

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Marko STRMOLE

**RAST IN RAZVOJ ORHIDEJ RODU *PHALAENOPSIS* V
IN VITRO RAZMERAH**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Marko STRMOLE

**RAST IN RAZVOJ ORHIDEJ *PHALAENOPSIS* V *IN VITRO*
RAZMERAH**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE GROWTH AND DEVELOPMENT ORCHIDS *PHALAENOPSIS* IN
IN VITRO CONDITIONS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

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

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

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Franc BATIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

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

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

Datum zagovora:

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

Marko Strmole

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 635.9:582.59:57.086.83:631.532(043.2)
KG okrasne orhideje /*Phalaenopsis*/asimbiotsko razmnoževanje/tkivne kulture/gojišča/kalitev/razvoj/rast
KK AGRIS F02
AV STRMOLE, Marko
SA LUTHAR, Zlata (mentorica)
KZ SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
LI 2009
IN RAST IN RAZVOJ ORHIDEJ *Phalaenopsis* V *IN VITRO* RAZMERAH
TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP X, 40 str., [1], 11 preg., 13 slik, 20 virov
IJ sl
JI sl/en
AI V poskus križanja je bilo vključenih 8 rastlin iz rodu *Phalaenopsis*, ki so se razlikovale po barvi cvetov, številu cvetnih stebel in cvetov. Oprašenih je bilo 64,6% cvetov od teh se jih je oplodilo oz. razvilo glavice 68% in v 44,5% glavic oz. 16 kombinacijah križanj so nastala semena s kalčki. Ta so bila površinsko razkužena z 1,6% dikloroizocianurno kislino in inokulirana v dveh ponovitvah na 4 gojišča z oznakami A, 1/2 A, B in 1/2 B. Gojišča so se razlikovala v sestavi in koncentraciji hranil ter hormonov. S postopkom razkuževanja je bila dosežena 91% aseptična kultura, pojavila se je samo glivična okužba. En teden po inokulaciji so semena oz. kalčki nabrekli, bistvenih razlik med gojišči in kombinacijami križanj ni bilo. Nekoliko bolj nabrekla oz. večja so bila semena na gojišču B s polno koncentracijo hranil. Dva tedna po inokulaciji so se pojavili zeleni protokormi in tudi posamezni rizoidi. Tri in štiri tedne po inokulaciji so se v kalitvi in razvoju med kombinacijami križanj in gojišči začele pojavljati razlike. Pet in šest tednov po inokulaciji so začela kaljiva semena in protokormi neustreznih kombinacij križanj predvsem na gojiščih A in B propadati. V sedmem in osmem tednu so se razvili prvi listi predvsem na gojiščih 1/2 A in 1/2 B. Deveti teden so se pojavili drugi listi in prve korenine. 100% so kalila in se 100% razvila v vitalne protokorme semena križanj 1, 2, 3, 5, 7 in 10 na gojišču 1/2 A in križanj 2, 3, 4, 6 in 9 na gojišču 1/2 B ter samo dveh križanj 4 in 7 na gojišču A. Na gojišču B semena nobene od kombinacij križanj niso 100% kalila in se razvila v vitalne protokorme. Gojišči 1/2 A in 1/2 B sta primerni tako za kalitev, kot tudi za razvoj orhidej po križanjih z zelo malo vitalnimi semeni.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
DC UDC 635.9:582.59:57.086.83:631.532(043.2)
CX ornamental orchids/*Phalaenopsis*/asymbiotic propagation/tissue culture/culture media/germination/development/growth
CC AGRIS F02
AU STRMOLE, Marko
AA LUTHAR, Zlata (supervisor)
PP SI – 1000, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
PY 2009
TI THE GROWTH AND DEVELOPMENT ORCHIDS *Phalaenopsis* IN *IN VITRO* CONDITIONS
DT Graduation Thesis (University studies)
NO X, 40 p., [1], 11 tab., 13 fig, 20 ref.
LA sl
AL sl/en
AB In the test of crossbreeding there were 8 *Phalaenopsis* plants, which differed in flower colour, in the number of stems and in the number of flowers. 64.6% of the flowers were pollinated, 68% of those were fructified i.e. developed seed capsules. In 44.5% of the capsules i.e. in 16 crossbreeding combinations the seeds with germs originated. These were superficially disinfected with 1.6% diclorisocianour acid and inoculated in two repetitions on 4 culture mediums marked A, 1/2 A, B and 1/2 B. The culture mediums differed in structure, in nourishment concentration and in hormones concentration. With the disinfection procedure the 91% aseptic culture was accomplished, only the germs infection appeared. A week after inoculation the seeds i.e. germs swelled up, there were no essential differences between culture mediums and crossbreeding combinations. The seeds on culture medium B with the full nourishment concentration were a bit more swollen i.e. were a bit bigger. Two weeks after inoculation green protocormies and some risoids appeared. Three and four weeks after inoculation the differences in development between crossbreeding combinations and culture mediums started to appear. Five and six weeks after inoculation the seeds with germs and protocormies of an inappropriate crossbreeding combination especially on culture mediums A and B started to decay. In the seventh and eighth week the first leaves on culture medium 1/2 A and 1/2 B developed. In the ninth week the second leaves and the first roots appeared. The seeds germinated 100% and were 100% developed in vital protocormies on 1, 2, 3, 5, 7 and 10 crossbreeding on culture medium 1/2 A and 2, 3, 4, 6 and 9 crossbreeding on culture medium 1/2 B and only two crossbreeding 4 and 7 on culture medium A. On culture medium B the seeds of no crossbreeding combination were not 100% germinated and did not develop in vital protocormies. The culture mediums 1/2 A and 1/2 B are appropriate for germination as well as for orchids development after crossbreeding with very few vital seeds.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Simboli in okrajšave	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN NALOGE	1
1.2 CILJ NALOGE.....	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 DRUŽINA <i>Orchidaceae</i> – KUKAVIČEVKE	2
2.2 BOTANIČNA KLASIFIKACIJA ORHIDEJ RODU <i>Phalaenopsis</i>	2
2.3 OPRAŠITEV	3
2.3.1 Zgradba cveta	3
2.3.2 Načini opravevanja	4
2.4 OPLODITEV IN RAZVOJ SEMENA.....	4
2.5 SKLADIŠČENJE SEMENA.....	5
2.6 MIKORIZA IN KALITEV.....	5
2.6.1 <i>In vivo</i> kalitev	5
2.6.2 <i>In vitro</i> kalitev	6
2.6.3 Razvoj sejancev	6
2.6.4 Habitus	6
2.7 STERILIZACIJA SEMEN.....	6
2.8 SESTAVA GOJIŠČ.....	7
2.8.1 Makrohranila	7
2.8.2 Mikrohranila	8
2.8.3 Ogljikovi hidrati	8
2.8.4 Organske snovi in vitamini	8
2.8.5 Strjevalci gojišč	9
2.8.6 pH-vrednost gojišča	9
3 MATERIAL IN METODE	10
3.1 SEMENSKI MATERIAL	10
3.2 STERILIZACIJA IN INOKULACIJA SEMEN NA GOJIŠČE	10

