

Diplomsko delo je zaključek Visokošolskega strokovnega študija kmetijstvo – 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:

Predsednica: prof. dr. Katja Vadnal
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

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

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

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana 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.

Nataša Čeranič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD VS
DK UDK 582. 59: 57: 086.83: 631. 523 (043. 2)
KG okrasna orhideja/*Phalaenopsis*/križanje/tkivna kultura/asimbiotsko razmnoževanje/
gojišča/kalitev/razvoj/rast
KK AGRIS F02
AV ČERANIČ, Nataša
SA LUTHAR, Zlata (mentorica)
KZ SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
LI 2010
IN GENERATIVNO RAZMNOŽEVANJE ORHIDEJ *Phalaenopsis* V *IN VITRO*
RAZMERAH
TD Diplomsko delo (Visokošolski strokovni študij)
OP IX, 40 str., 8 pregl., 7 sl., 26 vir.
IJ SI
JI sl/en
AI V poskus asimbiotske kalitve je bilo vključenih 7 komercialnih rastlin iz rodu *Phalaenopsis*, ki so se razlikovale po barvi cvetov, številu cvetnih stebel in cvetov. Izvedenih je bilo 19 kombinacij navzkrižnega in 19 kombinacij recipročnega križanja. Nastalo je 109 cvetov od katerih je bilo 60 oz. 55 % cvetov oprашenih. Semenske glavice je oblikovalo 46 oz. 76,7 % oplojenih cvetov. V 38 oz. v 82,6 % semenskih glavica h so nastala semena. Ta so bila površinsko razkužena z 1,6 % dikloroizocianurno kislino in inokulirana v dveh ponovitvah na komercialno gojišče. Po razkuževanju je bilo okuženih 23,7 % kombinacij semen. Od tega 22,3 % semen s plesnijo, 66,6 % semen z bakterijo in 11,1 % semen s kombinacijo bakterija in plesen. Po 125 dneh inokulacije semen na gojišče je bilo od 38 kombinacij uspešnih 10 kombinacij križanj pri katerih so nastale rastline. Od tega 6 kombinacij navzkrižnih križanj in 4 recipročnih križanj. Največ, 2,8 %, rastlin je nastalo pri navzkrižnem križanju z oznako 17, nekoliko manj, 2,5 %, rastlin je nastalo pri navzkrižnem križanju z oznako 19. V teh dveh kombinacijah križanja je bila rastlina 3 materina rastlina (♀) in rastlina 7 očetova rastlina (♂). Pri ostalih 8 uspešnih kombinacijah navzkrižnega križanja z oznako 13, 14, 16 in 18 ter recipročnega križanja z oznako 2, 3, 5 in 14 je nastalo 1,4 % rastlin oz. manj kot 1,4 %. Pri teh kombinacijah križanja so sodelovale rastline z oznako 1♂, 2♀ oz. ♂, 5♀ in 6♀ oz. ♂. Rastlina z oznako 4 ni bila kompatibilna z nobeno od vključenih rastlin. V primerih, ko je bila materina rastlina, so nastale semenske glavice brez semen, v primerih, ko je bila očetova rastlina, so cvetovi po oprašitvi odpadli.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Vs
DC UDC 582. 59: 57. 086. 83: 631. 523 (043. 2)
CX ornamental orchid/*Phalaenopsis* /crossis/asymbiotic propagation/tissue culture/
culture media/germination/development/growth
CC AGRIS F02
AU ČERANIČ, Nataša
AA LUTHAR, Zlata (supervisor)
PP SI – 1000, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
PY 2010
TI GENERATIVE PROPAGATION OF *Phalaenopsis* ORCHIDS IN *IN VITRO*
CONDITIONS
DT Graduation Thesis (Higher professional studies)
NO IX, 40 p., 8 tab., 7 fig., 26 ref.
LA Sl
AL sl/en
AB Seven commercial plants of the genus *Phalaenopsis* were included in the asimbiotic germination experiment. Plants differed in flower color, number of flower stems and number of flowers. A total number of 19 cross combinations and 19 combinations of reciprocal crosses were made. The result is a total number of 109 flowers, of which 60 or 55 % flowers pollinated. Seed coat was formed in 46 or 76.7 % of fertilized flowers. Seeds were formed in 38 or 82.6 % of seed heads. Seeds were surface disinfected with 1.6 % dichloro isocyanic acid and inoculated in two iterations on a commercial farm. After disinfection, 23.7 % of seed combinations were infected, of which 22.3 % with mold, 66.6 % with bacteria and 11.1 % with a combination of bacteria and mold. After 125 days of seed inoculation 10 out of 38 combinations of crossings were successful and plants emerged, of which 6 cross-combinations and 4 reciprocal crosses. A maximum 2.8 % of plants emerged from cross-crossing under label 17, slightly less, 2.5 % of plants emerged from cross-crossing under label 19. In these two crossing combinations plant number 3 was mother plant (♀) and plant number 7 was the father plant (♂). In the remaining eight combinations of successful cross-crossing labeled 13, 14, 16, 18 and in reciprocal crosses labeled 2, 3, 5 and 14 only 1.4 % or less resulted in emerging plants. These combinations of crossings involved plants labeled 1 ♂, 2 ♀ and ♂, 5 ♀ and 6 ♀ and ♂. Plant under label 4 was not compatible with any other plant involved. In cases where it was the mother plant, seed coat occurred without seeds, in cases where it was the father plant, flowers fell off after pollination.

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 DELA	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 DRUŽINA <i>Orchidaceae</i> – KUKAVIČEVKE	3
2.2 BOTANIČNA KLASIFIKACIJA ORHIDEJ RODU <i>Phalaenopsis</i>	3
2.3 OPRAŠITEV	4
2.3.1 Anatomija cveta	4
2.3.2 Mehanizmi opravevanja	5
2.4 OPLODITEV IN RAZVOJ SEMENA	6
2.5 SKLADIŠČENJE SEMENA	8
2.6 <i>IN VIVO</i> KALITEV – MIKORIZA	8
2.7 <i>IN VITRO</i> KALITEV – MIKROPROPAGACIJA	8
2.7.1 Razvoj sejanca	9
2.7.2 Oblika rasti – habitus	9
2.8 RAZKUŽEVANJE SEMEN	10
2.9 SESTAVA GOJIŠČ	12
2.9.1 Anorganska hranila	12
2.9.1.1 Makrohranila	12
2.9.1.2 Mikrohranila	12
2.9.2 Organska hranila	12
2.9.2.1 Ogljikovi hidrati	12
2.9.2.2 Inozitol	13
2.9.2.3 Vitamini	13
2.9.2.4 Rastlinski hormoni	13
2.9.3 Strjevalci gojišč	14
2.9.4 Ostali dodatki	14
2.9.5 pH vrednost gojišča	14
3 MATERIAL IN METODE	15
3.1 RASTLINSKI MATERIAL	15
3.2 RAZKUŽEVANJE IN INOKULACIJA SEMEN NA GOJIŠČE	16
3.3 SESTAVA IN PRIPRAVA GOJIŠČA	17
3.4 KALITEV IN GOJENJE	18

3.5 BONITIRANJE	18
4 REZULTATI	19
4.1 NAVZKRIŽNO IN RECIPROČNO KRIŽANJE	19
4.2 OKUŽBA SEMEN PO INOKULACIJI NA GOJIŠČE	21
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	32
6 POVZETEK	36
7 VIRI	38

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Opis orhidej <i>Phalaenopsis</i> vključenih v križanja	15
Preglednica 2: Sestava gojišča za kalitev, rast in razvoj orhidej <i>Phalaenopsis</i>	17
Preglednica 3: Število neoprašenih, opršenih, oplojenih in propadlih cvetov pri navzkrižnem in recipročnem križanju orhidej rodu <i>Phalaenopsis</i>	19
Preglednica 4: Kombinacije z nastalimi semeni po navzkrižnem in recipročnem križanju orhidej rodu <i>Phalaenopsis</i>	20
Preglednica 5: Število okuženih petrijevk in vrsta okužbe 6, 14, 22, 41, 50, 65 in 125 dni po inokulaciji	21
Preglednica 6: <i>In vitro</i> kalitev ter rast in razvoj križancev <i>Phalaenopsis</i>	22
Preglednica 7: Število semen, protokormov in rastlin <i>Phalaenopsis</i> na cm ² 125 dni po inokulaciji	24
Preglednica 8: Odstotek nastalih rastlin v uspešnih kombinacijah križanja orhidej <i>Phalaenopsis</i> 125 dni po inokulaciji semen	31

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Zgradba cveta pri orhidejah rodu <i>Phalaenopsis</i> (Orchids board, 2009)	5
Slika 2: Zgradba prašnika in brazda pestiča pri orhidejah (Orchids board, 2009)	6
Slika 3: Oblika rasti orhidej: A – monopodialna in B – simpodialna (29.1.2010)	10
Slika 4: Semenska kapsula in semena orhideje <i>Phalaenopsis</i>	15
Slika 5: Odstotek kalivih semen ter rast in razvoj križancev <i>Phalaenopsis</i> z oznakami križanja od 1 do 6 125 dni po inokulaciji	25
Slika 6: Odstotek kalivih semen ter rast in razvoj križancev <i>Phalaenopsis</i> z oznakami križanja od 7 do 13 125 dni po inokulaciji	27
Slika 7: Odstotek kalivih semen ter rast in razvoj križancev <i>Phalaenopsis</i> z oznakami križanja od 14 do 19 125 dni po inokulaciji	29

SIMBOLI IN OKRAJŠAVE

°C - stopinja Celzija; enota za merjenje temperature po skali, pri kateri je vrelišče vode pri 100 °C

NaClO – natrijev hipoklorit

DCCA – dikloroizocianurna kislina

pH – negativni logaritem koncentracije vodikovih ionov

µg – mikrogram

1 N KOH – 1 normalen kalijev hidroksid

1 N HCl – 1 normalna solna kislina

EDTA – etilendiamin tetraacetna kislina

x g – relativno cetrifugalno polje

r – obrati

µmol m⁻²s⁻¹ - mikromol na kvadratni meter na sekundo

♀ - ženska, materina rastlina

♂ - moška, očetova rastlina

R – rizoid

L – list

K – korenina

KK – kombinacija križanja

N – navzkrižno križanje

R – recipročno križanje

1 UVOD

Orhideje so zaradi raznolikosti barv in cvetov priljubljena rastlinska vrsta. Zanimive so tako kot lončnice kot tudi rezano cvetje. Rod *Phalaenopsis* se prodaja kot lončnica pa tudi kot rezano cvetje, predvsem zaradi dolgih pecljev. Še do nedavnega se je njihovo gojenje zdelo težavno. Večina vrst dobro uspeva v rastlinjakih, nekatere zlahka gojimo doma, mnoge pa uspevajo samo v naravi. Tiste, ki jih najdemo v naravi, so pomemben vir genov za pridobivanje novih križancev, kar se je močno razširilo z razvojem asimbiotskega razmnoževanja s semeni (Trenc-Frelj, 1990).

Orhideje so skupina rastlin, ki imajo zelo majhna semena brez endosperma. Nekatere vrste v polni zrelosti nimajo popolnoma razvitega kalčka. Dolgo je bilo znano, da seme kali le ob prisotnosti mikorizne glive, zato je bila nadomestitev gliv oziroma njihovih produktov z dodanimi hranili velika težava in istočasno velika prednost pri razmnoževanju orhidej s semeni. Že leta 1922 je Lewis Knudson ugotovil, da prisotnost mikoriznih gliv ni potrebna, saj je možna asimbiotska kalitev orhidej (George, 1993). Ta omogoča kalitev in preživetje večjega števila semen oziroma rastlin na manjšem prostoru, kar je z ekonomskega vidika zelo zaželeno. Pozneje je bilo narejenih še mnogo poskusov z različnimi vrstami tropskih orhidej na različnih gojiščih. Nekateri poskusi so zahtevali večletna opazovanja in proučevanja preden so dokončno ugotovili, na katerem gojišču posamezne vrste boljše uspevajo (George, 1993).

V poskus generativnega razmnoževanja orhidej v *in vitro* razmerah smo vključili semena križanj rodu *Phalaenopsis*, ki spada v družino *Orchidaceae* in poddružino *Orchioideae*. To je rastlina, ki ima monopodialno rast s kratkimi stebli, brez pseudobulbilov in različne velikosti ter barve cvetov.

1.1 NAMEN DELA

Orhideje so večinoma tujeprašne rastline, zato je za ohranitev zelenega genotipa primerno vegetativno razmnoževanje. V postopkih žlahtnjenja za pridobitev novega križanca pa je neobhodno generativno razmnoževanje. Ta način razmnoževanja orhidej je zelo težaven, ker seme kali le ob prisotnosti ustrezne simbiotske glive. Mikorizo lahko s tehnikami tkivnih kultur uspešno nadomestimo s primerno sestavo gojišč in gojitvenimi razmerami. Namen dela je bil preučiti, kako uspešno bodo semena različnih kombinacij križanj iz rodu *Phalaenopsis* inokulirana na ustrezno kalitveno gojišče kalila in se razvila v vitalne rastline.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Potrditi primernost umetne oprašitve in generativnega razmnoževanja v *in vitro* razmerah ter z navzkrižnim in recipročnim križanjem ugotoviti razlike med obema ter odstotek uspešnih kombinacij križanj orhidej *Phalaenopsis* z nastalimi rastlinami.

