega stebela. Pri tem je potrebno, da na segmentu cvetnega stebela pustimo približno 3-5 mm velik odrezek baze nodija, iz katerega se potem v nadaljevanju formira kalus, ki ga lahko namnožimo in uporabimo za indirektno formacijo mladih rastlinic. Regeneracija poganjkov traja približno 6 mesecev.

Poganjke ločene od cvetnega stebela prenesemo na gojišče za razmnoževanje poganjkov. Poganjke subkultiviramo tako, da ločujemo nastale skupke poganjkov v posamezne poganjke dokler ne dosežemo zadostnega števila le teh. Regeneracija v rastlino traja približno 6 mesecev. Formirane rastlinice potem, za približno 3 mesece, prenesemo na posebna brezhormonska gojišča za formiranje korenin (Jones in Tissarat, 1990).

#### 3.1.2.2.2 Regeneracija rastlin po poti iz adventivnih meristemov

Drugi način mikropropagacije iz adventivnih meristemov oziroma tkiv, zahteva diferenciacijo brstov iz že diferenciranih tkiv iz katerih se sicer v naravnih pogojih le ti ne razvijajo. Regeneracija iz sekundarnih meristemov poteka iz različnih delov rastlin, kot so listi, stebela, koreni, korenine itd. (George in sod., 2008).

Do razvoja brstov pride s pomočjo organogeneze ali embriogeneze. V procesu organogeneze se novonastali brsti razvijajo kot unipolarne strukture, ki so večceličnega izvora in so s prevodnimi elementi povezane z matičnim tkivom. V procesu somatske embriogeneze se razvijajo embriju podobne strukture oz. embrioidi iz vegetativnih celic, ki so bipolarne strukture in imajo zasnovo za poganjek in korenine. Somatski embrio na izhodno rastlinsko tkivo ni fizično vezan tako kot adventivni organi, ki nastanejo pri procesu organogeneze.

Park in sod. so leta 2002 poročali o tehniki *in vitro* razmnoževanja orhidej *Phalaenopsis* preko indukcije PLB-jev iz listnih izsečkov, ki so izvirali iz nodijev cvetnega stebela. Z omenjeno tehniko so iz listnih izsečkov v približno 6 mesecih uspeli razmnožiti rastline primerne za aklimatizacijo.

Sinha in sod. (2010) prav tako poročajo o indukciji PLB-jev iz listnih segmentov. Listne segmente so inicirali na 1/2 MS gojišče z 2 mg/l BA, 0.5 mg/l NAA, 2% saharoza in 10% CW za indukcijo PLB-jev, kjer se je po 12. tednih iz 80% kultiviranih izsečkov razvilo 150 - 200 PLB/ kulturo. Po tem je sledila faza namnožitve PLB-jev in razvoja v poganjke. V 8. tednih se je v povprečju namnožilo 600 PLB-jev, ki so jih nato ločili v posamezne skupke z 150. PLB-ji. Skupke so nato prenesli na brezhormonsko gojišče z 2% saharoze in 10% CW kjer so se v 8. tednih namnožili in podaljšali v primerne poganjke. Prišlo je do idukcije sekundarnih PLB-jev na razvitih poganjkih. Sledila je faza subkultivacije na brezhormonsko 1/2 MS gojišče za koreninjenje poganjkov. V 8 tednih se je iz baze poganjkov razvilo 4 - 6 korenin.

V prvih 40 dneh po iniciaciji kulture na gojišče se je v povprečju iz enega izsečka listnega segmenta regeneriralo 960 rastlinic in veliko število PLB-jev. Z večkratnim subkultiviranjem poganjkov na gojišču za koreninjenje in PLB-jev na gojišču za multiplikacijo se število regeneriranih rastlin lahko poveča.

Dobro razvite rastline so potem prenesli v rastlinjak, kjer so jih aklimatizirali in jih pripravljali na cvetenje. Po 12 mesecih bi morale 2 leti stare rastline zacveteti.