3.3	KALITEV IN GOJENJE	11
3.4	BONITIRANJE	11
3.5	SESTAVA IN PRIPRAVA GOJIŠČ	12
4	REZULTATI.....	14
4.1	NAVZKRIŽNO IN RECIPROČNO KRIŽANJE	14
4.2	STERILIZACIJA SEMEN	16
4.3	VPLIV GOJIŠČA IN KOMBINACIJE KRIŽANJ NA KALITEV, RAST IN RAZVOJ.....	16
4.3.1	Teden po inokulaciji semen	16
4.3.2	Dva tedna po inokulaciji semen.....	16
4.3.3	Tri in štiri tedne po inokulaciji semen	17
4.3.4	Pet in šest tednov po inokulaciji semen	19
4.3.5	Sedem in osem tednov po inokulaciji semen	21
4.3.6	Devet tednov po inokulaciji semen.....	23
4.3.7	Dvanajst tednov po inokulaciji semen	24
4.3.8	Šestnajst tednov po inokulaciji semen	26
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	33
5.1	RAZPRAVA.....	33
5.1.1	Navzkrižno in recipročno križanje	33
5.1.2	Sterilizacija semen in pridobitev aseptične kulture	33
5.1.3	Vpliv gojišča in kombinacije križanj na kalitev, rast in razvoj	34
5.2	SKLEPI.....	35
6	POVZETEK.....	37
7	VIRI	39
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Opis orhidej <i>Phalaenopsis</i> vključenih v križanja	10
Preglednica 2 Sestava gojišč A in B za kalitev, rast in razvoj orhidej <i>Phalaenopsis</i>	12
Preglednica 3: Število neoprašenih, opršenih, oplojenih in propadlih cvetov po navzkrižnem in recipročnem križanju orhidej <i>Phalaenopsis</i>	14
Preglednica 4: Kombinacije z nastalimi semeni po navzkrižnem in recipročnem križanju orhidej <i>Phalaenopsis</i>	15
Preglednica 5: Pojav glivične okužbe en, tri in dvanajst tednov po inokulaciji semen <i>Phalaenopsis</i> na gojišče	16
Preglednica 6: Nekaljiva semena ter razvoj protokormov in rizoidov tri in štiri tedne po inokulaciji semen <i>Phalaenopsis</i> na gojišče	17
Preglednica 7: Povečani protokormi in podaljšani rizoidi pet in šest tednov po inokulaciji semen <i>Phalaenopsis</i> na gojišče	19
Preglednica 8: Protokormi z močno razvitimi rizoidi in pojav prvih listov sedem in osem tednov po inokulaciji semen <i>Phalaenopsis</i> na gojišče	21
Preglednica 9: Pojav drugih listov in prvih korenin devet tednov po inokulaciji semen <i>Phalaenopsis</i> na gojišče	23
Preglednica 10: Število kaljivih, nekaljivih in propadlih semen ter vitalnih in propadlih protokormov na cm ² šestnajst tednov po inokulaciji semen <i>Phalaenopsis</i> na gojišče	26
Preglednica 11: Delež nekaljivih in propadlih semen ter propadlih protokormov na cm ² šestnajst tednov po inokulaciji semen <i>Phalaenopsis</i> na gojišče	32

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Centrifuga Beckman J2-HS	11
Slika 2: Nekaljiva in kaljiva semena s povečanimi in ozelenelimi protokormi ter posameznimi rizoidi dva tedna po inokulaciji semen <i>Phalaenopsis</i> na gojišče	17
Slika 3: Nekaljiva in kaljiva seme ter razvoj protokormov in rizoidov tri in štiri tedne po inokulaciji semen <i>Phalaenopsis</i> na gojišče	18
Slika 4: Propadanje kaljivih semen in protokormov pet in šest tednov po inokulaciji semen <i>Phalaenopsis</i> na gojišče	20
Slika 5: Pojav prvih listov sedem in osem tednov po inokulaciji semen <i>Phalaenopsis</i> na gojišče	22
Slika 6: Pojav drugih listov devet tednov po inokulaciji semen <i>Phalaenopsis</i> na gojišče	23
Slika 7: Propadanje in razvoj na gojišču B z različno koncentracijo hranil devet tednov po inokulaciji semen <i>Phalaenopsis</i> : A - propadanje kaljivih semen in protokormov na gojišču B; B - podaljšani listi in pojav korenin na gojišču $\frac{1}{2}$ B	24
Slika 8: Razvoj in propadanje protokormov dvanajst tednov po inokulaciji semen <i>Phalaenopsis</i> : A - propadanje kaljivih semen in protokormov ter razvoj protokormov v začetnih fazah na gojišču A; B - podolgovati protokormi z listi na gojišču $\frac{1}{2}$ A; C - propadanje kaljivih semen in protokormov v začetnih fazah na gojišču B; D - razvoj listov in korenin na gojišču $\frac{1}{2}$ B	25
Slika 9: Delež kaljivih semen (KS) in vitalnih protokormov (VP) na cm^2 pri križanju od 1 do 4 šestnajst tednov po inokulaciji semen <i>Phalaenopsis</i> na gojišče	27
Slika 10: Kombinacija križanja 3 šestnajst tednov po inokulaciji semen: A - propadanje nabreklih semen in razvoj protokormov na gojišču A; B - podolgovati protokormi na gojišču $\frac{1}{2}$ A; C - propadanje nabreklih semen in protokormov ter razvoj vitalnih protokormov na gojišču B; in D - protokormi s prvimi in drugimi listi ter koreninami na gojišču $\frac{1}{2}$ B	28

- Slika 11: Delež kaljivih semen (KS) in vitalnih protokormov (VP) na cm² pri križanju od 5 do 8 šestnajst tednov po inokulaciji semen *Phalaenopsis* na gojišče 29
- Slika 12: Delež kaljivih semen (KS) in vitalnih protokormov (VP) na cm² pri križanju od 9 do 12 šestnajst tednov po inokulaciji semen *Phalaenopsis* na gojišče 30
- Slika 13: Delež kaljivih semen (KS) in vitalnih protokormov (VP) na cm² pri križanju od 13 do 16 šestnajst tednov po inokulaciji semen *Phalaenopsis* na gojišče 31

SIMBOLI IN OKRAJŠAVE

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

$\mu\text{mol/m}^2\text{s}$ - mikro mol na kvadratni meter na sekundo

pH - negativni logaritem koncentracije vodikovih ionov

A, 1/2 A, B in 1/2 B - oznake gojišč

C - odprti cvetovi

D - oprášeni cvetovi

E - oplodjeni cvetovi

F - propadli cvetovi

KK - kombinacija križanja

S - seme

KS - kaljiva semena

NS - nekaljiva semena

PS - propadlo seme po kalitvi

P - protokormi

R - rizoidi

Č - črni, propadli protokormi

L - listi

K - korenine

VP - vitalni protokormi

PP - propadli protokormi

♀ - ženska, materina rastlina

♂ - moška, očetova rastlina

+ - malo

++ - srednje

+++ - veliko

1 UVOD

Orhideje so zelo razširjena družina rastlin. Zanimive so zlasti po obliki in barvi cvetov. Priljubljene so tako lončnice kot tudi rezano cvetje. Rod *Phalaenopsis* se prodaja kot lončnica in tudi kot rezano cvetje, zlasti zaradi dolgih cvetnih stebel. Večina vrst uspeva v rastlinjakih, nekatere gojimo doma, mnoge pa uspevajo v naravi. Tiste, ki jih najdemo v naravi so pomemben vir genov za pridobivanje novih križancev, kar se je močno razmahnilo z možnostjo asimbiotskega razmnoževanja s semeni (Trenc-Frelih, 1990).