2 PREGLED OBJAV

2.1 DRUŽINA *Orchidaceae* – KUKAVIČEVKE

Kukavičevke (*Orchidaceae*) so poleg košaric (*Asteraceae*) in trav (*Poaceae*) največja družina med cvetnicami na svetu. Cenijo, da družino kukavičevk sestavlja približno 750 različnih rodov z 20000 do 30000 vrstami. Število pripadnikov te družine povečujejo številni križanci, ki so jih vrtnarji vzgajali v okrasne namene (Arditti, 1992).

Orhideje so večinoma tujeprašnice. Največje število orhidej najdemo na gorskih predelih tropskega pasu, kjer so ponoči nizke temperature in zelo visoka relativna zračna vlaga. Uspevajo skoraj na vseh kontinentih, razen na Antarktiki, odmaknjenih otokih in morjih. So eksperti preživetja, ki so trdoživi in uspevajo tudi v najbolj neugodnem okolju (Rittershausen W. in Rittershausen B., 1999). V Sloveniji rastejo le orhideje terestičnega tipa iz rodov *Cypripedium* (lepi čeveljc), *Nigritella* (murka), *Orchis* (kukavice), *Ophrys* (mačje uho) itd. (Martinčič in sod., 1999). Na območju Krasa, toplega predela Goriških Brd in Slovenske Istre najdemo do 30 različnih vrst.

Družina *Orchidaceae* je razdeljena na dve poddružini (*Cypripedioideae* in *Orchidoideae*). Orhideje rodu *Phalaenopsis* spadajo v poddružino *Orchidoideae* in izvirajo iz območja med Indijo, severno Avstralijo in Filipini, kjer temperature le redko zdrsnejo pod 18 °C.

2.2 BOTANIČNA KLASIFIKACIJA ORHIDEJ RODU *Phalaenopsis*

DEBLO: *Spermatophyta* – semenke,
PODDEBLO: *Magnoliophytina (Angiospermae)* – kritosemenke,
RAZRED: *Liliopsida (Monocotyledoneae)* – enokaličnice,
PODRAZRED: *Liliidae*,
NADRED: *Orchidanae*,
RED: *Orchidales* – kukavičevci,
DRUŽINA: *Orchidaceae* – kukavičevke,
PODDRUŽINA: *Epidendroideae*,
PLEME: *Vandaeae*,
PODPLEME: *Sarchantinae*,
ROD: *Phalaenopsis*,
VRSTA: hibrid.

Ime *Phalaenopsis* izvira iz grških besed *phalaina* (molj) in *opsis* (izgled) kar se nanaša na tipično obliko cveta (McKenzie Black, 1999). Izhajajo iz daljnega vzhoda, še posebej so zastopane na območjih Indije, Indonezije, severne Avstralije in Filipinov. Rod *Phalaenopsis* združuje 66 vrst (Christenson, 2001). Imajo monopodialno rast s kratkimi stebli in brez pseudobulbilov. Rastejo predvsem na obrobju gozdov, kjer so dobro zaščitene pred sončnimi žarki z listi dreves. Imajo mesnate liste, tesno drug poleg drugega, močne korenine in velike cvetove. Za normalno rast in razvoj so pomembne konstantne tople in vlažne razmere ter porozen substrat. Ob premočni svetlobi pa pogosto prihaja do ožigov, zato je orhidejam potrebno zagotavljati ustrezno osvetlitev. V zadnjih dveh desetletjih se je priljubljenost tega rodu hitro povzpela na prvo mesto, predvsem zaradi več tisoč križancev najrazličnejših oblik in barv cvetov, preprostega gojenja in izredne prilagoditve na bivalne rastne razmere (Rittershausen W. in Rittershausen B., 1999).

2.3 OPRAŠITEV

2.3.1 Anatomija cveta

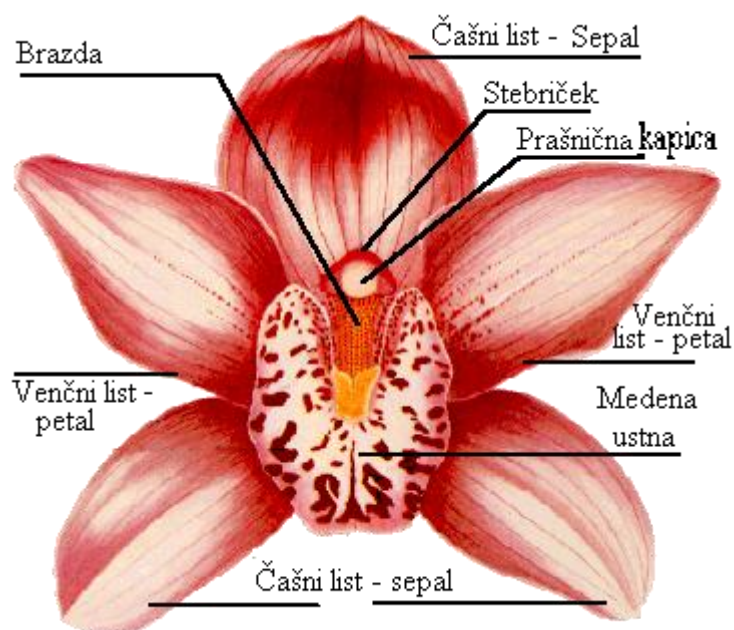
Struktura cveta orhidej je unikatna med cvetnimi rastlinami. Zgradba cvetov se razlikuje po številu prašnikov, pelodu in načinu opráševanja.

Za cvet kukavičevk je značilno, da ima tri zunanje čašne liste (sepal), tri notranje venčne liste (petal), v centru cveta je stebriček (gimnostemij), ki nosi reprodukcijske moške in ženske spolne organe. Čašni in venčni listi so pri orhidejah obarvani, medtem ko so pri ostalih cvetočih rastlinah čašni listi večinoma zeleni in so obarvani le venčni listi. Čašni listi pri orhidejah ščitijo notranje dele cveta. Ko se rastlina razpre, se čašni listi povečajo in obarvajo. Pri večini vrst so čašni listi enake velikosti in so podobni venčnim (slika 1).

Za cvetove orhidej je značilno, da so v vertikalni ravnini razdeljeni na dve enaki polovici, so somerni. Celotna oblika cveta je dvostransko simetrična (zrcalna podoba leve in desne strani), kar je nujno za zanesljivo oprášitev s čebelami. V notranjem delu obroča so trije venčni listi. Najnižji je ponavadi močno razvejan in najbolj obarvan. Imenuje se medena ustna ali labelum in je glavna privlačnost za oprášitev s strani žuželk, saj je navadno podaljšana v ostrogo, v kateri so nektarne žleze. V cvetovih, ki nimajo ostroge, so te žleze v zadnjem delu medene ustne ali pa jih sploh ni. Ostala dva venčna lista sta ponavadi nameščena drug čez drugega na horizontalni osi in sta nabolj spremenljiva od vseh cvetnih delov. Pri nekaterih vrstah so venčni listi široki, pogosto nagubani in močno obarvani (slika 1) (Kramer, 1997).

Nekatere orhideje imajo dva prašnika. 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 (slika 1, 2) (Kramer, 1997).

Veliko tropskih orhidej oprahuje le ena vrsta čebel (*Englossime*), nekaj pa tudi muhe, molji, metulji, kolibriji in celo netopirji.



Slika 1: Zgradba cveta pri orhidejah rodu *Phalaenopsis* (Orchids ..., 2009)

2.3.2 Mehanizmi oprahujevanja

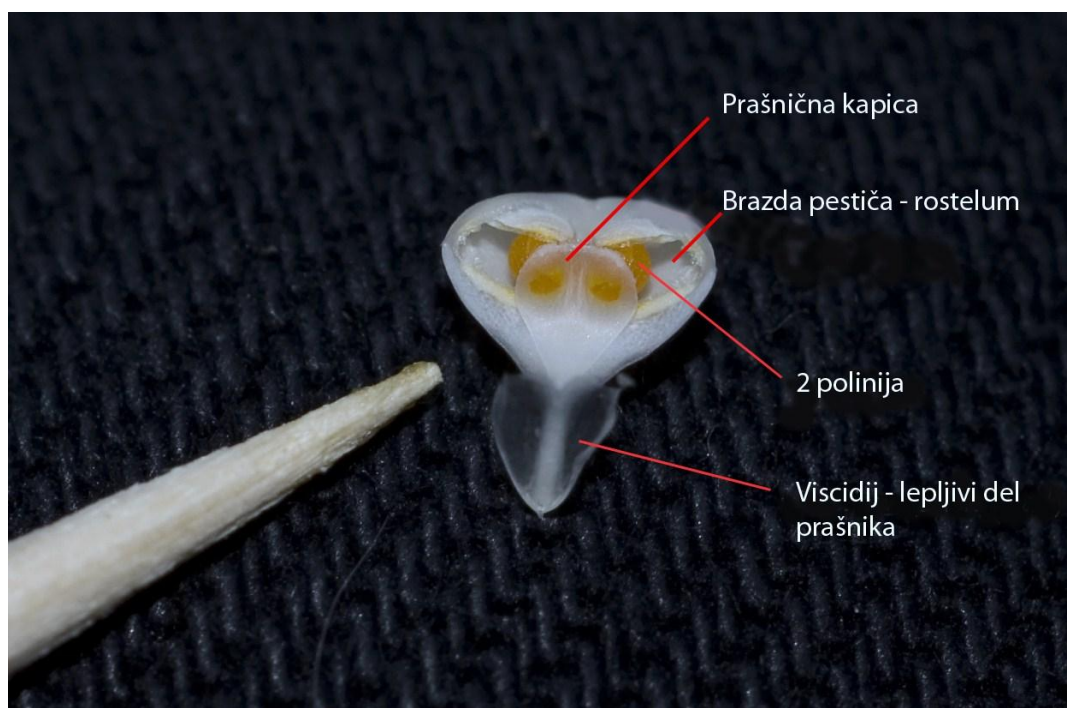
Orhideje so razvile zelo specializiran način oprahujevanja. Dolgo cvetoči cvetovi so lahko odprti nekaj dni ali celo teden ali več, preden pride do oprahujevanja. Ko pa se to zgodi, je oplojenih tudi do štiri milijone jajčec v enem cvetu, odvisno od vrste (Arditti, 1992). Če cvetovi dišijo in so sveži, je to najboljši čas za oprahujevanje (Hicks, 2000).

Večina orhidej je alogamnih, obstajajo pa tudi avtogamne in kleistogamne, majhen odstotek pa je apogamnih. Glavni vektor pri oprahujevanju alogamnih kukavičevk so žuželke. Nekatere vrste orhidej (predvsem vrste iz rodu *Ophrys*) imajo cvetove podobne samicam žuželk, zato privabljajo le samce, ki so edini oprahujevalci. Poleg oblike in barve, ki spominja na samico, izločajo cvetovi tudi podobne snovi, kot jih izločajo samice v času parjenja. S tem privabljajo oprahujevalce na daljavo. Na cvetu se oprahujevalci usmerjajo po

optičnih znakih. Dlakavost ustne in vzorci izzovejo ob dotiku pri samcih paritveni nagon, pri tem samci poberejo cvetni prah - pelod in ga nato odnesejo na drug cvet.

2.4 OPLODITEV IN RAZVOJ SEMENA

Tipičen proces opraitve se prične, ko se samci oziroma specifična žuželka namesti na cvet in se dotakne spodnjega, lepljivega dela prašnika (viscidij), ki se ji zalepi na glavo ali hrbtni del. S hitrim refleksom umika odtrga polinije, ki so skriti pod kapico, in odleti na drug cvet. S telesom oplazi stebriček in poliniji se prilepijo na lepljivo brazdo, kar predstavlja opraitev. Na poti ven se zopet dotakne polinijev tega cveta in jih odnese na drugi cvet (slika 2) (Delforge, 1995).



Slika 2: Zgradba prašnika in brazda pestiča pri orhidejah (Orchids ..., 2009)

Ko pade pelodno zrno na brazdo pestiča, se prične proces oploditve. Ko pelodna cev s spermalnima celicama doseže plodnico, se spolni celici združita in tvorita zigoto, ki je prva celica sporofitne generacije (Moore in sod., 1998). Pri višje razvitih orhidejah druga spermalna celica degenerira in se sploh ne združi s polarnim jedrom, kar prepreči rast sekundarnega endosperma. V primeru, da se celice le združijo, jim sledi le nekaj celičnih delitev, nato pa se proces ustavi (Arditti, 1992). Zato je zrelo seme sestavljeno le iz embrija in teste (Pridgeon, 1999). Zigota se začne deliti 2 do 30 dni po oploditvi. Pri večini orhidej je prva delitev ponavadi transverzalna, kjer nastaneta bazalna in terminalna celica. Ta delitev polarizira embrij na zgornji del, iz katerega se bo razvil poganjek, in spodnji del, iz

katerega se bo razvila korenina. Obstaja več različnih tipov oblikovanja embrija, kar je odvisno od vrste (Arditti, 1992).

Pri večini rastlin je embrionalno tkivo na začetku razvoja nediferencirano, do zrelosti pa se tkiva specializirajo. Zrel embrij ima primarni endosperm, protoderm (bodoča povrhnjica), prokambij (bodoči prevajalni sistem), bazalni meristem, apikalni meristem in klične liste. Pri orhidejah temu ni tako, saj ima tudi zrel embrij nediferencirano tkivo (Arditti, 1992). Celice embrija so različno velike, kar je odvisno od njihove lokacije. Meristemski del je zgrajen iz manjših celic (premera 8 – 10 μm), ostale pa so večje. Vse celice vsebujejo zaloge hrane v obliki lipidnih in beljakovinskih telesc. Škrobnih telesc je malo ali pa jih sploh ni (Arditti, 1992).