Kuo in sod. (2005), Chen in Chang (2006) in Gow in sod. (2008, 2009) v svojih raziskavah opisujejo regeneracijo rastlin *Phalaenopsis* s postopkom direktne somatske embriogeneze. Rastline, ki nastanejo z direktno somatsko embiogenezo v bistvu izvirajo iz ene same celice. Zato je ta metoda primerna tudi za regeneracijo transgenih rastlin, prav tako pa lahko z njo odpravimo formiranje himer (Chen in Chang, 2006).

V raziskavi, ki so jo opravili Kuo in sod. (2005) so se somatski embriji formirali direktno iz površine listnega izsečka in ranjenih regij na izsečku v približno 20 do 30 dneh kultiviranja v temi na 1/2 MS gojišču dopolnjenim z citokininom TDZ. Največ somatskih embrijev se je formiralo na adaksialni površini lista in v bližini odrezanih koncev izsečka. Embriji so se z razvojem povečali in bili skupaj z izsečki preneseni na 1/2 MS gojišča brez rastnih hormonov in pod svetlobo. Pod temi pogoji so se embriji obarvali zeleno in v 45 dneh je prišlo do formiranja poganjkov. Približno po 2 mesecih kultiviranja pod določenimi pogoji, so nastale rastlinice z tremi ali štirimi listi in koreninami. Ocenjujejo, da lahko en listni izseček (1 x 1cm<sup>2</sup>), pod optimalnimi pogoji, producira približno 15 embrijev iz katerih se razvijejo mlade rastlinice. V tej raziskavi je bilo potrebnih približno 4.5 - 5 mesecev, da so iz embrijev formirale mlade rastlinice, ki so jih potem gojili še 2 meseca preden so jih prenesli iz *in vitro* razmer v rastlinjake.

Indukcija somatskih embrijev poteka v temi. Daljša izpostavitve svetlobi se odraža v nižji stopnji embriogeneze in večji stopnji porjavitve embrijev. Kljub temu pa se embriji lahko formirajo tudi pod svetlobo (Gow in sod., 2009).



Slika 2: Direktna somatska embriogeneza iz listnih izsečkov orhideje *Phalaenopsis*. **a** indukcija embrijev na izsečku lista po 2. mesecih kultiviranja v temi; **b** embriji se podaljšujejo in formirajo korenine na brez-hormonskem gojišču 1/2 MS po 2. mesecih subkultive; **c** nastala rastlinica iz embrija (Gow in sod., 2009:511)

Ishii in sod. (1998) so v svoji raziskavi uvedli učinkovit sistem mikropropagacije rastlin rodu *Phalaenopsis* preko indukcije embriogenega kalusa iz listnih segmentov in PLB-jev. Vendar pa za rastline, ki se regenerirajo indirektno preko kalusa, ni zagotovljeno, da ostanejo homogene in da ne pride do pojava samaklonske variabilnosti.

Tokuhara in Mii (2003) sta iz vršičkov cvetnih popkov pridobila embriogeni kalus in celično suspenzijo in ugotovila, da ogljikovi hidrati pomembno vplivajo na somatsko embriogenezo in kulturo celične suspenzije.

### 3.1.2.3 Vpliv citokininov in avksinov na razmnoževanje

Za razmnoževanje orhidej *Phalaenopsis* strokovnjaki uporabljajo osnovna komercialna gojišča, ki jih modificirajo glede na zeleno pot regeneracije mladih rastlin. Največkrat uporabljeno gojišče je MS (Murashige in Skoog, 1962) gojišče. Uporabljajo pa se še gojišča VW (Vacin in Went, 1949), KC (Knudson, 1946), LM (Lindemann in sod., 1970) in Hyponex gojišče (Kano, 1965).

Najpomembnejša sestavina gojišč so rastlinski rastni regulatorji. Koncentracija avksinov in citokininov v gojišču ima največji vpliv na indukcijo, diferenciacijo oz. regeneracijo, razmnoževanje, podaljšanje in ukoreninjenje poganjkov (Ravnikar, 1996).