Na splošno so orhideje glede gojenja dokaj zahtevne rastline. Gre za skupino rastlin, ki imajo zelo majhna semena brez endosperma. Kalčki pri nekaterih vrstah v polni zrelosti še niso popolnoma razviti. Dolgo je bilo znano, da semena orhidej kalijo le ob prisotnosti mikoriznih gliv. Mikoriza je v tem primeru sožitje med orhidejami in glivami. Dokazano je, da semena orhidej lahko kalijo tudi ob odsotnosti gliv, t.j. asimbiotsko, na sterilnem gojišču obogatenem z ustreznimi hranili. Kasneje so sledili še mnogi poskusi z različnimi vrstami tropskih orhidej na različnih gojiščih, ki se velikokrat različno odzovejo na sestavine gojišča (Arditti, 1992, cit. po Knudson, 1922). Poskusi lahko zahtevajo večletna opazovanja in proučevanja, preden ugotovimo na katerem gojišču posamezne vrste najbolj uspevajo.

V poskus proučevanja rasti in razvoja v *in vitro* razmerah smo vključili rod orhidej *Phalaenopsis*, ki spada v družino *Orchidaceae* in poddružino *Orchidoideae*. To je rastlina, ki ima monopodialno rast s kratkimi stebli in brez pseudobulbilov. Cvetovi so različnih barv.

1.1 NAMEN NALOGE

Namen naloge je bil proučiti kompatibilnost ter rast in razvoj 8 komercialnih orhidej rodu *Phalaenopsis* po 16 uspešnih kombinacijah križanja na dveh komercialnih gojiščih s polno in polovično koncentracijo hranil, hkrati pa ugotoviti katero gojišče je najprimernejše za rast in razvoj embrijev, protokormov, rizoidov, listov in korenin.

1.2 CILJ NALOGE

Osnovni cilj je bil zagotoviti čim hitrejšo in enakomerno kalitev semen brez okužb in boljše razmere za rast in razvoj orhidej na komercialno pripravljenih gojiščih. Če bi se katera od različnih koncentracij gojišč pokazala za uspešno, bi se lahko uporabljala za kalitev, rast in razvoj večjega števila orhidej v komercialne namene in tudi v žlahtniteljske, za skrajševanje postopkov žlahtnjenja zanimivih genotipov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 DRUŽINA *ORCHIDACEAE* – KUKAVIČEVKE

Kukavičevke (*Orchidaceae*) so poleg trav (*Poaceae*) in košaric (*Asteraceae*) ena izmed najbolj razširjenih družin cvetnic na svetu. Ocenjujejo, da družino kukavičevk sestavlja približno 750 različnih rodov z 20000 do 30000 vrstami in podvrstami, število pripadnikov te družine pa se še povečuje zaradi številnih križancev, ki so jih vrtnarji vzgojili v okrasne namene (Arditti, 1992). Največ vrst najdemo v tropskih predelih Južne Amerike in jugovzhodne Azije. V Evropi raste okoli 300 vrst, v Sloveniji pa je bilo do sedaj najdenih 76 vrst (Ravnik, 2002).

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

Kukavičevke so najmlajša in med najbolj razvitimi družinami rastlin, vendar se še vedno aktivno razvijajo (Arditti, 1992).

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 *PHALAEENOPSIS*

DEBLO: *Spermatophyta* – semenke

PODDEBLO: *Magnoliophytina (Angiospermae)* – kritosemenke

RAZRED: *Liliopsida (Monocotyledoneae)* – enokaličnice

PODRAZRED: *Liliidae*

NADRED: *Orchidanae*

RED: *Orchidales* – kukavičevci

DRUŽINA: *Orchidaceae* – kukavičevke

PODDRUŽINA: *Orchidoideae*

PLEME: *Vandaeae*

PODPLEME: *Sarchantinae*

ROD: *Phalaenopsis*

Orhideje rodu *Phalaenopsis* izhajajo iz daljnega vzhoda, še posebej močno so zastopane na območjih od Indije, Indonezije, severne Avstralije do Filipinov. Ime izvira iz grških besed *phalaina* (molj) in *opsis* (izgled), kar se nanaša na tipično obliko cveta (McKenzie Black, 1999). Rod *Phalaenopsis* združuje 66 vrst (Christenson, 2001). Imajo monopodialno rast s kratkimi stebli in brez pseudobulbilov. Rastejo predvsem na obrobjih gozdov, kjer so dobro zaščitene pred močnimi sončnimi žarki z listi dreves. Imajo mesnate liste, tesno drug poleg drugega, močne korenine in velike, krasne cvetove. Za normalno rast in razvoj so pomembne tudi konstantne tople in vlažne razmere ter porozen substrat. Ob premočni osvetlitvi 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 rastne razmere (Rittershausen W. in Rittershausen B., 1999).

2.3 OPRAŠITEV

2.3.1 Zgradba cveta

Cvet kukavičevk je someren in sestavljen iz šestih cvetnih listov. Osnova cveta pri orhidejah so trije zunanji čašni listi (sepala) in trije notranji venčni listi (petala). Čašni in venčni listi so pri orhidejah obarvani, medtem ko so pri ostalih cvetočih rastlinah čašni listi večinoma zeleni, obarvani pa so le venčni listi. Skupna značilnost cvetov orhidej je, da so v vertikalni ravnini razdeljeni na dve enaki polovici.

Notranji krog cveta je sestavljen iz treh venčnih listov – notranji perigon, od katerih je eden običajno drugačen po obliki, velikosti, barvi in splošnemu izgledu. Imenuje se medena ustna (labellum), ki je podaljšana v ostrogo. V njej se nahajajo nektarne žleze, ki privlačijo žuželke k opraševanju. Ostala dva cvetna lista sta običajno nameščena drug čez drugega in sta najbolj spremenljiva od vseh cvetnih delov.

Spolni organi (prašniki in pestič) so pri orhidejah shranjeni v posebni podolgovati strukturi imenovani stebriček. Prašnik je sestavljen 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, v vdolbinici, ki jo imenujemo klinandrij. Ženski spolni organ, imenovan brazda (stigma), je od moškega spolnega organa ločen s tkivom imenovanim rostelum (Kramer, 1997).

2.3.2 Načini opravevanja

Spolno razmnoževanje pri cvetnicah je odvisno od opravitve, ki jo predstavlja prenos cvetnega prahu iz prašnika na sprejemno mesto brazde (Moore in sod., 1998). Za uspešno opraviitev je potreben dozorel in odprt cvet, zato se opravitve večinoma dogajajo v dopoldanskem času, ko se cvet popolnoma odpre.