Ob razvoju semenske glavice ni nujno, da je seme tudi že dozorelo, kajti pri posameznih vrstah je popolnoma dozorelo šele ko glavica počni. Semena orhidej so zelo majhna, lahka in vsebujejo običajno še nedozorel embrij znotraj perikarpa (George, 1993). Dozorevanje semena traja od 7 tednov do enega leta, odvisno od posamezne vrste. V plodu, ki se pri orhidejah imenuje semenska glavica oziroma kapsula, se razvije od 20 do 50 lahko tudi do 4 milijone semen (Arditti, 1992). Dolga so od 0,05 do 6,0 mm in široka od 0,01 do 0,9 mm. Teža semen se giblje od 0,31 do 24 μg . Testa ali semenska lupina je večinoma transparentna in ima veliko večji volumen kot embrij, ki ga varuje pred poškodbami. Zaradi majhne specifične mase lahko semena lebdijo v zraku in prepotujejo ogromne razdalje. Zunanja plast teste je relativno vodoodporna, kar omogoča dolgotrajno plavanje na vodi (Arditti in Ghani, 2000).

Rastline v zaprtem prostoru se ne morejo naravno oprašiti, zato jih oprašimo umetno. Umetna oprašitev se izvede po istem postopku, kot bi cvet oprašile žuželke. Umetna oprašitev ima še to prednost, da se lahko izvede kadarkoli ko je cvet odprt.

Nekatere vrste orhidej lažje oprašimo kot druge. Postopek opraševanja se začne z odbiro starševske materine rastline, ki bo oblikovala semensko glavico in odbiro očetove rastline, ki bo prispevala pelod. Če imamo dve rastlini in ima ena večje cvetove kot druga, se ta uporabi za darovalko starševskega peloda. To pa zato, ker pelod manjšega cveta ne oblikuje vedno dovolj dolge pelodne cevi, ki bi lahko dosegla plodnico gostiteljske rastline. Nato rastlini, ki bo nosilka semenske glavice, odstranimo prašnično čepico in polinije, če jih ne bomo uporabili za recipročno križanje. Prav tako se odstrani prašnična čepica darovalki peloda. Za konec pregledamo, ali uporabljamo zdrav material, nato pa z roko držimo cvet in namestimo polinij na brazdo, iz katerega se bo kasneje oblikovala semenska glavica (Hicks, 2000).

2.5 SKLADIŠČENJE SEMENA

Skladiščenje semen je zelo zahtevno. Dobro je, da seme zaščitimo pred visoko vlago, ki povzroča razvoj glivičnih bolezni, in visoko temperaturo. Obe negativno vplivata na kalitev semen. Po drugi strani pa nekatere orhideje po daljšem namakanju boljše kalijo.

Semena tropskih orhidej se shranjuje pri temperaturi 4 °C in pri 5 % relativni zračni vlagi ali se seme samo posuši in shrani v hladilnik pri 4 °C. Semenu, ki v hladnem in vlažnem skladišču hitro propade, se doda brezvodni kalcijev klorid oziroma silika gel.

2.6 *IN VIVO* KALITEV – MIKORIZA

Semena orhidej so zelo majhna in imajo malo sekundarnega endosperma ali pa ga sploh nimajo, zato potrebujejo za kalitev in razvoj potrebne simbiotske glive. Kukavičevke *Orhidaceae* imajo razvito orhidejsko mikorizo. Nujno je, da se simbioza vzpostavi zelo hitro po kalitvi semen (Sinkovič, 2000).

Mikoriza je sožitje ali simbioza rastlinskih gliv in korenin. Simbioza je povezano življenje dveh organizmov različnih vrst, od katerih imata oba organizma vsaj začasno korist. Mikorizne glive tvorijo v tleh splet nitastih hif, ki ga tvorijo miceliji. Poznamo dve vrsti mikoriz, endotrofno in ektotrofno mikorizo. Pri endotrofni mikorizi hife gliv prodrejo v rastlino. Pri ektotrofni pa se hife gliv naselijo na površini korenin.

Mikorizo največkrat najdemo na negojenih tleh, na katerih uspeva tudi veliko vrst kukavičevk. Korenine, ki jih naselijo glive, so brez koreninskih laskov, ker njihovo funkcijo sprejema vode in mineralnih snovi iz tal prevzamejo glive. Mikorizne glive dajejo rastlinam predvsem mineralna hranila in vodo, same pa črpajo iz korenin ogljikove hidrate in druge organske spojine. Predvsem se poveča sprejem fosforja in dušika. Med njima nastopi tudi hormonska izmenjava. Gliva producira citokinine, ki vplivajo na nastanek korenin, korenine rastlin pa izločajo citokinine in avksine, ki pospešujejo razvoj micelija in sprejem ionov (Sinkovič, 2000). Orhideje v naravi največkrat okužijo mikorizne glive iz rodov *Rhizoctonia*, *Tulasnella* in *Ceratobasidium*.

2.7 *IN VITRO* KALITEV – MIKROPROPAGACIJA

Mikropropagacija je osnovna tehnika biotehnologije, kjer s tem izrazom ne mislimo na nič drugega kot razmnoževanje (kloniranje) rastlin v zaprtih *in vitro* razmerah. Z mikropropagacijo želimo doseči čim večjo stopnjo razmnožitve poganjkov v eni subkulturi. Rezultat je rastlina, ki smo jo s temi metodami razvili in razmnožili. Poganjki navadno zrastejo v enem mesecu toliko, da jih lahko razdelimo na več delov; na koliko, je

odvisno od vrste in velikosti poganjka. Rast poganjkov uravnava predvsem rastlinski hormoni, ki so sestavina gojišča.

Mikropropagacija ima več faz. V prvi inokuliramo izseček izhodiščne rastline, v drugi ga razmnožimo v obliki poganjkov, v tretji te poganjke ločimo in ukoreninimo ter v četrti prilagodimo na rast v nesterilnih razmerah, na prostem.

Pri nekaterih rastlinah, zlasti pri orhidejah, je možno bolj preprosto pridobivati sadike neposredno iz semena. Seme orhidej je tako drobno, da v rastlinjaku navadno ne vzklje. Za vznik potrebuje v gojišču dodana hranila. Če razmnožimo orhideje iz semena, seveda niso vsi potomci enaki, temveč variirajo odvisno od starševskih lastnosti (tujeprašnica). Orhideje pa lahko tako kot druge rastline z mikropropagacijo tudi kloniramo. V tem primeru so sadike popolnoma enake izhodiščni rastlini. Mikropropagacija se največ tržno uporablja prav pri okrasnih rastlinah, ker prenesejo nekoliko večje stroške pridelave (Bohanec, 2004).

2.7.1 Razvoj sejanca

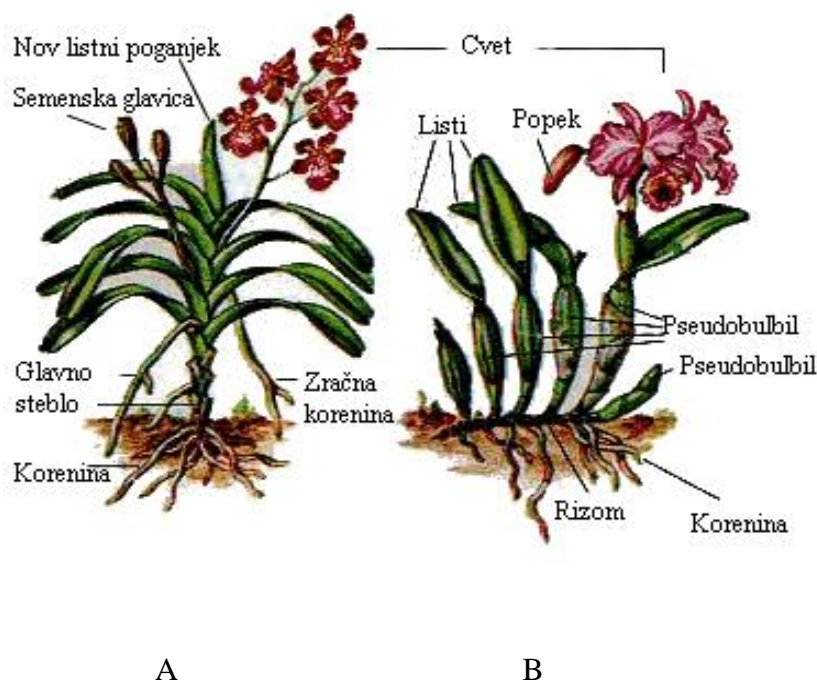
Razvoj sejancev *in vitro* lahko traja od 50 do 724 dni, za nadaljnji razvoj *in vitro* je potrebnih še 4,2 do 31,5 mesecev, odvisno od vrste. Sejančki lahko prvič zacvetijo po enem letu ali po 11 letih (Arditti, 1992). Glavni problem pri razvoju novih križancev predstavlja dolgo časovno obdobje, ki je potrebno za indukcijo prvega cvetnega poganjka (Duan in Yazawa, 1995).

2.7.2 Oblika rasti – habitus

Orhideje delimo po načinu rasti na epifite, za katere je značilno, da rastejo v tropskih predelih na drevju, na koreninskih izboklinah in na kamenju. Te orhideje niso paraziti, saj od svojih gostiteljev ne sprejemajo hranil in vode. Drugi tip orhidej po načinu rasti so talne oziroma geofitne (terestične), ki rastejo v zmernih podnebnih pasovih in so nekoliko manj zahtevne od epifitskih.

Epifitske orhideje delimo v dve glavni skupini glede na razrast nadzemnih delov, in sicer na monopodialne in simpodialne (Ravnik, 2002). Monopodialne so rastline, katerih rast stranskih poganjkov je popolnoma podrejena glavnemu poganjku in rastejo navzgor nekoliko povešujoče. Rast je nedeterminirana, saj se steblo podaljšuje z vsakim novim listom (Pridgeon, 1999). Steblo teh orhidej je zelo kompaktno. Sem uvrščamo tudi orhideje iz rodu *Phalaenopsis* (slika 3A).

Simpodialne orhideje tvorijo ponavadi pseudobulbule, to so odebeljena stebila, ki služijo za shranjevanje hranilnih snovi in vode (Kramer, 1997). Rastejo šopasto in ob osnovi starega poganjka se oblikuje nov poganjek. Stari del postopoma odmre. Razmnoževanje pri taki obliki rasti je s stransko rastočimi poganjki (slika 3B).



Slika 3: Oblika rasti orhidej: A – monopodialna in B – sympodialna (*Phalaenopsis* ..., 2010)

2.8 RAZKUŽEVANJE SEMEN

Pred inokulacijo na gojišče je razkuževanje zelo pomembna faza mikropropagacije. Od uspešnega razkuževanja je odvisen celoten nadaljnji potek dela. Ker so semena orhidej zelo majhna, zahtevajo posebne postopke razkuževanja. Semena kljub krhkosti dobro prenašajo površinsko razkuževanje z različnimi kemičnimi snovmi. Razkužujemo jih na način, ki bo preprečil okužbo, vendar bo embrij kljub vsemu ostal nepoškodovan. Za razkuževanje se največkrat uporablja raztopina kalcijevega hipoklorita, ki je kemično nestabilna raztopina. Pogosto se uporabljata tudi raztopini natrijevega hipoklorita in vodikovega peroksida (Hicks, 2000). Natrijev hipoklorit je tekočina, ki sčasoma razpade. Kalcijev hipoklorit je trdna snov, ki jo je potrebno pred uporabo raztopiti in prefiltrirati (Bohanec, 1992). Prvi korak sterilizacije je namestitev semena v epruveto. Pripravimo primerno sterilno raztopino. Raztopino kalcijevega hipoklorita zmešamo z vodo v erlenmajerici, ki smo jo predhodno 20 minut avtoklavirali in ohladili. Semena damo v

epruveto in temeljito pretresemo, da vlaga pride do suhih semen. Po 10 minutah tresenja pustimo epruveto 5 minut, da se umiri. Potem jo odpremo in semena, ki so se dvignila na površino tekočine, s pipeto prenesemo na pripravljeno gojišče (McKenzie B., 1999). V našem poskusu smo uporabili dikloroizocianurno kislino natrijeve soli proizvajalca Sigma v koncentraciji 16,6 g/l avtoklavirane destilirane vode z dodatkom močila Tween 20.

Hicks (2000) predstavlja različne tehnike razkuževanja semen, kot so večkratno spiranje, filtriranje, odcejevanje. Kot prvo omenja tehniko večkratnega spiranja, kjer damo v epruveto manjšo količino semen in dodamo 5-15 ml natrijevega hipoklorita. Epruveto zapremo in pretresamo 5-15 minut. Tresenje večkrat prekinemo. Tik preden je razkuževanje končano, prenehamo tresti. S pipeto odstranimo raztopino. Nadomestimo jo s sterilno destilirano vodo in ponovno pretresemo. Spiranje z vodo lahko večkrat ponovimo, da odstranimo razkuževalno raztopino. Nato semena s pipeto prenesemo na gojišče. Pri tehniki filtriranja se za ločevanje semen od razkuževalne raztopine uporabljajo erlenmajerica, cedilni lij in filtrski papir. Cedilnik in filtrski papir razkužimo z avtoklaviranjem. Cedilni lij in filtrski papir namestimo na erlenmajerico ter z nekaj kapljicami raztopine navlažimo filtrski papir. Dodamo semena in razkuževalno raztopino. Pustimo, da raztopina odteče in s pipeto dodamo destilirano vodo, s katero speremo semena. Počakamo, da voda odteče. Spiranje semen z vodo lahko večkrat ponovimo. Semena s filtrirnega papirja lahko odstranimo na več načinov: z razkuženo pinceto jih prenesemo na gojišče, preostala semena pa speremo z destilirano vodo, lahko pa filtrirni papir z razkuženo pinceto prenesemo v razkuženo petrijevko in dodamo destilirano vodo, da odstranimo semena s papirja in jih nato prenesemo na pripravljeno gojišče. Mešanico semen in raztopine tresemo 10-15 minut in semena brez filtriranja odcedimo na gojišče. Ta tehnika se bolje obnese pri večjih semenih (Hicks, 2000).