Citokinini so hormoni, ki pospešujejo indukcijo PLB-jev in somatskih embrijev, pozitivno vplivajo na indukcijo in subkultivacijo kalusa iz protokormov (Chen in sod., 2000) ter formacijo PLB-jev iz koreninskih vršičkov (Park in sod., 2003),

Gow in sod. (2008) so ugotavljali vpliv citokininov 2iP, BA, kinetin, TDZ in zeatin na indukcijo somatskih embrijev. Na vseh gojiščih z dodatkom citokininov so se po 2. mesecih formirali somatski embriji. Kuo in sod. (2005) ugotavljajo, da ima citokinin TDZ najboljši vpliv na direktno embriogenezo, sledita mu citokinina BA in kinetin.

V kombinaciji s citokinini se v gojiščih pojavljajo avksini. Tokuhara in Mii (2001) poročata, da je kombinacija in primerna koncentracija citokininov in avksinov ter sestava makro- in mikroelementov v gojišču odločilnega pomena za uspešno mikropropagacijo orhidej. Ugotovili so, da visoka koncentracija avksina in nizka koncentracija citokininov vzpodbuja rizogenezo, medtem ko visoka koncentracija citokininov v primerjavi z avksini stimulira nastanek brstov. Približno enak odstotek avksinov in citokininov pa vzpodbuja nastanek kalusnega tkiva.

Park in sod. (2002) so ugotavljali vpliv BA na PLB indukcijo v kombinaciji z NAA. Pri nižji koncentraciji BA in NAA ni prišlo do indukcije PLB-jev, čeprav so izsečki v kulturi preživeli kar 12 tednov. Z zvišanjem BA in konstantno koncentracijo NAA se je PLB indukcija povečala.

Avksini 2,4-D, IAA, IBA in NAA močno zavirajo direktno somatsko embriogenezo. Na izsečkih se je ob prisotnosti avksinov v gojiščih pojavljala huda porjavitev, ki se je najbolj očitno kazala na izsečkih v gojiščih z vsebnostjo avksina 2,4-D (Gow in sod., 2008). Chen in Chang (2006) sta poročala, da NAA zavira indukcijo somatskih embrijev tudi v prisotnosti citokinina TDZ v gojišču.

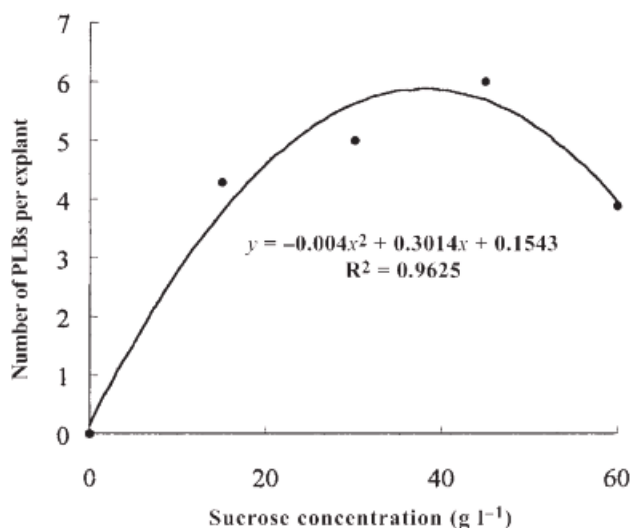
Preglednica 2: Vpliv NAA in TDZ na direktno embriogenezo iz listnih izsečkov orhideje *Phalaenopsis amabilis* po 45. dneh kultivacije na gojišču (Chen in Chag, 2006: 170)

NAA (mg/l)	TDZ (mg/l)	embriogeneza (%)	število embrijev/ izseček
0	0	0.0	0.0
0	0.1	62.5	6.6
0	1.0	71.9	7.5
0	3.0	93.8	19.4
0.1	0	0.0	0.0
0.1	0.1	25.0	1.3
0.1	1.0	43.8	3.5
0.1	3.0	87.5	13.3
1.0	0	0.0	0.0
1.0	0.1	12.5	0.7
1.0	1.0	37.5	2.4
1.0	3.0	81.3	9.1

### 3.1.2.4 Vpliv sladkorjev na indukcijo kalusa in formacijo PLB-jev

Kot vir energije in kot dodatni vir ogljika se v gojiščih za *in vitro* razmnoževanja največkrat uporablja saharoza. Kot alternativni viri se uporabljajo glukoza, fruktoza, sorbiol, manitol, maltoza in drugi (Bohanec, 1992).