Večina orhidej je alogamnih, lahko pa so tudi avtogamne, kleistogamne in apogamne. Alogamnost je lastnost orhidej, kjer pride do navzkrižnega opravevanja med različnimi rastlinami (Petauer, 1998). Opravevanje poteka na poseben način. Ko se žuželka usede na medeno ustno (labellum) in hoče priti do nektarja v ostrogi, zadene z glavo ob lepljivo ploščico polinarija. Ta se prilepi nanjo in žuželka ga odnese na drugi cvet, kjer z glavo, na kateri nosi prilepljen polinarij, zadene ob lepljivo brazdo. Polinarij se prilepi na brazdo in cvet je opraven. Avtogamne se opraveujejo same, kjer se kavdikula upogne in polinarij se prilepi na brazdo. Kleistogamna opraviitev pa se zgodi še preden se cvet odpre. V obeh primerih gre za samoopravevanje.

Poleg naravnega opravevanja poznamo še umetno opravevanje, ki ga lahko opravimo v zaprtem prostoru. Prednost le tega je, da ga lahko opravimo kadarkoli podnevi ali ponoči. Umetno opravevanje poteka tako, da najprej odberemo »starševski rastlini«. Ena bo tvorila glavico, druga pa bo donor peloda, ki bo omogočil oploditev. Bistvo umetne oploditve je, da polinij namestimo na brazdo orhideje, ki bo tvorila glavico.

2.4 OPLODITEV IN RAZVOJ SEMENA

Proces oploditve se prične, ko pelodno zrno na brazdi pestiča začne kaliti. 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 kukavičevkah druga spermalna celica degenerira in se sploh ne združi s polarnim jedrom, kar prepreči rast sekundarnega endosperma (Arditti, 1992). Zrelo seme je sestavljeno le iz embrija in teste (Pridgeon, 1999). Oploditev se začne 50 do 80 dni po opravitvi, delitev zigote pa 2 do 30 dni za tem. Prva delitev celic je ponavadi transverzalna, kjer nastaneta bazalna in terminalna celica. Ta delitev polarizira embrijo 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 posamezne 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 klični list. Pri orhidejah ima zrel embrij nediferencirano tkivo (Arditti, 1992). Celice embrija so različno velike, kar je odvisno od njihove lokacije. Meristemski del je zgrajen iz manjših celic (premer 8 – 10 μm), ostale pa so večje. Vse celice vsebujejo zaloge hrane v obliki lipidov in beljakovinskih telesc. Škrobnih telesc je zelo malo ali pa jih sploh ni (Arditti, 1992).

Semena orhidej so zelo majhna in ekstremno lahka. Dolga so od 0,05 do 6,0 mm in široka od 0,01 do 0,9 mm. Teža semen niha med 0,31 in 24 µg. Semenska ovojnica (testa) je ponavadi transparentna in ima veliko večji volumen kot embrij, ki ga varuje pred poškodbami. Zunanja plast teste je relativno vodoodporna, kar omogoča dolgotrajno plavanje na vodi. Ta lastnost semenu omogoča potovanje z vodo po vejah in debelih dreves ter rekah in verjetno tudi morjih.

2.5 SKLADIŠČENJE SEMENA

Skladiščenje semena je zelo zahtevno. Semena morajo biti zaščitena pred previsoko temperaturo in vlago. Prevelika vlaga lahko povzroči razvoj glivičnih okužb. Po drugi strani pa nekatere orhideje po daljšem namakanju boljše kalijo.

Večina semen epifitskih orhidej se najpogosteje shranjuje pri 4 °C in 5% relativni vlagi ali pa jih preprosto osušijo in shranijo v hladilniku (4 °C). Možno je tudi shranjevanje semen v raztopini kalcijevega klorida, zlasti tistih semen, ki v hladnem in vlažnem skladišču hitro propadejo.

2.6 MIKORIZA IN KALITEV

2.6.1 *In vivo* kalitev

Semena orhidej so zelo majhna in imajo malo sekundarnega endosperma ali ga sploh nimajo, zato so za kalitev in razvoj potrebne simbiotske glive. Pomembno je, da se simbioza vzpostavi zelo hitro po kalitvi semena (Sinkovič, 2000).

Mikoriza je sožitje ali simbioza rastlinskih korenin in gliv. Gre za povezano življenje dveh organizmov različnih vrst, pri katerem imata oba organizma korist, ki je lahko začasna ali pa poteka brez prekinitve. Mikorizne glive tvorijo v tleh omrežje nitastih hif, ki tvorijo micelij. Poznamo dva tipa mikorize, ektotrofno in endotrofno. Pri ektotrofni mikorizi se hife gliv naselijo na površini korenin. Pri endomikorizi pa hife gliv prodrejo v rastlino. Endomikoriza je posebej pogosta pri tropskih rastlinah, kjer gliva učinkovito črpa fosfor in druge minerale iz sicer zelo revnega okolja, ki je značilen za ta habitat.

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

2.6.2 *In vitro* kalitev

Seme vzkali 7 do 235 dni po tem, ko ga inokuliramo na gojišče s sladkorjem. Celice terminalnega dela se pri rodu *Phalaenopsis* začno hitro deliti in tvorijo meristem. Lipidna telesca postanejo redkejša in se začno združevati. Po nekaj dneh, ko se izčrpajo, se iz njih razvijejo vakuole. Celice pod meristemom se ne delijo, ampak se le povečajo. Zaradi tega je embrij sprva hruškaste oblike, nato pa postane okroglast. V tej fazi embrij zapusti semensko ovojnico ali testo. Imenujemo ga protokorm. Iz njega poženejo številni lasasti rizoidi, ki so najprej enocelični in nato večcelični. Nekaj celic na zgornji strani tvori zametke primordialnega lista. Prokambijsko tkivo v tej fazi poveže protokorm in novo listno strukturo (po 50 – 60 dneh). Prvi list predstavlja ovoj mlade rastline. Kmalu zatem nasproti prvemu požene drugi list. Prva korenina se tvori znotraj protokorma in ga predre na spodnji, bazalni strani. Od ostalih rastlin se semena orhidej ločijo po tem, da nimajo endosperma in imajo v splošnem zelo občutljivo strukturo. Razen nekaj škrobnih zrn semena orhidej ne vsebujejo zaloge ogljikovih hidratov. V naravi semena orhidej kalijo le, če jih okužijo mikorizne glive *Rhizoctonia*, *Tulasnella*, *Ceratobasidium*. V laboratorijih pa kalijo relativno dobro na specifičnih gojiščih (Arditti, 1992).

2.6.3 Razvoj sejancev

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).

2.6.4 Habitus

Poznamo dva načina rasti, monopodialen in simpodialen. Večina orhidej ima simpodialen način rasti. Rastline tega tipa poženejo vsako leto nov poganjek iz osnove lanskoletne rasti. Veliko simpodialnih orhidej tvori pseudobulbule. Tako jih imenujemo zato, ker niso pravi bulbili (gomolji, čebulice). Gre za odebeljen del stebela, ki služi kot skladišče hrane in vode. Pseudobulbili omogočajo rastlini, da preživi obdobje pomanjkanja vlage. Lahko so veliki nekaj milimetrov ali pa 20 cm, najpogosteje so jajčaste, sploščene ali podolgovate oblike. Cvetno steblo požene iz vrha dozorelega pseudobulbila, ali pa iz njegovega vznožja (Kramer, 1997).