Na področju razkuževanja semen ni večjih novosti. Pogosto se za razkuževanja semen orhidej uporablja dikloroizocianurna kislina (DCCA). Tretiranje semen z raztopino 300-500 ppm DCCA z 20-minutnim tresenjem je prineslo dobre rezultate. Koncentracija je uspešna pri razkuževanju delov rastlin za gojitev v tkivni kulturi, ko so dele rastlin spirali od 24 do 48 ur. Hicks (2000) je dobil dobre rezultate pri razkuževanju semen v raztopini 3,0 do 5,0 g DCCA/l destilirane vode. Pri močni raztopini DCCA je pH rahlo kisel (Hicks, 2000).

Jevšnik (2002) je uvedel v postopek 8 minutnega razkuževanja pri sobni temperaturi in še 2 minutno hladno centrifugiranje pri 4 °C in 4000 obratih/minuto ter 3 kratno hladno 2 minutno spiranje s centrifugiranjem.

Uspeh *in vitro* gojenja je v veliki meri odvisen od pravilne sestave gojišča, ki mora biti prilagojena rastlinski vrsti, vrsti izsečka in končnemu cilju. Za orhideje je znano, da bolje uspevajo na skromnejših gojiščih s polovično oziroma tretjinsko sestavo hranil.

2.9 SESTAVA GOJIŠČ

2.9.1 Anorganska hranila

K anorganskim hranilom prištevamo soli in vodo. Za pripravo gojišč uporabljamo bidestilirano vodo oziroma dvakrat destilirano vodo, ki zagotavlja večje uspehe pri gojenju rastlin.

2.9.1.1 Makrohranila

Makroelementi so tako kot mikroelementi zelo pomembni za rast in razvoj rastlin. K makroelementom prištevamo dušik, fosfor, kalij, žveplo, kalcij in magnezij. Pri gojenju orhidej se dušik uporablja v amonijski (NH₄), nitratni (NO₃) in organski obliki (aminokislina, urea in njene sestavine). Rastlini je bolj dostopna nitratna oblika dušika, vendar šele, ko je dosežena neka stopnja razvoja, v kateri začno delovati encimi. Zato je pri kalitvi priporočljivo dodati tudi amonijsko obliko.

2.9.1.2 Mikrohranila

K mikroelementom uvrščamo mangan, cink, baker, molibden in bor ter železo. Mikrohranila so zelo pomembna za rast in razvoj v majhnih količinah, zato jih enostavno skupaj raztopimo v založno raztopino (Thompson, 1996).

2.9.2 Organska hranila

2.9.2.1 Ogljikovi hidrati

Pri sestavi gojišča je največkrat edini vir energije ter dodatni vir ogljika v kulturah *in vitro* saharoza. To je disaharid, sestavljen iz monosaharidov α -glukoze in α -fruktoze. Med avtoklaviranjem del saharoze razpade v fruktozo in glukozo, še posebej v kislih raztopinah, kot so gojišča za gojenje orhidej, kjer pH niha med 5,2 in 5,6. Arditti in Ernst (1967, cit.po Hicks, 2000) navajata, da različni sladkorji različno vplivajo na *in vitro* rast hibridov *Dendrobium* in *Phalaenopsis*. V obeh primerih se je saharoza izkazala kot najprimernejši sladkor pri razvoju korenin in listov.

2.9.2.2 Inozitol

Poznamo ga tudi kot mio-inozitol. Dodaja se skoraj v vsa gojišča. Uporablja se za pospešeno rast, saj sodeluje pri sintezah in izgradnji celičnih sten. Po učinku in delovanju ga lahko prištevamo med vitamine, po kemični strukturi pa med pentoze. Najdemo ga veliko v kokosovem mleku.

2.9.2.3 Vitamini

V celičnem soku so rastni dejavniki – vitamini, ki jih tvorijo le rastline in mikroorganizmi. So spojine, ki so za življenje nujno potrebne in se nahajajo v hrani v zelo majhnih količinah. Zato jih moramo dodajati gojiščem, saj brez njih ne more potekati noben proces v rastlini. Kot vir vitaminov se lahko za gojenje orhidej dodajata bananin ekstrakt in kokosovo mleko. Kot čisti vitamini se dodajajo tiamin (B1), nikotinska kislina (B3) in piridoksin (B6).

2.9.2.4 Rastlinski hormoni

V tkivni kulturi sta najpomembnejši skupini hormonov avksini in citokinini. Pri *in vitro* gojenju orhidej se dodajajo v gojišča v izredno nizkih koncentracijah oziroma jih popolnoma izpustimo, odvisno od cilja gojenja. Poznamo več vrst avksinov, med katerimi so najpomembnejši:

- indol očetna kislina (IAA),
- α -naftalen očetna kislina (NAA),
- indol maslena kislina (IBA),
- 2,4 – diklorofenoksiocetna kislina (2,4-D).

Avksini so pomembni za indukcijo celičnih delitev, rast celic in pospešujejo koreninjenje.

Med citikonine pa uvrščamo:

- zeatin in zeatin ribozid,
- N(6)- δ -izopentenil adenin (2iP),
- 6 – benzilamino purin (BAP),
- kinetin (6 – furfurilamino purin) (KIN),
- tidiazuron (TDZ).

Citokinini pospešujejo delitev celic in nastanek kalusa, poganjkov ter služijo kot zaviralci nastanka adventivnih korenin.

2.9.3 Strjevalci gojišč

Najpogosteje uporabljeno sredstvo za strjevanje gojišč je agar. Sestavljen je iz 70 % agaroze in 30 % agaropektina. Dodajamo ga 6 – 10 g/l. Je izvleček iz različnih rdečih alg, kar močno vpliva na njegovo sestavo, odvisno od rastišča. Na trdnost gojišča vpliva njegova reakcija, saj se pri nižjem pH agar težje strdi kot pri višjem.

Agarozna je sestavina agarja. Prečiščena agarozna je za zdaj verjetno najboljša snov za strjevanje gojišč, vendar se zaradi visoke cene redko uporablja (Bohanec, 1992).

Gellum-gum je izvleček iz posebnega soja bakterij in je sestavljen iz glukuronske kisline, ramnoze in glukoze. Za strjevanje zadošča manjša količina (okoli 2 g/l). Na vrednost pH je bolj občutljiv kot agar, pri povečani kislosti se postopno utekočini. V vodi se ne strjuje. Za strjevanje potrebuje določeno koncentracijo soli.

2.9.4 Ostali dodatki

Kokosovo mleko, ki vsebuje številne snovi (amino kisline, vitamine, sladkorje, hormone in druge snovi), dobro vpliva na gojenje. Aktivno oglje absorbira toksične snovi, ki so v gojišču ali nastajajo med avtoklaviranjem. Nase veže polifenole in razne ostale odpadne snovi, ki jih izločajo v gojišče rastline. Orhideje so znane po izločkih, ki lahko toksično vplivajo na rast in razvoj. Kot dodatek se uporablja tudi banana, ki je dobrodošla sestavina in je v že pripravljenih gojiščih posameznih dobaviteljev. Uporablja se za rast rastlin. Dodaja se lahko kot sveža banana ali pa v obliki otroške hrane; v zadnjem času v obliki bananinega praška.

2.9.5 pH vrednost gojišča

Anorganske snovi so najboljše dostopne rastlinskim celicam med 5,0 in 6,5 pH. To velja zlasti za amonijski in nitratni dušik. pH se zelo rad spreminja, med avtoklaviranjem se celo zniža.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 RASTLINSKI MATERIAL

V poskus asimbiotske kalitve je bilo zajetih 7 komercialnih rastlin iz rodu *Phalaenopsis*, ki so se razlikovale po barvi cvetov, številu cvetnih stebel in cvetov (preglednica 1). Cvetovi so bili navzkrižno in recipročno oprášeni 2.3.2007. Nekateri so se po oprášitvi oplodili, drugi so predčasno odpadli. Iz oplojenih cvetov so se razvile semenske glavice brez oz. s semeni. Ta semena smo vključili v asimbiotsko kalitev. Semenske glavice smo pobirali postopoma, tako kot so dozorevale oz. se odpirale. Do razkuževanja in inokulacije na gojišče smo jih zračno dosušili in hranili pri sobni temperaturi.

Preglednica 1: Opis orhidej *Phalaenopsis* vključenih v križanja

Oznaka rastline	Barva cveta	Število cvetnih stebel
1	rožnata oziroma vijolična	2
2	rožnata oziroma vijolična	2
3	vijolična	2
4	zeleno rumena	3
5	Bela	1
6	Bela	2
7	Bela	2



Slika 4: Odprta semenska glavica in razpršena semena orhideje *Phalaenopsis*

3.2 RAZKUŽEVANJE IN INOKULACIJA SEMEN NA GOJIŠČE

Semena smo razkužili in inokulirali 24.3.2008 na gojišče proizvajalca Sigma z oznako P1056 (preglednica 2).

Za razkuževanje smo uporabili 1,6 % dikloroizocianurno kislino proizvajalca Sigma z močilom Tween 20 (Sigma). Seme smo s spatulo prenesli v mikrocentrifugirko in dodali 0,8 ml razkuževalne tekočine in razkuževali 8 minut pri sobni temperaturi. Nato smo postopek razkuževanja za 2 minuti nadaljevali v centrifugi (Beckman J2-HS) pri 5000 obratih/min (1900 x g) in temperaturi 4 °C. S centrifugiranjem smo razkuževalno tekočino ločili od semena. Z mikropipeto smo odpipetirali razkuževalno tekočino in dodali avtoklavirano bidestilirano vodo. Postopek centrifugiranja in spiranja smo ponovili štirikrat. Seme smo z zadnjo vodo za spiranje po eni uri z mikropipeto inokulirali na gojišče in ga z ukrivljeno, pod kotom 120 °, sterilno stekleno palčko porazdelili po površini gojišča v petrijevki (Jevšnik, 2002). Semena vsake kombinacije križanj smo inokulirali na gojišče dveh petrijevk oz. v dveh ponovitvah. Skupno je bilo 76 petrijevk, velikosti 90 x 15 mm.

Celotni postopek razkuževanja semen je potekal v komori za aseptično delo, ki jo je potrebno 10 – 15 minut pred delom prižgati, da sterilni zrak nadomesti sobnega in se tako zagotovijo sterilne razmere dela, ob neprestanem delu komore in izmenjavi sterilnega zraka. Orodje, ki smo ga uporabili, je bilo razkuženo v visokotemperaturnem grelcu pri 815 °C.

Dušik je bil v gojišču v obliki amonijevega in kalijevega nitrata, fosfor in magnezij v obliki kalijevega hidrogen fosfata in magnezijevega sulfata. Gojišče je vsebovalo tudi oglje in bananin prašek. Kot strjevalec je bil gojišču dodan agar in pH vrednost je bila 5,4. (preglednica 2).

Gojišče smo pripravili tako, da smo zatehtali hranila jih pretresli v čašo ter prelili z bidestilirano vodo. Sestavine smo raztopili z mešanjem s teflonskim magnetom na električnem mešalniku. Z bučko smo umerili volumen gojišča. S pH metrom smo izmerili pH vrednost gojišča in jo uravnali z 1N KOH oz. 1N HCl. Pred avtoklaviranjem smo dodali še strjevalec agar. 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 strdilo.

Semena vsake kombinacije križanj so bila inokulirana na gojišče dveh petrijevk oz. v dveh ponovitvah.

3.3 SESTAVA IN PRIPRAVA GOJIŠČA

Preglednica 2: Sestava gojišča za kalitev, rast in razvoj orhidej *Phalaenopsis*

Sestavine	Količina
MAKROELEMENTI (mg/l)	
KH_2PO_4	85
NH_4NO_3	825
KNO_3	950
CaCl_2	166
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	90,35
MIKROELEMENTI (mg/l)	
H_3BO_4	3,1
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	5,3
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	8,45
KJ	0,415
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,0125
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,0125
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,125
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	27,85
$\text{Na}_2\text{Fe-EDTA}$	37,24
OGLJIKOV HIDRAT (g/l)	
Saharoza	20
ORGANSKE SNOVI IN VITAMINI (mg/l)	
Inozitol	100
Pepton	2000
Bananin prašek, 50 % maltodekstrin	30000
Oglje	2000
MES	1000
Piridoksin - HCl	1
Tiamin – HCl	10
Nikotinska kislina	1
STRJEVALEC (g/l) IN pH VREDNOST	
Gellum gum	8
pH gojišča	5,4

3.4 KALITEV IN GOJENJE

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 $23 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.5 BONITIRANJE

Po inokulaciji semen na gojišče smo s stereomikroskopom pri 20 kratni povečavi spremljali kalitev (nabrekla in nenabrekla semena) in razvoj protokormov ter vizualno razvoj listov in korenin.

V obdobju poskusa smo opravili 7 bonitiranj. Prvo bonitiranje smo opravili 6 dni po inokulaciji semen na gojišče, nato 14, 22, 41, 50, 65 in 125 dni po inokulaciji.