Park in sod. (2002) so poskušali optimizirati koncentracijo saharoze za indukcijo PLB-jev iz listnih segmentov. Na gojiščih brez vsebnosti saharoze ni prišlo do formacije PLB-jev. Ugotovili so, da je optimalna koncentracija saharoze za indukcijo PLB-jev 30 mg/l.



Slika 3: Vpliv različne konc. saharoze na regeneracijo PLB-jev iz listnih izsečkov orhideje *Phalaenopsis 'Taisuco Hatarot'* po 12. tednih kultiviranja. Listni izsečki so bili kultivirani na 1/2 MS gojišču z dodatki BA (88.8 mm)+NAA (5.4 mm)+različna konc. saharoze (0, 15, 30, 45 g/l)+7 g/l agarja (Park in sod., 2002: 170)

Visoka koncentracija saharoze v gojišču vodi do odmiranja izsečkov ali do indukcije kalusa na izsečkih. Ob povečanju koncentracije saharoze v gojiščih se poveča indukcija kalusa na račun indukcije PLB-jev (Tokuhara in Mii, 2001).

Ishii in sod. (1998) so poročali, da je optimalna koncentracija za formacijo kalusa 40 g/l. Ko so formirani kalus subkultivirali, so ga prenesli na gojišče brez saharoze. Kalus se je obarval zeleno in začel formirati veliko število PLB-jev.

Ko se kot vmesna faza pojavi kalus, lahko izgubimo mesec ali več za regeneracijo poganjkov, kar je nezaželeno, saj s tem ne skrajšamo časa vegetativne rasti za masovno proizvodnjo orhidej (Košir, 2003).



Danes se strokovnjaki sprašujejo, če so obstoječe kulture, ki vsebujejo agar in sladkorje sploh primerne za nadaljnjo uporabo. Veliko znanstvenikov je sedaj prepričanih, da bi bila rast rastlin v gojiščih boljša ob večji intenziteti svetlobe in manjši koncentraciji ogljikovih hidratov. To široko razširjeno mnenje temelji na dosedanjih opažanjih, da *in vitro* kulture, ki so izpostavljene visoki vlažnosti in sladkorjem preprečujejo možnost fotosinteze v gojiščih. Z novim načinom kultiviranja bi lahko rastline v *in vitro* razmerah s pomočjo fotosinteze nadomestile kar precejšen delež ogljikovih zahtev za rast (Hew in Yong, 2004).

### 3.2 TEŽAVE *in vitro* RAZMNOŽEVANJA ORHIDEJ *Phalaenopsis*

Orhideje *Phalaenopsis* so znane po tem, da izsečki, ki jih izoliramo iz donorskih rastlin, izločajo fitotoksične fenolne snovi na gojišče. Ob močnem izločanju fenolnih izločkov se zmanjša pH vrednost v gojišču, kar ima za posledico utekočinjenje, nekatera hranila pa postanejo nedostopna za rastlino. Težave s toksičnimi izločki najpogosteje rešujejo z pogostimi subkultivacijami kulture na sveže gojišče. Izločanje eksudata v prvih fazah rasti izsečkov lahko omejimo z večkratnim prestavljanjem na sveža gojišča v nekajdnevni razmakih, dokler izločanje ne preneha.

Vpliv fenolnih izločkov v gojišču lahko zmanjšamo z dodatkom aktivnega oglja ali askorbinske kisline v gojišče. Aktivno oglje adsorbira toksične substance, ki se formirajo v gojišču kot posledica avtoklaviranja ali izločanja izsečkov *Phalaenopsis*. Askorbinska kislina ali vitamin C je monosaharidni antioksidant, ki inhibira izločanje fenolov iz izsečkov (Chugh in sod., 2009).