2.7 STERILIZACIJA SEMEN

Semena pred inokulacijo na gojišče, steriliziramo. Sterilizacija je zelo pomembna faza mikropropagacije. Od uspešne sterilizacije je odvisen celoten nadaljnji potek dela. Ker so semena orhidej zelo majhna, zahtevajo posebne postopke sterilizacije. Semena kljub krhkosti

dobro prenašajo površinsko sterilizacijo z različnimi kemičnimi sredstvi. Steriliziramo jih na način, ki bo preprečil okužbo, vendar bo embrijo kljub vsemu ostal nepoškodovan. Za sterilizacijo se največkrat uporablja raztopina kalcijevega hipoklorita, ki je kemično nestabilna raztopina. Pogosto se uporabljata tudi raztopini natrijevega hipoklorita in vodikovega peroksida (Hicks, 2000). V našem poskusu smo uporabili dikloroizocianurno kislino natrijeve soli ($C_3Cl_2N_3O_3Na$) proizvajalca Sigma v koncentraciji 16,6 g/l avtoklavirane destilirane vode z dodatkom močila Tween 20.

Hicks (2000) predstavlja različne tehnike sterilizacije semen: 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 sterilizacija končana prenehamo s tresenjem. S pipeto odstranimo raztopino. Raztopino nadomestimo s sterilno destilirano vodo in ponovno pretresemo. Spiranje z vodo lahko večkrat ponovimo, da odstranimo sterilizacijsko raztopino. Nato semena s pipeto prenesemo na gojišče. Pri tehniki filtriranja se za ločevanje semen od sterilizacijske raztopine uporabljajo erlenmajerica, cedilni lij in filterški papir. Cedilnik in filterški papir steriliziramo z avtoklaviranjem. Cedilni lij in filterški papir namestimo na erlenmajerico ter z nekaj kapljicami raztopine navlažimo filterški papir. Dodamo semena in sterilizacijsko 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 filter papirja lahko odstranimo na več načinov: s sterilno pinceto jih prenesemo na gojišče, preostala semena pa speremo z destilirano vodo, lahko pa filter papir s sterilno pinceto prenesemo v sterilno 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 sterilizacije semen ni večjih novosti. Pogosto se za sterilizacijo 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 sterilizaciji delov rastlin za gojitev v tkivni kulturi, ko so dele rastlin spirali od 24 do 48 ur. Avtor je dobil dobre rezultate pri sterilizaciji semen v raztopini 3,0 do 5,0 g DCCA/l destilirane vode. Pri močni raztopini DCCA je pH rahlo kisel (Hicks, 2000).

2.8 SESTAVA GOJIŠČ

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

2.8.1 Makrohranila

Med makrohranila štejemo minerale, ki jih rastlina potrebuje v večjih količinah. To so dušik, fosfor, kalij, kalcij, magnezij in žveplo (Thompson, 1996). Pri gojenju orhidej se dušik

uporablja v amonijski (NH_4^+), nitratni (NO_3^-) in organski obliki (aminokislina, urea in njene sestavine). Rastlini je bolj dostopna nitratna oblika, vendar šele ko dosežejo neko stopnjo razvoja, v kateri začno delovati encimi (nitratne reduktaze). Pri kalitvi je zato priporočljivo dodati tudi amonijsko obliko.

2.8.2 Mikrohranila

K mikroelementom spadajo mangan, baker, cink, bor in molibden ter železo. Ker jih rastline potrebujejo v zelo majhnih količinah, jih skupaj raztopimo v založno raztopino in se s tem izognemo vsakokratnemu tehtanju ter napakam (Thompson, 1996).

2.8.3 Ogljikovi hidrati

Ogljikovi hidrati (sladkorji) predstavljajo vir ogljika in energije razvijajočim se rastlinam. Kot ogljikov hidrat se najpogosteje uporablja saharoza, ki med avtoklaviranjem razpade na glukozo in fruktozo zlasti v kislih raztopinah. Fruktoza je boljši sladkor, saj zagotavlja boljšo rast in razvoj korenin in listov. Z njeno uporabo rasteta tudi teža in razvoj rastlin (Hicks, 2000). Fruktoza se navadno uporablja kot visoko fruktozni sirup, ki je v veliki meri izpodrinil dražji trsni in pesni sladkor. Med bi lahko potrdili kot odličen komercialni vir fruktoze (Hicks, 2000).

2.8.4 Organske snovi in vitamini

Med organske snovi in vitamine štejemo inozitol, pepton, bananin prašek, oglje, MES, piridoksin, tiamin, nikotinsko kislino, α -naftalen očetno kislino in 6-benzil aminopurin.

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

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

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

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

Osnovni dodatek hranljivemu gojišču je oglje, ki ima velike adsorpcijske sposobnosti. Nase veže odpadne snovi, predvsem polifenole, ki jih v gojišče izloča rastlina (Arditti in Krikorian, 1996). Orhideje so znane, da izločajo veliko izločkov, ki lahko toksično vplivajo na rast in razvoj. Oglje v kombinaciji z dodatkom banane pomembno vpliva na povečanje rasti korenin in poganjkov. Prah oglja lahko nadomestimo s prahom grafita ali čada, vendar se nobena sestavina ni izkazala za tako uspešno kot oglje (Hicks, 2000).

Kot dodatek se uporablja tudi banana, ki je dobrodošla sestavina in je prisotna v že pripravljenih gojiščih posameznih dobaviteljev. Uporablja se za rast rastlin. Dodaja se lahko kot sveža banana ali pa v obliki otroške hrane. V zadnjem času v obliki bananinega praška.

2.8.5 Strjevalci gojišč

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

2.8.6 pH-vrednost gojišča

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

3 MATERIAL IN METODE

3.1 SEMENSKI MATERIAL

V poskus asimbiotske kalitve je bilo zajetih 8 rastlin iz rodu *Phalaenopsis*, ki so se razlikovale po barvi cvetov, številu cvetnih stebel in cvetov (preglednica 1). Cvetovi so bili načrtno in navzkrižno oprášeni 14. marca 2008. Nekateri so se po oprášitvi oplodili, drugi so predčasno odpadli. Iz oplojenih cvetov so se razvile glavice brez oz. s semeni. Ta semena smo nato vključili v nadaljevanje poskusa. Glavice smo pobirali postopoma, tako kot so dozorevale oz. se odpirale. Do razkuževanja in inokulacije na gojišča 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	temno roza	2
2	svetlo roza	1
3	vijolična	2
4	vijolična	2
5	rumeno zelena z vijolično ustno	2
6	bela	1
7	bela	1
8	rumena	4

3.2 STERILIZACIJA IN INOKULACIJA SEMEN NA GOJIŠČE

Semena smo površinsko sterilizirali in inokulirali 18. februarja 2009 na gojišča z oznako A in B s celo in polovično koncentracijo hranil (preglednica 2). Za sterilizacijo 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 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 (slika 1). 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; Zupan, 2004). Seme vsake kombinacije križanja smo inokulirali na vsako gojišče v dveh ponovitvah. Skupno je bilo 128 petrijevk, velikosti 90 x 15 mm.