Prešteli smo nekaliva in kaliva semena in vitalne protokorme z in brez rizoidi ter liste in korenine na cm^2 .

4 REZULTATI

4.1 NAVZKRIŽNO IN RECIPROČNO KRIŽANJE

Preglednica 3: Število neoprašenih, oprasnih, oplojenih in propadlih cvetov po navzkrižnem in recipročnem križanju orhidej *Phalaenopsis*

Oznaka rastline	1. cvetno steblo				2. cvetno steblo				3. cvetno steblo				Skupaj			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
1	9	6	5	1	7	6	4	2	-	-	-	-	16	12	9	3
2	8	4	2	2	6	5	3	2	-	-	-	-	14	9	5	4
3	8	4	3	1	7	5	2	3	-	-	-	-	15	9	5	4
4	7	1	-	1	6	3	3	-	8	3	3	-	21	7	6	1
5	9	5	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	9	5	4	1
6	8	4	3	1	8	4	4	-	-	-	-	-	16	8	7	1
7	9	5	5	-	9	5	5	-	-	-	-	-	18	10	10	-
Skupno	58	29	22	7	43	28	21	7	8	3	3	-	109	60	46	14

Legenda:

- A - odprti cvetovi
- B - opraseni cvetovi
- C - oplojeni cvetovi
- D - propadli cvetovi

Na 7 rastlinah, ki so bile vključene v križanja, je nastalo 109 cvetov od katerih je bilo 60 oz. 55 % cvetov oprasnih. Po oprasitvi je 14 oz. 23,3 % cvetov propadlo oz. predčasno odpadlo z rastlin. Semenske glavice je oblikovalo 46 oz. 76,7 % oplojenih cvetov. Od tega so se v 38 oz. 82,6 % semenskih glavicah tvorila semena in 7 oz. 15,2 % semenskih glavic se je predčasno posušilo oz. propadlo. Ena semenska glavica v kombinaciji navzkrižnega križanja z rastlino 4 je bila prazna oz. brez semen (preglednica 3 in 4).

Preglednica 4: Kombinacije z nastalimi semeni po navzkrižnem in recipročnem križanju orhidej *Phalaenopsis*

Kombinacija križanja		Oznaka ženske rastline [♀] in cvetnega stebła	Oznaka moške rastline [♂] in cvetnega stebła
1	N	1 ♀ 1. cvetno steblo	7 ♂ 2. cvetno steblo
	R	7 ♀ 2. cvetno steblo	1 ♂ 1. cvetno steblo
2	N	1 ♀ 1. cvetno steblo	5 ♂ 1. cvetno steblo
	R	5 ♀ 1. cvetno steblo	1 ♂ 1. cvetno steblo
3	N	1 ♀ 1. cvetno steblo	5 ♂ 1. cvetno steblo
	R	5 ♀ 1. cvetno steblo	1 ♂ 1. cvetno steblo
4	N	1 ♀ 1. cvetno steblo	6 ♂ 2. cvetno steblo
	R	6 ♂ 2. cvetno steblo	1 ♀ 1. cvetno steblo
5	N	1 ♀ 1. cvetno steblo	5 ♂ 1. cvetno steblo
	R	5 ♂ 1. cvetno steblo	1 ♀ 1. cvetno steblo
6	N	1 ♀ 2. cvetno steblo	7 ♂ 1. cvetno steblo
	R	7 ♂ 1. cvetno steblo	1 ♀ 2. cvetno steblo
7	N	1 ♀ 2. cvetno steblo	7 ♂ 1. cvetno steblo
	R	7 ♂ 1. cvetno steblo	1 ♀ 2. cvetno steblo
8	N	1 ♀ 2. cvetno steblo	5 ♂ 1. cvetno steblo
	R	5 ♂ 1. cvetno steblo	1 ♀ 2. cvetno steblo
9	N	1 ♀ 2. cvetno steblo	6 ♂ 1. cvetno steblo
	R	6 ♂ 1. cvetno steblo	1 ♀ 2. cvetno steblo
10	N	2 ♀ 1. cvetno steblo	6 ♂ 2. cvetno steblo
	R	6 ♂ 2. cvetno steblo	2 ♀ 1. cvetno steblo
11	N	2 ♀ 1. cvetno steblo	7 ♂ 1. cvetno steblo
	R	7 ♂ 1. cvetno steblo	2 ♀ 1. cvetno steblo
12	N	2 ♀ 2. cvetno steblo	6 ♂ 1. cvetno steblo
	R	6 ♂ 1. cvetno steblo	2 ♀ 2. cvetno steblo
13	N	2 ♀ 2. cvetno steblo	6 ♂ 1. cvetno steblo
	R	6 ♂ 1. cvetno steblo	2 ♀ 2. cvetno steblo
14	N	2 ♀ 2. cvetno steblo	6 ♂ 2. cvetno steblo
	R	6 ♂ 2. cvetno steblo	2 ♀ 2. cvetno steblo
15	N	3 ♀ 1. cvetno steblo	7 ♂ 2. cvetno steblo
	R	7 ♂ 2. cvetno steblo	3 ♀ 1. cvetno steblo
16	N	3 ♀ 1. cvetno steblo	7 ♂ 1. cvetno steblo
	R	7 ♂ 1. cvetno steblo	3 ♀ 1. cvetno steblo
17	N	3 ♀ 1. cvetno steblo	7 ♂ 1. cvetno steblo
	R	7 ♂ 1. cvetno steblo	3 ♀ 1. cvetno steblo
18	N	3 ♀ 2. cvetno steblo	7 ♂ 2. cvetno steblo
	R	7 ♂ 2. cvetno steblo	3 ♀ 2. cvetno steblo
19	N	3 ♀ 2. cvetno steblo	7 ♂ 2. cvetno steblo
	R	7 ♂ 2. cvetno steblo	3 ♀ 2. cvetno steblo

Legenda:

N - navzkrižno

R - recipročno

Pri 38 kombinacijah križanja so se razvile semenske glavice. Izvedenih je bilo 19 kombinacij navzkrižnega in 19 kombinacij recipročnega križanja. Od 7 vključenih rastlin v križanja jih je 6, razen rastline 4 (preglednica 1 in 3), prispevalo jajčno celico (ženske rastline) in pelod (moške rastline). Pri rastlini z oznako 4 (preglednica 1 in 3) se je pri navzkrižnem križanju razvila semenska glavica brez semen, medtem ko pri recipročnem križanju do oploditve ni prišlo, cvet je odpadel. Cvetovi rastline z oznako 1 so bili 9 krat vključeni v križanja, in sicer 4 krat s cvetovi rastline 5, 3 krat s cvetovi rastline 7 in 2 krat s cvetovi rastline 6. Rastlina z oznako 2 je bila vključena 5 krat v križanja, in sicer 4 krat z rastlino z oznako 6 in 1 krat z rastlino 7. Rastlina z oznako 3 je bila 5 krat vključena v križanja z rastlino 7. Te kombinacije križanja so bile uspešne oz. so se v semenskih glavicah tvorila semena s kalčki (preglednica 4).

4.2 OKUŽBA SEMEN PO INOKULACIJI NA GOJIŠČE

Preglednica 5: Število okuženih petrijevok in vrsta okužbe 6, 14, 22, 41, 50, 65 in 125 dni po inokulaciji semen orhidej *Phalaenopsis*



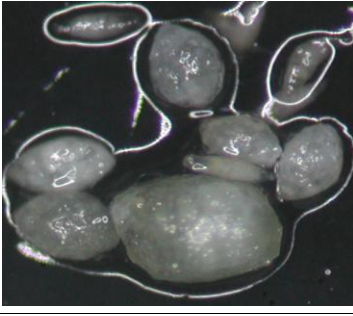
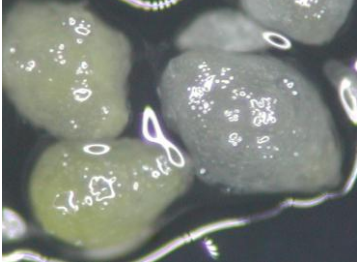
Število dni po inokulaciji	Oznaka petrijevke z okuženimi semeni	Število okuženih petrijevok	Vrsta okužbe
6	23 ₂	1	Plesen
14	6 ₂ ,	1	Plesen
	13 ₁ , 15 ₁ , 20 ₁	3	Bakterija
22	1 ₂ , 2 ₂ , 8 ₂	3	Bakterija
41	9 ₁	1	Bakterija
	14 ₂	1	Plesen
50	8 ₁	1	Bakterija
65	7 ₁	1	Bakterija
125	12 ₁	1	Plesen
	10 ₁ , 29 ₁ , 38 ₂	3	Bakterija
	27 ₁ , 35 ₁	2	Bakterija in plesen

V prvem tednu *in vitro* gojenja semen orhidej *Phalaenopsis* je prišlo do prvih okužb. Pojavila se je plesen in to pri kombinaciji križanja z oznako 23₂. 14 dni po inokulaciji je prišlo do okužbe s plesnijo in bakterijo pri 4 kombinacijah križanja, in sicer se je pri semenih v petrijevki z oznako 6₂ pojavila plesen, bakterija pa je okužila semena kombinacije križanj 13₁, 15₁, 20₁. Bakterijska okužba je tri tedne po razkuževanju semen oz. inokulaciji izločila petrijevke z oznako 1₂, 2₂ in 8₂. Po 41 dneh se je bakterijska okužba pojavila v petrijevki z oznako 9₁ in okužba s plesnijo v petrijevki 14₂. 50 dni po inokulaciji se je pojavila bakterijska okužba na semenih petrijevke z oznako 8₁, prav tako se je bakterijska okužba pojavila po 65 dneh inokulacije na semenih petrijevke z oznako 7₁. Po 125 dneh je nadaljnji razvoj semen v petrijevki z oznako 12₁ prekinila plesen, bakterija se

je pojavila pri kombinaciji križanj 10₁, 29₁ in 38₂, bakterija in plesen pa pri kombinaciji križanj 27₁ in 35₁. Skupno je bilo okuženih 23,7 % petrijevk. Od tega 22,3 % s plesnijo, 66,7 % z bakterijo in 11,1 % s kombinacijo bakterija in plesen (preglednica 5).





4.3 IN VITRO KALITEV TER RAST IN RAZVOJ

Preglednica 6: *In vitro* kalitev ter rast in razvoj križancev *Phalaenopsis*

Inokulacija in število dni po inokulaciji	Opis fenofaz	Slika
Inokulacija (24.3.2008)	Razkužena semena inokulirana na gojišče	
6 dni (31.3.2008)	Večina kalčkov oz. semen je bilo nenabreklih, le nekaj semen je oblikovalo protokorme.	
14 dni (8.4.2008)	Nabrekla semena so bila bela	
22 dni (16.4.2008)	Protokormi so se povečali in ozeleneli	

Nadaljevanje

Se nadaljuje

Inokulacija in število dni po inokulaciji	Opis fenofaz	Slika
41 dni (5.5.2008)	Pojav prvih zelenih protokormov z rizoidi.	
50 dni (14.5.2008)	Protokormi z rizoidi, nekaj jih je začelo propadati	
65 dni (29.5.2008)	Pojav prvih pravih listov, nekaj protokormov samo z rizoidi.	
125 dni (28.7.2008)	Veliko belih in rjavih, propadlih protokormov. Nekaj rastlin z enim do dvema listoma in korenino.	

Preglednica 7: Število semen, protokormov in rastlin *Phalaenopsis* na cm² 125 dni po inokulaciji

KK	Število semen				Število protokormov						Število rastlin							
	nabrekla		nenabrekla		belih		belih z R		zelenih z R		z R in L		z L in K		z 2 L in K		z 2 L in 2 K	
	N	R	N	R	N	R	N	R	N	R	N	R	N	R	N	R	N	R
1	273	147	25	133	68	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	485	520	0	44	37	14	0	1	0	1	0	2	0	2	0	3	0	0
3	234	189	13	29	5	11	0	0	0	1	0	1	0	2	0	1	0	0
4	134	168	5	32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	302	356	4	20	0	5	0	1	0	1	0	2	0	2	0	3	0	0
6	201	312	2	6	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	245	334	24	37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	-	264	-	9	-	1	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0
9	193	119	12	5	62	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	159	193	7	47	61	15	7	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0
11	99	117	7	27	79	1	12	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
12	122	258	3	6	1	1	1	1	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0
13	78	270	33	2	55	0	7	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
14	135	243	7	29	4	33	1	2	0	1	0	2	0	2	0	1	2	2
15	79	344	15	36	73	0	13	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0
16	60	217	4	8	117	0	35	0	1	4	3	0	0	0	1	0	0	0
17	42	39	4	347	70	0	2	0	1	0	2	0	1	0	1	0	2	0
18	77	217	17	100	62	0	8	1	2	0	3	0	1	0	2	0	0	0
19	42	274	12	24	49	0	11	0	2	1	1	0	2	0	1	0	0	0