Prenos rastlin iz *in vitro* okolja v rastlinjake predstavlja pri mikropropagaciji orhidej najzahtevnejšo stopnjo. Stopnja preživetja mladih rastlinic je v tej fazi najnižja. Za *in vitro* razmnožene rastline je prenos v rastlinjake zelo stresen, saj so nenadoma razmere za rast bistveno drugačne. Relativna zračna vlaga je manjša, poveča se stopnja osvetlitve in rastline so izpostavljene septičnemu okolju. Aklimatizacijo lahko izboljšamo z predhodnimi postopki utrjevanja mladih rastlinic v *in vitro* razmerah ali s postopki po prenosu v *ex vitro* razmere z zmanjšanjem stopnje transpiracije s pomočjo antitranspirantov (ABA) ali z povečanjem stopnje fotosinteze z povečanjem CO<sub>2</sub> koncentracije (Chugh in sod., 2009).

Za uspešno mikropropagacijo se zahtevajo uniformne rastline, ki imajo enak genski material. Pri *in vitro* razmnoževanju orhidej pogosto pride do pojavnosti samoklonske variabilnosti, ki je posledica visoke stopnje rasti in dolgotrajnega kultiviranja *in vitro*.

#### 4 SKLEPI

Najenostavnejši način razmnoževanja s pomočjo *in vitro* postopkov je vzgoja mladih rastlinic neposredno iz semena, ki sicer v naravnih razmerah kali le ob prisotnosti simbiotske glive. Ker so orhideje tujeprašne rastline, njihovo razmnoževanje s semeni vodi do nastanka heterozigotnih potomcev. Razmnoževanje s pomočjo semena se danes uporablja le v postopkih žlahtnjenja za pridobitev novih križancev. Za masovno produkcijo orhidej se uporabljajo vegetativne tehnike *in vitro* razmnoževanja, ki vodijo do večjega števila kloniranih potomcev z enakimi genskimi lastnostmi.

Orhideje v komercialnih laboratorijih razmnožujejo preko poganjkov, ki se formirajo iz aksialnih brstov, ki tvorijo kulturo poganjkov oz. kulturo nodijev na cvetnem stebelu. Metoda ima manjšo stopnjo razmnoževanja kot tvorba brstov na novo – adventivna organogeneza ali embriogeneza, vendar je zagotovljena visoka stopnja genetske enotnosti.

Največji potencial razmnoževanja ima proces tvorbe somatskih embrijev, ki ga poskušajo znanstveniki avtomatizirati in tako nekoliko zmanjšati stroške, ki nastajajo pri tej metodi razmnoževanja (Ravnikar, 1996). Somatska embriogeneza ima pred drugimi načini razmnoževanja predvsem to prednost, da je vsaj potencialno mogoče razmnožiti veliko število individualnih rastlin z manjšim številom subkultiviranj.

V gojiščih za razmnoževanje s pomočjo organogeneze in embriogeneze je potrebna večja koncentracija rastlinskih hormonov in hranil, saj se v teh primerih adventivni brsti formirajo na novo.

V poskusih se lahko izkaže, da določena tehnika ni primerna za *in vitro* razmnoževanje v tržne namene zaradi slabe ponovljivosti, regeneracije in nizkega odstotka preživelih rastlin.

Orhideje so relativno počasi rastoče rastline, saj lahko njihov razvoj traja več mesecev. Od iniciacije kulture na gojišče in do rastline primerne za aklimatizacijo lahko poteče od 6 do 12 mesecev. Aklimatizirane rastline potem še vsaj eno leto gojijo v rastlinjakih in jih pripravljajo na začetek cvetenja. Po dveh letih *in vitro* razmnožene rastline zacvetijo in postanejo tržno zanimive. Rastline, ki se regenerirajo iz generativnih poganjkov, lahko zacvetijo v krajšem času kot rastline regenerirane iz vegetativnih poganjkov