Celotni postopek sterilizacije 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 sterilni pogoji dela, ob neprestanem delu komore in izmenjavi sterilnega zraka. Orodje, ki smo ga uporabili je bilo sterilizirano v visokotemperaturnem grelcu pri 815 °C.



Slika 1: Centrifuga Beckman J2-HS

3.3 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 $23 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.4 BONITIRANJE

Po inokulaciji semen na gojišča smo vsak teden s stereomikroskopom pri 20 kratni povečavi spremljali kalitev in razvoj protokormov ter vizualno razvoj listov in korenin.

Šestnajsti teden po inokulaciji semen smo prešteli nekaljivih in kaljiva semena, odmrle in vitalne protokorme z in brez rizoidi ter pojav listov in korenin na cm^2 .

3.5 SESTAVA IN PRIPRAVA GOJIŠČ

Preglednica 2: Sestava gojišč A in B za kalitev, rast in razvoj orhidej *Phalaenopsis*

Sestavine	GOJIŠČE	
	A (6793)	B (1056)
MAKROELEMENTI (mg/l)		
KH ₂ PO ₄	85	85
NH ₄ NO ₃	825	825
KNO ₃	950	950
CaCl ₂	166	166
MgSO ₄ x 7H ₂ O	90,35	90,35
MIKROELEMENTI (mg/l)		
H ₃ BO ₄	3,1	3,1
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	5,3	5,3
MnSO ₄ x H ₂ O	8,45	8,45
KJ	0,415	0,415
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,0125	0,0125
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,0125	0,0125
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,125	0,125
FeSO ₄ x 7H ₂ O	27,85	27,85
Na ₂ Fe-EDTA	37,24	37,24
OGLJIKOV HIDRAT (g/l)		
Saharoza	20	20
ORGANSKE SNOVI IN VITAMINI (% , mg/l)		
Inozitol	100	100
Pepton	2000	2000
Bananin prašek, 50% maltodekstrin	-	30000
Oglje	-	2000
MES	1000	1000
Piridoksin - HCl	0,5	1
Tiamin – HCl	1	10
Nikotinska kislina	0,5	1
α-naftalen očetna kislina (NAA)	0,5	-
6-benzil aminopurin (BAP)	2	-
STRJEVALEC (g/l) IN pH VREDNOST		
Gellun gum	2,6	2,6
pH gojišča	5,4	5,4

Gojišči A in B sta bili pripravljene s polno in polovično koncentracijo hranil (1/2 A, 1/2 B). Obe gojišči sta bili od proizvajalca Sigma. Gojišče A je imelo oznako 6793 in gojišče B 1056. Količina makroelementov je bila v obeh gojiščih enaka. Dušik je bil v nitratni obliki (amonijev nitrat in kalijev nitrat). Fosfor in magnezij v obliki kalijevega hidrogen fosfata in magnezijevega sulfata (preglednica 2).

Prav tako je bila vsebnost mikrohranil v obeh gojiščih enaka.

Gojišče A je vsebovalo enake organske snovi in vitamine kot gojišče B, razen oglja in bananinega praška, poleg tega pa je vsebovalo še 6-benzil aminopurin 2 mg/l in α-naftalen očetno kislino 0,5 mg/l.

Strjevalec (Gellun gum) je bil v obeh gojiščih isti, prav tako je bila pH vrednost v obeh gojiščih 5,4 (preglednica 2).

Komercialni gojišči A in B smo pripravili tako, da smo zatehtali celotno in polovično koncentracijo hranil (1/2 A, 1/2 B) in pretresli v čaše ter prelili z bidestilirano vodo. Gojišče smo raztopili z mešanjem s teflonskim magnetom na električnem mešalu. Z bučko smo določili volumen gojišč. S pH metrom smo uravnali pH vrednost gojišč z 1N KOH oz. 1N HCl. Optimalen pH je bil 5,4. Pred avtoklaviranjem smo dodali še strjevalec Gellun gum. Gojišče smo avtoklavirali 20 minut pri 121 °C in tlaku 1,1 bar. Avtoklavirano gojišče smo v brezprašni komori prelili v petrijevke in pustili, da se je strdilo.

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				4. cvetno steblo			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
1	4	3	2	1	1	4	2	2								
2	2	4	3	1												
3	1	6	3	3	-	3	2	1								
4	2	2	2	-	3	5	3	2								
5	4	4	2	2	-	4	3	1								
6	-	8	7	1												
7	4	2	2	-												
8	2	2	-	2	-	4	3	1	4	1	1	-	2	1	1	-
Skupno	19	31	21	10	4	20	13	7	4	1	1	0	2	1	1	0

LEGENDA:

A - odprti cvetovi = 29, B - opraseni cvetovi = 53, C - oplojeni cvetovi = 36, D - propadli cvetovi = 17

Na 8 rastlinah, ki so bile vključene v križanja je nastalo 82 cvetov od teh je bilo 53 oz. 64,6% oprasnih. Od skupno 36 oz. 68% oplojenih cvetov, ki so oblikovali glavice jih je 16 oz. 44,5% tvorilo semena, ki so po pregledu s stereomikroskopom vsebovala kalčke. Semena teh kombinacij naj bi po inokulaciji na ustrezna gojišča kalila. Ostalih 20 oz. 55,5% kapsul je bilo praznih, brez semen oz. semena niso vsebovala kalček. Po opraitvi je 17 oz. 32% cvetov propadlo, se posušilo oz. predčasno odpadlo z rastlin (preglednica 3 in 4).

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

Kombinacija križanja	Oznaka rastline in cvetnega stebela	
	ženska (♀)	moška (♂)
1 Navzkrižna	2 ♀ 1. cvetno steblo	5 ♂ 1. cvetno steblo
2 Navzkrižna	1 ♀ 1. cvetno steblo	6 ♂ 1. cvetno steblo
3 Navzkrižna	3 ♀ 1. cvetno steblo	6 ♂ 1. cvetno steblo
4 Recipročna	6 ♀ 1. cvetno steblo	1 ♂ 1. cvetno steblo
5 Recipročna	6 ♀ 1. cvetno steblo	3 ♂ 1. cvetno steblo
6 Navzkrižna	3 ♀ 2. cvetno steblo	6 ♂ 1. cvetno steblo
7 Navzkrižna	2 ♀ 1. cvetno steblo	6 ♂ 1. cvetno steblo
8 Navzkrižna	3 ♀ 1. cvetno steblo	7 ♂ 1. cvetno steblo
9 Recipročna	7 ♀ 1. cvetno steblo	3 ♂ 1. cvetno steblo
10 Navzkrižna	7 ♀ 1. cvetno steblo	3 ♂ 2. cvetno steblo
11 Recipročna	3 ♀ 2. cvetno steblo	7 ♂ 1. cvetno steblo
12 Navzkrižna	4 ♀ 1. cvetno steblo	8 ♂ 3. cvetno steblo
13 Navzkrižna	8 ♀ 2. cvetno steblo	2 ♂ 1. cvetno steblo
14 Navzkrižna	4 ♀ 1. cvetno steblo	8 ♂ 4. cvetno steblo
15 Navzkrižna	3 ♀ 1. cvetno steblo	4 ♂ 2. cvetno steblo
16 Recipročna	8 ♀ 4. cvetno steblo	4 ♂ 1. cvetno steblo

Pri 16 kombinacijah križanja so se v glavicah razvila semena. Od teh je bilo 11 kombinacij navzkrižnega opraševanja in 5 kombinacij recipročnega. Od 8 vključenih rastlin v križanja jih je 7, razen rastline z oznako 5, prispevalo jajčne celice (ženske rastline) in vseh 8 rastlin je prispevalo pelod (moške rastline). Te kombinacije križanja so bile uspešne oz. so se v glavicah tvorila semena s kalčki (preglednica 4).