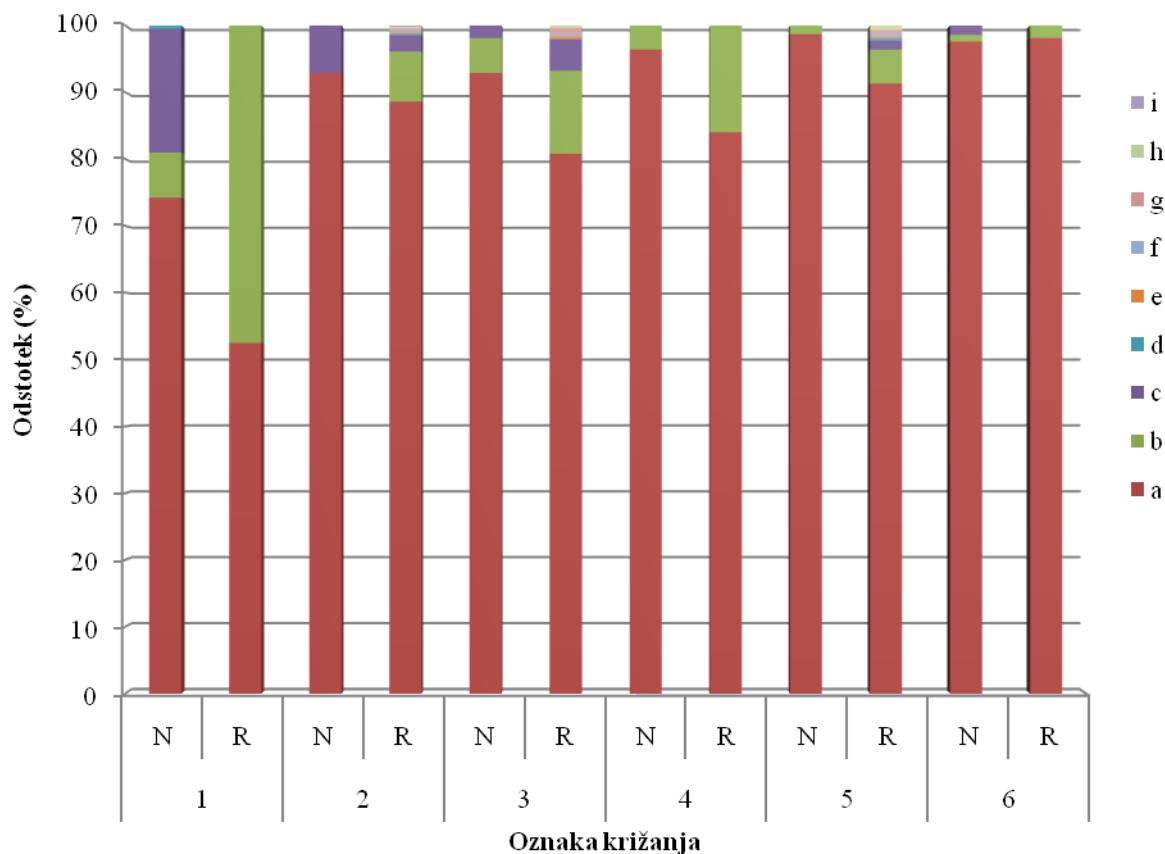
Legenda:

KK - kombinacija križanja

R - rizoid

L - list

K - korenina



Legenda:

- a – delež nabreklih semen
- b – delež nenabreklih semen
- c – delež protokormov – beli
- d – delež protokormov z rizoidi – beli
- e – delež protokormov z rizoidi – zeleni
- f – delež protokormov z rizoidi zeleni z listom
- g – rastlina z listom in korenino
- h – rastlina z dvema listoma in korenino
- i – rastlina z 2 listoma in 2 koreninama
- N – navzkrižno križanje
- R – recipročno križanje

Slika 5: Odstotek kalivih semen ter rast in razvoj križancev *Phalaenopsis* z oznakami križanja od 1 do 6 125 dni po inokulaciji

Pri navzkrižnem križanju z oznako 1 je bilo 74,2 % nabreklih semen in 6,8 % nenabreklih. Belih protokormov je imela ta kombinacija križanja 18,5 % in 0,5 % je bilo belih protokormov z rizoidi. Pri recipročnem križanju z oznako 1 je bilo 52,5 % nabreklih semen in 47,5 % nenabreklih (slika 5, preglednica 7).

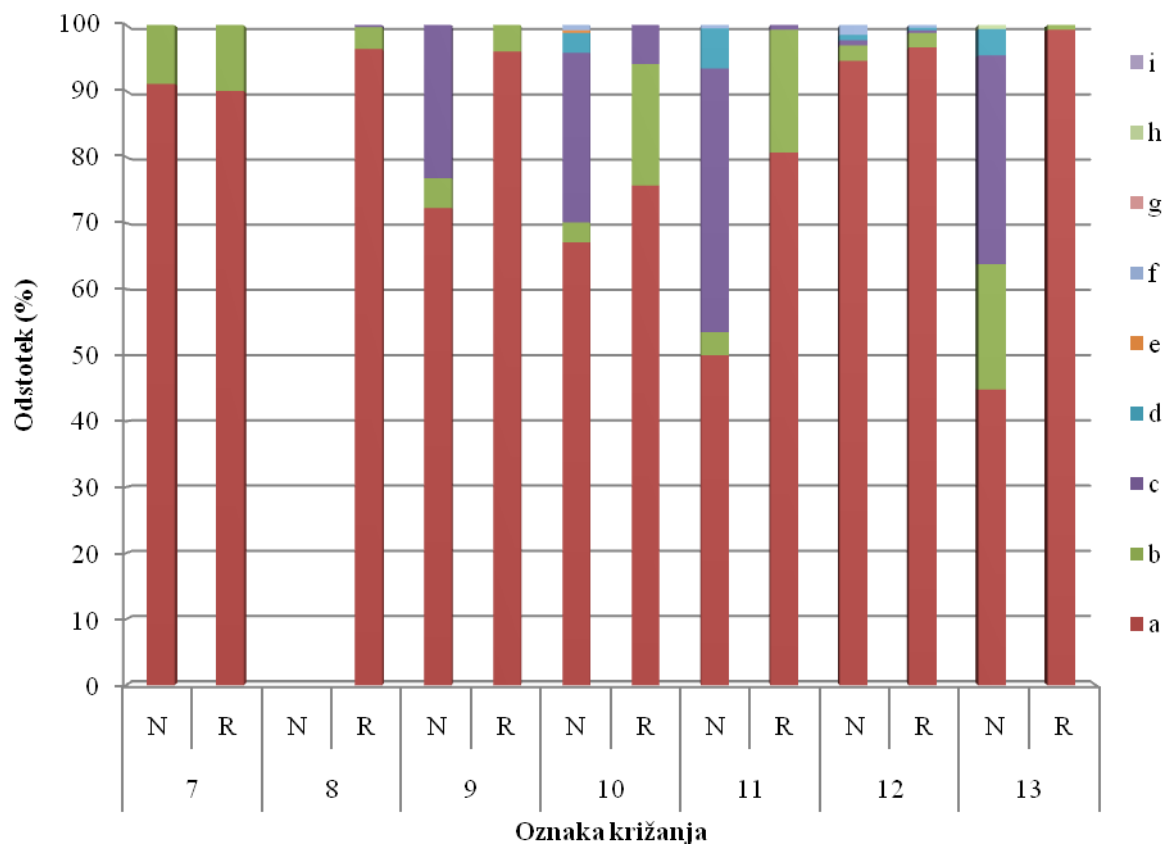
Pri navzkrižnem križanju z oznako 2 je bilo 92,9 % nabreklih semen, nenabreklih semen ni bilo in belih protokormov je bilo 7,1 %. Pri recipročnem križanju z oznako 2 je bilo 88,6 % nabreklih semen in 7,5 % nenabreklih semen. 2,4 % semen se je razvilo v bele protokorme, medtem ko se je le 0,2 % semen razvilo v bele protokorme z rizoidi in enako v zelene protokorme z rizoidi. Zelenih protokormov z rizoidi in listom je bilo 0,3 %, enako je bilo rastlin z listom in korenino ter rastlin z dvema listoma in korenino. 0,2 % rastlin je bilo z 2 listoma in 2 koreninama (slika 5, preglednica 7).

Pri navzkrižni kombinaciji križanja z oznako 3 je bilo 92,9 % nabreklih semen in 5,2 % nenabreklih semen, v bele protokorme se je razvilo 2 % semen. Pri recipročnem križanju je bilo 80,8 % nabreklih semen in 12,4 % nenabreklih semen. 4,7 % semen se je razvilo v bele protokorme z rizoidi, 0,4 % semen je oblikovalo zelene protokorme z rizoidi, enako je bilo tudi zelenih protokormov z rizoidi in listom ter rastlin z 2 listoma in korenino. Rastlin z listom in korenino je bilo 0,9 % (slika 5, preglednica 7).

Pri oznaki križanja 4 je bilo pri navzkrižni kombinaciji 96,4 % nabreklih semen, medtem ko je bilo 3,6 % nenabreklih. Pri recipročni kombinaciji križanja je bilo le 86 % nabreklih semen in 16 % nenabreklih semen (slika 5, preglednica 7).

Pri navzkrižni kombinaciji križanja z oznako 5 je bilo 98,7 % nabreklih semen in 1,3 % nenabreklih. Medtem ko je bilo pri recipročni kombinaciji križanja 91,3 % nabreklih semen in 5,1 % nenabreklih. 1,3 % semen je razvilo bele protokorme, 0,3 % pa bele protokorme z rizoidi in zelene protokorme z rizoidi. 0,5 % semen se je razvilo v zelene protokorme z rizoidi in listom in v rastlino z listom in korenino. Rastlin z 2 listoma in korenino je bilo 0,8 % (slika 5, preglednica 7).

Pri navzkrižni kombinaciji križanja z oznako 6 je bilo 97,6 % nabreklih semen in 1 % nenabreklih ter 1,5 % semen se je razvilo v bele protokorme. Pri recipročni kombinaciji križanja z oznako 6 je bilo podobno, in sicer je bilo 98,1 % nabreklih semen in 1,9 % nenabreklih (slika 5, preglednica 7).



Legenda:

- a – delež nabreklih semen
- b – delež nenabreklih semen
- c – delež protokormov – beli
- d – delež protokormov z rizoidi – beli
- e – delež protokormov z rizoidi – zeleni
- f – delež protokormov z rizoidi zeleni z listom
- g – rastlina z listom in korenino
- h – rastlina z dvema listoma in korenino
- i – rastlina z 2 listoma in 2 koreninama
- N – navzkrižno križanje
- R – recipročno križanje

Slika 6: Odstotek kalivih semen ter rast in razvoj križancev *Phalaenopsis* z oznakami križanja od 7 do 13 125 dni po inokulaciji

Pri kombinaciji križanja 7 so bila pri navzkrižnem križanju samo nabrekla in nenabrekla semena, in sicer 91,1 % nabreklih in 8,9 % nenabreklih semen. Pri recipročnem križanju je bilo podobno, in sicer je bilo 90 % nabreklih semen, medtem ko je bilo 10 % nenabreklih semen (slika 6, preglednica 7).

Pri navzkrižni kombinaciji križanja z oznako 8 se je pojavila okužba s plesnijo, medtem ko je bilo pri recipročni kombinaciji križanja z oznako 8 96,4 % nabreklih semen in 3,3 % nenabreklih semen. Le 0,4 % semen se je razvilo v bele protokorme (slika 6, preglednica 7).

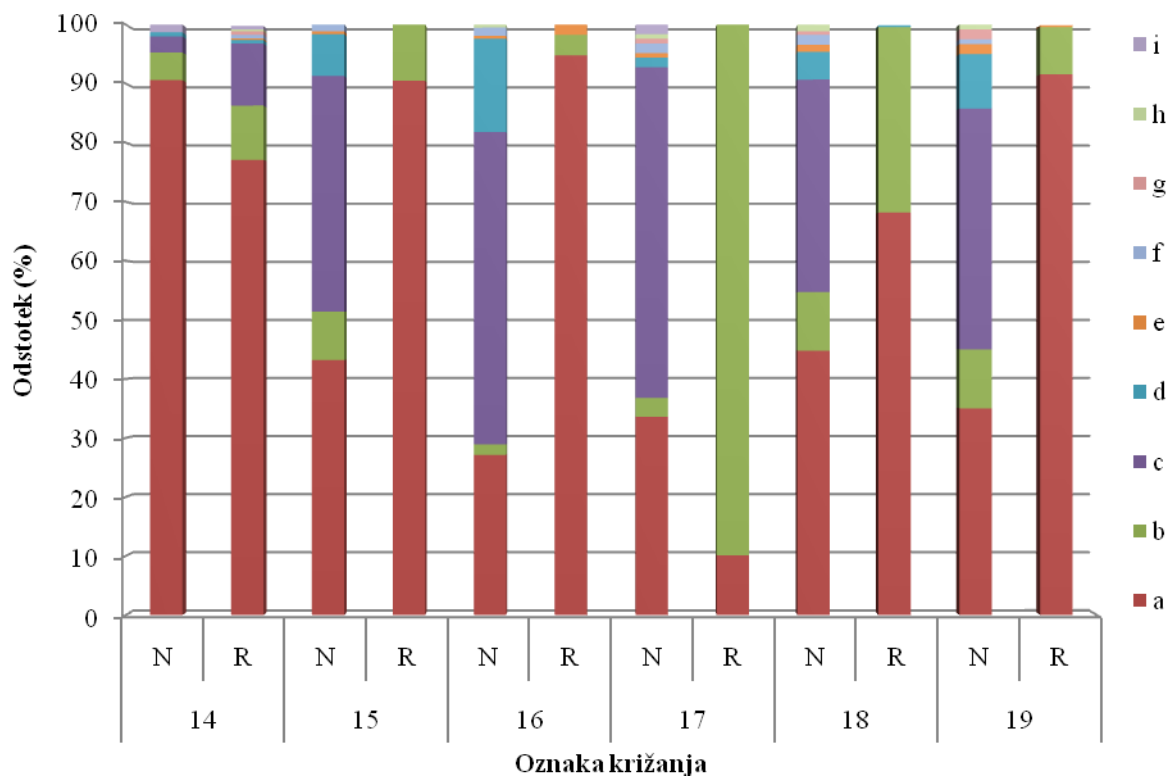
Pri navzkrižni kombinaciji križanja z oznako 9 je bilo 72,3 % nabreklih semen in 4,5 % nenabreklih semen in 23,2 % semen se je razvilo v bele protokorme, pri recipročni kombinaciji križanja je bilo 96 % nabreklih semen in 4 % nenabreklih semen (slika 6, preglednica 7).