## 5 VIRI

- Bohanec B. 1992. Tehnike rastlinskih tkivnih kultur. Ljubljana, BF, Oddelek za agronomijo, Center za rastlinsko biotehnologijo in žlahtnenje: 168 str.
- Bohanec B., Javornik B., Strel B. 2004. Gensko spremenjena hrana. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 167 str.
- Chen Y. C., Chang C., Chang W. C. 2000. A reliable protocol for plant regeneration from callus culture of *Phalaenopsis*. In *Vitro Cellular and Development Biology – Plant*, 36: 420-423
- Chen J.T., Chang W.C. 2006. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explant of *Phalaenopsis amabilis*. *Biologia Plantarum*, 50, 2: 169-173
- Chugh S., Guha S., Usha Rao I. 2009. Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants. *Scientia Horticulturae*, 122: 507-520
- George E.F., Hall M.A., De Klerk G.J. 2008. Micropropagation: Uses and Methods. V: Plant propagation by tissue culture. 3rd Edition. UK, Springer: 29-64
- Gow W.P., Chen J.T., Chang W.C. 2008. Influence of growth regulators on direct embryo formation from leaf explants of *Phalaenopsis* orchids. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30: 507-512
- Gow W.P., Chen J.T., Chang W.C. 2009. Effects of genotype, light regime, explant position and orientation on direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* orchids. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31: 363-369
- Hew C.S., Yong J.W.H. 2004. The Physiology of tropical orchids in relation to the industry. 2<sup>nd</sup> ed. Singapore, World Scientific: 370 str.
- Ishii Y., Takamura T., Goi M., Tanaka M. 1998. Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*. *Plant Cell Reports*, 17: 446-450
- Jevšnik T. 2006. Orhideje. Gojenje tropskih orhidej. 1. izd. Dobrovnik, Ocean Orchids d.o.o.: 149 str.
- Jones D., Tisserat B. 1990. Clonal propagation of orchids. V: *Methods in molecular biology*. 6: Plant Cell and Tissue Culture. Pollard J.W. in Walker J.M. (ed.). NJ, The Humana Press: 181-191
- Košir P. 2003. Optimizacija gojišča za vegetativno razmnoževanje orhidej *Phalaenopsis* iz nodijev. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 54 str.
- Košir P., Škof S., Luthar Z. 2004. Direct shoot regeneration from nodes of *Phalaenopsis* orchids. *Acta agriculturae Slovenica*, 83: 233-242

- Kuo H.L., Chen J. T., Chang W.C. 2005. Efficient plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* 'Little Steve'. *In Vitro Cellular and Development Biology – Plant*, 41: 453-456
- Lee Y. I., Yeung E.C., Lee N., Chung M.C. 2008. Embryology of *Phalaenopsis amabilis* var. Formosa: embryo development. *Botanical Studies*, 49: 139-146
- Mweetwa A.M., Welbaum G.E., Tay D. 2008. Effects of development, temperature, and calcium hypochlorite treatment on *in vitro* germinability of *Phalaenopsis* seeds. *Scientia Horticulturae*, 117: 257-262
- Park S.Y., Murthy H.N., Paek K.Y. 2002. Rapid propagation of *Phalaenopsis* from floral stalk-derived leaves. *In Vitro Cellular and Development Biology – Plant*, 28: 168-172
- Ravnikar M. 1996. Rastlinske tkivne kulture. V: Biotehnologija. Osnovna znanja. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 149-164
- Sinha P., Alam M.F., Hakim M.L. 2010. Micropropagation of *Phalaenopsis blume*. V: *Methods in molecular biology*, 589: Protocols for *in vitro* propagation of ornamental plants. Jain S.M. in Ochatt S.J. (ed.). LLC, The Humana Press: 77-85
- Tokuhara K., Mii M. 2001. Induction of embryogenic callus and cell suspension culture from shoot tips excised from flower stalk buds of *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *In Vitro Cellular and Development Biology – Plant*, 37: 457-461
- Tokuhara K., Mii M. 2003. Highly-efficient somatic embryogenesis from cell suspension cultures of *Phalaenopsis* orchids by adjusting carbohydrate sources. *In Vitro Cellular and Development Biology – Plant*, 39: 635-639
- Winkelmann T., Geier T., Preil W. 2006. Commercial *in vitro* plant production in Germany in 1985-2004. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 86: 319-327

## ZAHVALA

Za strokovne nasvete, pomoč in razumevanje se zahvaljujem mentorju prof. dr. Borutu BOHANCU in recenzentu izr. prof. dr. Gregorju OSTERCU.

Za vsestransko pomoč in oporo tekom študija se zahvaljujem svoji družini.