4.2 STERILIZACIJA SEMEN

Preglednica 5: Pojav glivične okužbe en, tri in dvanajst tednov po inokulaciji semen *Phalaenopsis* na gojišču

Oznaka križanja / teden po inokulaciji	Koncentracija in oznaka gojišča	Vrsta okužbe
1 / 1	B	gliva
8 / 1	A	gliva
10 / 1	1/2 B	gliva
14 / 1	1/2 B	gliva
15 / 1	B	gliva
16 / 1	1/2 B	gliva
16 / 1	B	gliva
5 / 3	A	gliva
11 / 3	B	gliva
5 / 12	B	gliva
12 / 12	1/2 B	gliva
15 / 12	1/2 A	gliva

V prvem tednu *in vitro* gojenja orhidej *Phalaenopsis* je prišlo do prvih okužb. Pojavila se je glivična okužba in to pri 7 kombinacijah križanja z oznakami 1 na gojišču B, 8 na gojišču A, 10 in 14 na gojišču 1/2 B, 15 na gojišču B in 16 na gojišču 1/2 B. Do naslednjih dveh primerov okužbe z glivo je prišlo tri tedne po inokulaciji pri kombinacijah z oznakami križanja 5 na gojišču A in 11 na gojišču B. Zadnji trije primeri okužbe z glivo so se pojavili dvanajst tednov po inokulaciji pri križanjih z oznakami 5 na gojišču B, 12 na gojišču 1/2 B in 15 na gojišču 1/2 A (preglednica 5). Z navedenim postopkom razkuževanja je bila dosežena 91% aseptična kultura, ki je bila ohranjena do konca poskusa.

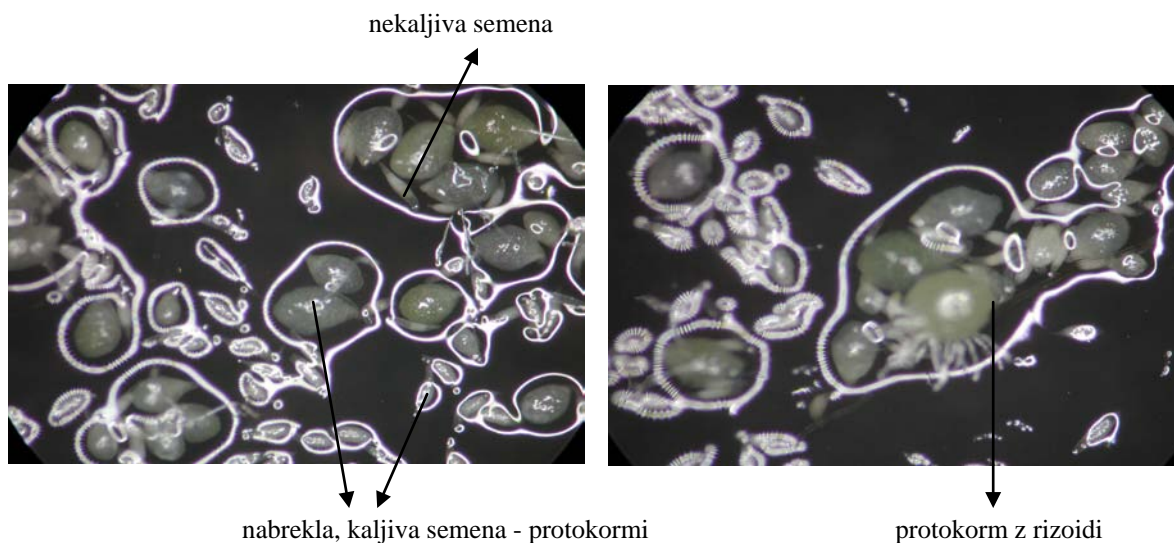
4.3 VPLIV GOJIŠČA IN KOMBINACIJE KRIŽANJ NA KALITEV, RAST IN RAZVOJ

4.3.1 Teden po inokulaciji semen

En teden po inokulaciji so semena oz. kalčki nabrekli. To smo šteli kot začetek kalitve. V tem obdobju bistvenih razlik v razvoju na gojiščih ni bilo. Nekoliko bolj nabrekla oz. večja so bila semena na gojišču B s polno koncentracijo hranil, ki je vsebovalo bananin prašek in oglje (preglednica 2).

4.3.2 Dva tedna po inokulaciji semen

Dva tedna po inokulaciji so semena še bolj nabrekla. Kalčki so se povečali in ozeleneli. Ta faza kalitve se pri orhidejah imenuje protokorm. Pojavili so se tanki rizoidi (slika 2). Tudi v tem primeru ni bilo bistvenih razlik v kalitvi med gojišči.



Slika 2: Nekaljiva in kaljiva semena s povečanimi in ozelenelimi protokormi ter posameznimi rizoidi dva tedna po inokulaciji semen *Phalaenopsis* na gojišče

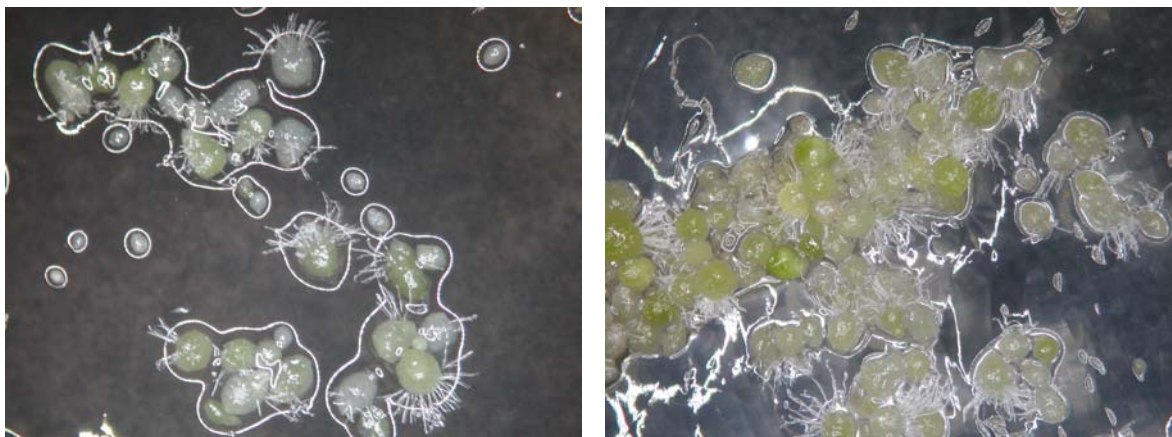
4.3.3 Tri in štiri tedne po inokulaciji semen