Pri navzkrižni kombinaciji križanja z oznako 10 je bil razvoj semen uspešnejši, in sicer se je 0,8 % semen razvilo v zelene protokorme z rizoidi in listom, 0,4 % je bilo zelenih protokormov z rizoidi, 3 % je bilo belih protokormov z rizoidi in 25,7 % belih protokormov, medtem ko je bilo 3 % nenabreklih semen in 67,1 % nabreklih semen. Pri recipročnem križanju je bilo 75,7 % nabreklih semen, medtem ko je bilo 9,2 % nenabreklih semen in 5,9 % semen je razvilo bele protokorme (slika 6, preglednica 7).

Pri navzkrižni kombinaciji križanja z oznako 11 je bilo 50 % nabreklih semen, 3,5 % nenabreklih semen, belih protokormov je bilo 39,9 %, belih protokormov z rizoidi 6,1 % in 0,5 % zelenih protokormov z listom. Pri recipročni kombinaciji križanja je bilo 80,7 % nabreklih semen in 18,6 % nenabreklih semen ter 0,7 % semen je razvilo bele protokorme (slika 6, preglednica 7).

Pri navzkrižni kombinaciji križanja z oznako 12 je bilo 94,6 % nabreklih, 2,3 % nenabreklih semen, 0,8 % belih protokormov in 1,6 % belih protokormov z rizoidi. Pri recipročni kombinaciji križanja je bilo 96,6 % nabreklih in 2,2 % nenabreklih semen. Delež belih protokormov, belih protokormov z rizoidi in zelenih protokormov z rizoidi in listom je bil enak, in sicer 0,4 % (slika 6, preglednica 7).

Pri navzkrižni kombinaciji križanja z oznako 13 je bilo 44,8 % nabreklih, 19 % nabreklih semen, 31,6 % belih protokormov, 4 % belih protokormov z rizoidi 4 % in 0,6 % semen se je razvilo v rastlino z dvema listoma in korenino. Pri recipročni kombinaciji križanja je bilo nabreklih kar 99,3 % semen in le 0,7 % nenabreklih semen (slika 6, preglednica 7).



Legenda:

- a – delež nabreklih semen
- b – delež nenabreklih semen
- c – delež protokormov – beli
- d – delež protokormov z rizoidi – beli
- e – delež protokormov z rizoidi – zeleni
- f – delež protokormov z rizoidi zeleni z listom
- g – rastlina z listom in korenino
- h – rastlina z dvema listoma in korenino
- i – rastlina z 2 listoma in 2 koreninama
- N – navzkrižno križanje
- R – recipročno križanje

Slika 7: Odstotek kalivih semen ter rast in razvoj križancev *Phalaenopsis* z oznakami križanja od 14 do 19 125 dni po inokulaciji

Pri navzkrižni kombinaciji križanja z oznako 14 je bilo 90,6 % nabreklih, 4,7 % nenabreklih semen, 2,7 % semen se je razvilo v bele protokorme, 0,7 % v bele protokorme

z rizoidi in 1,3 % semen se je razvilo v rastlino z 2 listoma in 2 koreninama. Pri recipročni kombinaciji križanja je bilo 77,1 % nabreklih semen in 9,2 % nenabreklih semen. 10,5 % semen se je razvilo v bele protokorme ter 0,6 % semen se je razvilo v bele protokorme z rizoidi, v zelene protokorme z rizoidi in listom, v rastlino z listom in korenino ter v rastlino z 2 listoma in 2 koreninama. 0,3 % je bilo zelenih protokormov z rizoidi in prav toliko je bilo rastlin z 2 listoma in korenino (slika 7, preglednica 7).

Pri navzkrižni kombinaciji križanja z oznako 15 je bilo 43,2 % nabreklih semen, 8,2 % nenabreklih, 39,9 % semen se je razvilo v bele protokorme, 7,1 % je bilo belih protokormov z rizoidi, 0,5 % zelenih protokormov z rizoidi in 1,1 % semen se je razvilo v zelene protokorme z listom. Pri recipročni kombinaciji križanja se je delež nabreklih semen povečal na 90,5 %, nenabreklih semen je bilo 9,5 % (slika 7, preglednica 7).

Pri navzkrižni kombinaciji križanja z oznako 16 je bilo 27,1 % nabreklih semen, 1,8 % nenabreklih semen, 52,9 % je bilo belih protokormov, 15,8 % belih protokormov z rizoidi, 0,5 % zelenih protokormov z rizoidi, 1,4 % zelenih protokormov z rizoidi in listom ter 0,5 % je bilo rastlin z 2 listoma in korenino. Pri recipročni kombinaciji križanja je 1,7 % semen razvilo zelene protokorme z rizoidi, 3,5 % je bilo nenabreklih semen in 94,8 % je bilo nabreklih (slika 7, preglednica 7).

Pri navzkrižni kombinaciji križanja z oznako 17 je bilo 33,6 % nabreklih, 3,2 % nenabreklih semen ter kar 56 % semen se je razvilo v bele protokorme. 1,6 % semen se je razvilo v bele protokorme z rizoidi in 0,8 % v zelene protokorme z rizoidi. Zelenih protokormov z rizoidi in listom je bilo 1,6 %, rastlin z listom in korenino 0,8 %, enako je bilo rastlin z 2 listoma in korenino, 1,6 % semen se je razvilo v rastlino z 2 listoma in 2 koreninama. Pri recipročni kombinaciji križanja je bilo le 10,1 % nabreklih semen in kar 89,9 % je bilo nenabreklih semen (slika 7, preglednica 7).

Pri navzkrižni kombinaciji križanja z oznako 18 je bilo 44,8 % nabreklih in 9,9 % nenabreklih semen, 36 % semen se je razvilo v bele protokorme. Belih protokormov z rizoidi je bilo 4,7 %, zelenih protokormov z rizoidi je bilo 1,2 %. 1,7 % semen se je razvilo v zelene protokorme z rizoidi in listom, 0,6 % rastlin z listom in korenino in 1,2 % je bilo rastlin z 2 listoma in korenino. Pri recipročni kombinaciji križanja je bilo 68,2 % nabreklih in 31,4 % nenabreklih semen ter 0,3 % semen je razvilo bele protokorme z rizoidi (slika 7, preglednica 7).

Pri navzkrižni kombinaciji križanja z oznako 19 je bilo 35 % nabreklih in 10 % nenabreklih semen, 40,8 % semen se je razvilo v bele protokorme, 9,2 % v bele protokorme z rizoidi in 1,7 % v zelene protokorme z rizoidi. Zelenih protokormov z rizoidi in listom ter rastlin z dvema listoma in korenino je bilo 0,8 %, medtem ko je bilo rastlin z

listom in korenino 1,7 %. Pri recipročni kombinaciji križanja se je 0,3 % semen razvilo v zelene protokorme z rizoidi, 8 % je bilo nenabreklih semen in 91,6 % nabreklih semen (slika 7, preglednica 7).

Preglednica 8: Odstotek nastalih rastlin v uspešnih kombinacijah križanja orhidej *Phalaenopsis* 125 dni po inokulaciji semen

Oznaka križanja	Oznaka starševskih rastlin materina X očetova	Odstotek rastlin
2R	5 X 1	0,8
3R	5 X 1	1,3
5R	5 X 1	1,3
13N	2 X 6	0,6
14N	2 X 6	1,4
14R	6 X 2	1,5
16N	3 X 7	0,5
17N	3 X 7	2,8
18N	3 X 7	1,8
19N	3 X 7	2,5

Legenda:

R – recipročno

N – navzkrižno

Po 125 dneh inokulacije semen *Phalaenopsis* na gojišče je bilo od 38 kombinacij uspešnih 10 kombinacij križanj pri katerih so nastale rastline. Od tega 6 kombinacij navzkrižnih križanj in 4 recipročnih križanj. Največ, 2,8 %, rastlin je nastalo pri navzkrižnem križanju z oznako 17, nekoliko manj, 2,5 %, rastlin je nastalo pri navzkrižnem križanju z oznako 19. Pri navzkrižni kombinaciji križanja z oznako 18 je nastalo 1,8 % rastlin, 1,5 % rastlin je nastalo pri recipročnem križanju z oznako 14. Pri ostalih 6 uspešnih kombinacijah recipročnega križanja z oznako 2, 3 in 5 ter navzkrižnega križanja z oznako 13, 14 in 16 je nastalo 1,4 % rastlin oz. manj kot 1,4 % (preglednica 8).

Rastlina z oznako 1 je bila najboljša pri recipročnih kombinacijah križanja z oznako 2, 3 in 5, ko je prispevala pelod oz. je bila očetova rastlina in to v kombinacijah z materino rastlino z oznako 5. Rastlina z oznako 2 je bila uspešna pri navzkrižnih križanjih z oznako 13 in 14, ko je prispevala jajčno celico oz. je bila materina rastlina v kombinaciji z očetovo rastlino z oznako 6 ter pri recipročnem križanju z oznako 14. Rastlina z oznako 3 je bila najuspešnejša pri navzkrižnih križanjih z oznako 16, 17, 18 in 19, ko je prispevala jajčno celico in to v kombinaciji z očetovo rastlino z oznako 7. Rastlina z oznako 4 ni bila kompatibilna z nobeno od vključenih rastlin. V primerih, ko je bila materina rastlina, so

nastale semenske glavice brez semen, v primerih, ko je bila očetova rastlina, so cvetovi po opraitvi odpadli (preglednica 3 in 8).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

V poskus asimbiotske kalitve je bilo zajetih 7 komercialnih rastlin iz rodu *Phalaenopsis*, ki so se razlikovale po barvi cvetov, številu cvetnih stebel in cvetov. Izvedenih je bilo 19 kombinacij navzkrižnega in 19 kombinacij recipročnega križanja.

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Navzkrižno in recipročno križanje

Od 7 vključenih rastlin v križanja so bile 4 rastline z oznako 2, 3, 5 in 6, razen rastlin z oznako 1 in 4 uspešne kot materina rastlina in 4 z oznako 1, 2, 6 in 7 razen rastline 3 in 4 kot očetova rastlina. Pri vseh kombinacijah križanja, kjer je bila rastlina 4 izbrana kot materina rastlina, so nastale prazne semenske glavice, ko pa je bila rastlina 4 izbrana kot očetova rastlina, je cvet po opraitvi odpadel - do oploditve ni prišlo. Na 7 rastlinah, ki so bile vključene v križanja, je nastalo 109 cvetov od teh je bilo 60 oz. 55 % cvetov opraišenih. 46 oz. 76,7 % oplojenih cvetov je oblikovalo semenske glavice. Od tega so se v 38 oz. 82,6 % semenskih glavicah tvorila semena in 7 oz. 15,2 % semenskih glavic se je predčasno posušilo oz. propadlo. Ti cvetovi se niso uspešno oplodili, kar je lahko posledica inkompatibilnosti oz. neuspešno izbrane kombinacije križanja.

Hicks (2000) daje velik poudarek pravilni izbiri starševskih rastlin. Če imamo dve rastlini in ima ena večje cvetove kot druga, se ta uporabi za darovalko starševskega peloda. To pa zato, ker pelod manjšega cveta ne oblikuje vedno dovolj dolge pelodne cevi, ki bi lahko dosegla plodnico gostiteljske rastline. V našem primeru je imela rastlina z oznako 4 nekoliko manjše cvetove od ostalih rastlin in ločila se je tudi po zeleno rumenih cvetovih, za katere je znano, da so slabo kompatibilni v križanjih. Kar se je potrdilo tudi v našem primeru.

Rastlina z oznako 1 je bila najboljša pri recipročnih kombinacijah križanja z oznako 2, 3 in 5, ko je prispevala pelod oz. je bila očetova rastlina in to v kombinacijah z materino rastlino z oznako 5. Rastlina z oznako 2 je bila uspešna pri navzkrižnih križanjih z oznako 13 in 14, ko je prispevala jajčno celico oz. je bila materina rastlina v kombinaciji z očetovo rastlino z oznako 6 ter pri recipročnem križanju z oznako 14. Rastlina z oznako 3 je bila najuspešnejša pri navzkrižnih križanjih z oznako 16, 17, 18 in 19, ko je prispevala jajčno celico in to v kombinaciji z očetovo rastlino z oznako 7. Rastlina z oznako 4 ni bila kompatibilna z nobeno od vključenih rastlin. V primerih, ko je bila materina rastlina, so

nastale semenske glavice brez semen, v primerih, ko je bila očetova rastlina, so cvetovi po opraitvi odpadli (preglednica 3 in 8).

5.1.2 Razkuževanje semen in pridobitev aseptične kulture

Izbrana koncentracija in razkuževalno sredstvo ter čas razkuževanja so uspešno vplivali na razkuževanje semen, saj je bilo 76,3 % kombinacij semen neokuženih. 1,6 % dikloroizocianurna kislina in 10 minutno razkuževanje sta bili zelo učinkoviti. K učinkovitemu razkuževanju je pripomogla tudi uporaba centrifuge. S centrifugiranjem je bila uspešno nevtralizirana površinska napetost semen, kar je dodatno omogočilo dostop razkuževalni tekočini do semen in vplivalo na uspeh razkuževanja. Metoda centrifugiranja omogoča tudi preprostejše odstranjevanje razkuževalne tekočine z mikropipeto, saj so se semena zbrala na dnu mikrocentrifugirke. O podobnem učinku centrifugiranja na razkuževanje navajata tudi Jevšnik (2002) in Zupan (2004).

Pojav plesni po tednu in dveh tednih je verjetno posledica neučinkovitega in nenatančnega razkuževanja semen. V ostalih primerih je prišlo do sekundarne okužbe s plesnijo in bakterijo zaradi kondenza, ki je nastajal na robovih in na pokrovčkih petrijevk ter strganega parafilma s katerim je bil oblepljen pokrov in spodnji del petrijevk. V komori so nesterilni pogoji in skozi odprtine parafilma, ker pokrov in spodnji del petrijevke ne tesnita, lahko prihaja okužen zrak, ki ga ventilator neprestano meša ko so luči prižgane. Skupno je bilo okuženih 23,7 % kombinacij semen. Od tega 22,3 % s plesnijo, 66,7 % z bakterijo in 11,1 % s kombinacijo bakterija in plesen.

5.1.3 *In vitro* kalitev ter rast in razvoj

Na komercialnem gojišču z oznako P1056, proizvajalca Sigma (preglednica 2) smo dobili pri uspešnih kombinacijah križanja rastline že po 80 dneh inokulacije semen.

Razvoj sejancev *in vitro* lahko traja od 50 do 724 dni, za nadaljnji razvoj *in vitro* je potrebnih še 4,2 do 31,5 mesecev. Sejančki lahko prvič zacvetijo po enem letu, ali pa po 11 letih, odvisno od vrste (Arditti, 1992). Glavni problem pri razvoju novih križancev predstavlja dolgo časovno obdobje, ki je potrebno za indukcijo prvega cvetnega poganjka. Cvetenje lahko pri meristemsko razmnoženih poganjkih rodu *Phalaenopsis* vzpodbudimo že v fazi *in vitro*, vendar so ti cvetovi pogosto deformirani (Duan in Yazawa, 1995).

Po 125 dneh inokulacije semen križancev *Phalaenopsis* na gojišče je bilo od 38 kombinacij uspešnih 10 kombinacij križanj pri katerih so nastale rastline. Od tega 6 kombinacij navzkrižnih križanj in 4 recipročnih križanj. Največ, 2,8 %, rastlin je nastalo pri

navzkrižnem križanju z oznako 17, nekoliko manj, 2,5 %, rastlin je nastalo pri navzkrižnem križanju z oznako 19. Pri navzkrižni kombinaciji križanja z oznako 18 je nastalo 1,8 % rastlin, 1,5 % rastlin je nastalo pri recipročnem križanju z oznako 14. Pri ostalih uspešnih kombinacijah križanja je nastalo 1,4 % rastlin oz. manj kot 1,4 % (preglednica 8).

5.2 SKLEPI

- Na 7 rastlinah, ki so bile vključene v križanja, je nastalo 109 cvetov od teh je bilo 60 oz. 55 % cvetov opršenih. Semenske glavice je oblikovalo 46 oz. 76,7 % oplojenih cvetov. Od tega so se v 38 oz. 82,6 % semenskih glavicah tvorila semena in 7 oz. 15,2 % semenskih glavic se je predčasno posušilo oz. propadlo.
- Izbira primerno sestavljenega gojišča, postopek razkuževanja in kratkotrajno namakanje semen do 1 ure so ugodno vplivali na kalivost in razvoj semen pri 10 kombinacijah križanja.
- Postopek razkuževanja smo izvedli z 1,6 % dikloroizocianurno kislino 8 minut pri sobni temperaturi in dvominutno nadaljevanje s centrifugiranjem pri 5000 obratih/min (1900 x g) in 4 °C.
- Skupno je bilo okuženih 23,7 % kombinacij semen. Od tega 22,3 % s plesnijo, 66,7 % z bakterijo in 11,1 % s kombinacijo bakterija in plesen.
- Od skupno 38 uspešnih kombinacij križanj so pri 10 kombinacijah križanj nastale rastline. Od tega 6 kombinacij navzkrižnih križanj in 4 kombinacije recipročnih križanj.
- Največ, 2,8 %, rastlin je nastalo pri navzkrižnem križanju z oznako 17, nekoliko manj, 2,5 % rastlin je nastalo pri navzkrižnem križanju z oznako 19. Pri navzkrižni kombinaciji križanja z oznako 18 je nastalo 1,8 % rastlin, 1,5 % rastlin je nastalo pri recipročnem križanju z oznako 14.
- Rastlina z oznako 3 je bila najuspešnejša pri navzkrižnih križanjih z oznako 16, 17, 18 in 19, ko je prispevala jajčno celico in to v kombinaciji z očetovo rastlino z oznako 7.
- Rastlina z oznako 2 je bila uspešna pri navzkrižnih križanjih z oznako 13 in 14, ko je prispevala jajčno celico oz. je bila materina rastlina v kombinaciji z očetovo rastlino z oznako 6 ter pri recipročnem križanju z oznako 14.

- Rastlina z oznako 4 ni bila kompatibilna z nobeno od vključenih rastlin. V primerih, ko je bila materina rastlina, so nastale semenske glavice brez semen, v primerih, ko je bila očetova rastlina, so cvetovi po opraitvi odpadli.
- Pri ostalih uspešnih kombinacijah križanja je nastalo 1,4 % rastlin oz. manj kot 1,4 %. Pri teh kombinacijah sta bili vključeni v križanja rastlina z oznako 5 kot mati in rastlino 1 kot oče.

6 POVZETEK

Orhideje so po raznolikosti barv in cvetov priljubljena rastlinska vrsta. Predvsem orhideje iz rodu *Phalaenopsis* imajo veliko komercialno vrednost, zato se zelo pogosto pojavljajo v žlahtnjiteljskih postopkih. Spadajo v družino kukavičevk (*Orhideaceae*), ki je razdeljena na dve podružini (*Cypripedioideae* in *Orchidoideae*). Največje število orhidej najdemo na gorskih predelih tropskega pasu, kjer so ponoči nizke temperature in zelo visoka relativna zračna vlaga. Uspevajo skoraj na vseh kontinentih razen na Antarktiki, odmaknjenih otokih in morjih.

Orhideje vsebujejo v semenskih glavicah na milijone semen, vendar vsa semena pogosto ne vsebujejo dozorelega embrija. Doseči kalivost tega semena je težko, ker veliko semen ne dozori, ko je semenska glavica že zrela ali ne najde ustreznih pogojev za kalitev. Za *in vivo* kalitev potrebuje seme ustrezne mikorizne glive. V *in vitro* razmerah pa lahko produkte gliv nadomestimo z ustrežno sestavo gojišč. Načrtno smo izvedli navzkrižno in recipročno križanje 7 komercialnih orhidej rodu *Phalaenopsis*.

Namen dela je bil preučiti, koliko semen različnih kombinacij križanj iz rodu *Phalaenopsis* inokuliranih na kalitveno gojišče bo kalilo in se razvilo v vitalne rastline. V ta namen smo cvetove navzkrižno in recipročno oprášili 2.3.2007. Semenske glavice smo pobirali postopoma, tako kot so dozorevale oz. se odpirale. Zračno smo jih dosušili in do 24.3.2008 hranili pri sobni temperaturi, nato smo jih površinsko razkužili in inokulirali v dveh ponovitvah na komercialno gojišče.

Seme smo s spatulo prenesli v mikrocentrifugirko in dodali 0,8 ml sterilizacijske tekočine in sterilizirali 8 minut pri sobni temperaturi. Nato smo postopek sterilizacije za 2 minuti nadaljevali v centrifugi (Beckman J2-HS) pri 5000 obratih/min (1900 x g) in temperaturi 4 °C. S centrifugiranjem smo sterilizacijsko tekočino ločili od semena. Z mikropipeto smo odpipetirali sterilizacijsko tekočino in dodali avtoklavirano bidestilirano vodo. Postopek centrifugiranja in spiranja smo ponovili štirikrat. Seme smo z zadnjo vodo za spiranje po eni uri z mikropipeto inokulirali na gojišče in ga z ukrivljeno, pod kotom 120 °, sterilno stekleno palčko porazdelili po površini gojišča v petrijevki (Jevšnik, 2002). Semena vsake kombinacije križanj smo inokulirali na gojišče dveh petrijevk oz. v dveh ponovitvah. Skupno je bilo 76 petrijevk, velikosti 90 x 15 mm.

Na 7 rastlinah je nastalo 109 cvetov od teh je bilo 60 oz. 55 % cvetov oprášenih. Semenske glavice je oblikovalo 46 oz. 76,7 % oplojenih cvetov. Semena so bila površinsko razkužena z 1,6 % dikloroizocianurno kislino in inokulirana v dveh ponovitvah oz. v dveh petrijevkah na komercialno gojišče z oznako P1056, proizvajalca Sigma. Skupno je bilo okuženih 23,7

% kombinacij semen. Od tega 5,6 % s plesnijo, 27,7 % z bakterijo in 66,7 % s kombinacijo bakterija in plesen.

Največ, 2,8 %, rastlin je nastalo pri navzkrižnem križanju z oznako 17, nekoliko manj, 2,5 %, rastlin je nastalo pri navzkrižnem križanju z oznako 19. Pri navzkrižni kombinaciji križanja z oznako 18 je nastalo 1,8 % rastlin, 1,5 % rastlin je nastalo pri recipročnem križanju z oznako 14. Rastlina z oznako 3 je bila najuspešnejša pri navzkrižnih križanjih z oznako 16, 17, 18 in 19, ko je prispevala jajčno celico in to v kombinaciji z očetovo rastlino z oznako 7. Rastlina z oznako 2 je bila uspešna pri navzkrižnih križanjih z oznako 13 in 14, ko je prispevala jajčno celico oz. je bila materina rastlina v kombinaciji z očetovo rastlino z oznako 6 ter pri recipročnem križanju. Kombinacije križanj materinih rastlin z oznako 5 in očetovih rastlin z oznako 1 so bile manj uspešne, in sicer z manj kot 1,4 % nastalih rastlin. Rastlina z oznako 4 ni bila kompatibilna z nobeno od vključenih rastlin. V primerih, ko je bila materina rastlina, so nastale semenske glavice brez semen, v primerih, ko je bila očetova rastlina, so cvetovi po opraitvi odpadli.

7 VIRI

- Arditti J. 1992. Fundamentals of Orchid Biology. New York, John Wiley & Sons : 712 str.
- Arditti J., Ghani A. K. A. 2000. Numerical and physical properties of orchid seed and their biological implications. Transley review, 145: 367-421
- Bohanec B. 1992. Tehnike rastlinskih tkivnih kultur. Ljubljana, BF, Oddelek za agronomijo, Center za rastlinsko biotehnologijo in žlahtnjenje: 168 str.
- Bohanec B. 2004. Osnove rastlinske biotehnologije V: Gensko spremenjena hrana. Bohanec B., Javornik B., Strel B. (ur.). Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 2-28 str.
- Christenson E. 2001. *Phalaenopsis*. Portland, The Haseltine Building: 183 str.
- Delforge, P. 1995. Orchids of Britain & Europe. Collins photo guide. London, Harper Collins Publishers: 480 str.
- Duan J. X., Yazawa, S. 1995. Floral induction and development in *Phalaenopsis in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 43: 71-74
- George E. F. 1993. The propagation of orchids. V: Training manual for short course in orchids culture Lubag A.M. (ur.). Los banos, University of the Philippines, Ornamental Crops Division: 917-922
- 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. Biotehniška fakulteta, Odd.za agronomijo: 64 str.
- Kramer J. 1997. Orchid for everyone. New York, Smithmark Publisher: 208 str.

Martinčič A., Wraber T., Jogan N., Ravnik V., Podobnik A., Turk B., Vreš B. 1999. Mala flora Slovenije. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 845 str.

McKenzie B. P. 1999. Orchid growing. London, Ward Lock Book: 160 str.

Moore R., Clark W. D., Vodopich D. S. 1998. Botany. Boston, The McGraw-Hill Companies: 920 str.

Orchids board. (21.8.2009)

<http://images.google.com/images?um=1&hl=en&tbs=isch:1&q=orchid+anatomy+phalaenopsis&sa=N&start=0&ndsp=18> (23.2.2010)

Petauer T. 1998. Mali leksikon botanike. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 390 str.

Pridgeon A. 1999. The Illustrated encyclopedia of orchids. The Rocks, Lansdowne Publishing Pty Ltd: 304 str.

Phalaenopsis, monopodial-simpodial growth. (29.1.2010)

<http://images.google.com/images?um=1&hl=en&tbs=isch:1&q=orchid++growth&sa=N&start=18&ndsp=18> (23.2.2010)

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

Rittershausen, W., Rittershausen, B. 1999. Orchids. London, Quadrille Publishing Ltd: 224 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.

Thompson, P.A. 1996. Orchids from seed. Kew, Royal Botanical Gardens.

Trenc-Frelj I. 1990. Orhideje – zbirka Moje sobne rastline. Ljubljana, Založba Mladinska knjiga: 63 str.

Zupan S. 2004. Vpliv različnih priprav semen orhidej *Bletilla striata* (Thunb.) in *Vanda cristata* (Lindl.) na kalitev. Diplomsko delo. Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 49 str.