Preglednica 6: Nekaljiva semena ter razvoj protokormov in rizoidov tri in štiri tedne po inokulaciji semen *Phalaenopsis* na gojišče

Kombinacija križanja	Koncentracija in oznaka gojišča											
	A			1/2 A			B			1/2 B		
	NS	P	R	NS	P	R	NS	P	R	NS	P	R
1		+	+		+++	+		+	+		+++	+++
2		+++	+++		+++	+++		+	+		+++	+++
3		+	+		+++	+++		+	+		+++	+++
4		+++	+		+++	+		+	+		+++	+++
5		+	+		+	+		+	+		+	+
6		+++	+		+	+		+	+		+	+
7		+++	+		+++	+		+	+		+++	+++
8		+	+		+++	+		+	+			
9		+	+		+	+					+	+
10		+++	+		+++	+++					+	+
11		+	+		+	+	++			++		
12		+	+		+	+	++			++		
13		+	+		+	+		+	+	++		
14	++				+	+	++			++		
15		+	+		+	+	++			++		
16		+	+		+	+	++				+	+

LEGENDA:

NS - nekaljivo seme, P - protokormi, R - rizoidi, + - malo, ++ - srednje, +++ - veliko



Slika 3: Nekaljiva in kaljiva seme ter razvoj protokormov in rizoidov tri in štiri tedne po inokulaciji semen *Phalaenopsis* na gojišče

Tretji in četrti teden po inokulaciji semen na gojišča so se začeli množično pojavljati protokormi in rizoidi pri uspešnih kombinacijah križanj na ustreznih gojiščih. Razen pri kombinaciji križanja 14 na gojiščih A, 1/2 B in B, kjer je bilo srednje veliko nekaljivih semen in še ni bilo protokormov in rizoidov v tem obdobju. Prav tako pri kombinaciji križanja 15 na gojišču B pri obeh kombinacijah hranil ni bilo protokormov in rizoidov. Pri kombinaciji 16 protokormi in rizoidi niso nastali na gojišču B s polno koncentracijo hranil, podobno je bilo pri kombinaciji 8 na gojišču 1/2 B. Pri kombinaciji 9 in 10 na gojišču B nismo zasledili protokormov in rizoidov. Pri kombinacijah 11 in 12 ni bilo protokormov in rizoidov na gojišču B in 1/2 B ter pri kombinaciji 13 na gojišču 1/2 B. Bistveno več protokormov in rizoidov je bilo na gojiščih s polovično koncentracijo hranil, kar je dokaz, da je v gojiščih s polno koncentracijo prevelika količina makro- in mikrohranil, ki zavirajo tvorbo protokormov in rizoidov (preglednica 6, slika 3).

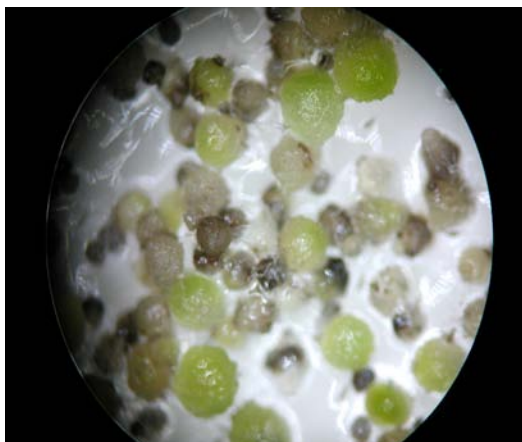
4.3.4 Pet in šest tednov po inokulaciji semen

Preglednica 7: Povečani protokormi in podaljšani rizoidi pet in šest tednov po inokulaciji semen *Phalaenopsis* na gojišče

Kombinacija križanja	Koncentracija in oznaka gojišča			
	A	1/2 A	B	1/2 B
1	skoraj vsa KS propadla	povečani P s podaljšanim R	večina KS propadla	povečani P s podaljšanimi R
2	nekaj KS propadlo, povečani P	povečani P s podaljšanimi R	nekaj P s podaljšanimi R	povečani P s podaljšanimi R
3	večina KS propadla, posamezni povečani P	povečani P s podaljšanimi R	redki povečani P s podaljšanimi R	povečani P s podaljšanimi R
4	povečani P s podaljšanimi R	podolgovati P z R	redki povečani P s podaljšanimi R	povečani P s podaljšanimi R (dobra rast)
5	povečani P s podaljšanimi R, nekaj KS propadlo	podolgovati P z R	redki povečani P, nekaj KS propadlo	povečani P s podaljšanimi R (dobra rast)
6	povečani P s podaljšanimi R	podolgovati P z R	KS propadajo, nič P	povečani P s podaljšanimi R (dobra rast)
7	povečani P s podaljšanimi R, nekaj KS propadlo	podolgovati P z R	KS propadajo, nekaj P	povečani P s podaljšanimi R (dobra rast)
8	povečani P s podaljšanimi R, nekaj KS propadlo	podolgovati P z R	redki povečani P	povečani P s podaljšanimi R (dobra rast)
9	povečani P s slabo razvitimi R	podolgovati P z R	1 nekoliko povečan P	3 povečani P
10	povečani P s podaljšanimi R	podolgovati P z R	redki povečani P	povečani P s podaljšanimi R
11	nekaj povečanih P s podaljšanimi R, različne velikosti P	podolgovati P z R	redki povečani P	povečani P s podaljšanimi R
12	slaba rast, redki P v začetni fazi	podolgovati P z R	redki P v začetni razvojni fazi	povečani P s slabo razvitimi R
13	slaba rast, redki P v začetni fazi	malo podolgovati P	1 P v začetni razvojni fazi	povečani P s podaljšanimi R
14	1 P v začetni fazi	malo podolgovati P in Č	samo nabrekla S	povečani P s podaljšanimi R
15	1 P v začetni fazi	različne razvojne faze P	samo nekaj nabreklih S	nekaj povečanih P s podaljšanimi R
16	3 P v začetni fazi	nekaj P v začetnih fazah	samo nabrekla S	nekaj povečanih P s podaljšanimi R

LEGENDA:

KS - kaljiva semena, P-protokormi, R-rizoidi, Č-črni propadli protokormi



Slika 4: Propadanje kaljivih semen in protokormov pet in šest tednov po inokulaciji semen *Phalaenopsis* na gojišče

Med petim in šestim tednom ni bilo bistvenih razlik v rasti in razvoju pri različnih kombinacijah križanja. Večje razlike so bile opazne na različnih gojiščih. Protokormi so se bistveno povečali na gojiščih A in B s polovičnima koncentracijama hranil, medtem ko je na gojiščih s polnima koncentracijama seme po nabrekanju - kalitvi skoraj popolnoma propadlo, razen posameznih protokormov, ki so bili v začetnih fazah rasti, brez podaljšanih rizoidov (slika 4). Na gojiščih, kjer so se protokormi povečali, so se podaljšali tudi rizoidi. To je bilo opazno na gojiščih 1/2 A pri kombinacijah od 1 do 12. Slabša rast in razvoj protokormov je bila na istem gojišču pri kombinacijah od 13 do 16, medtem ko so se pri kombinaciji križanja 14 pojavili tudi črni, propadli protokormi (slika 4). Napredek v rasti in razvoju je bil opazen tudi na gojišču 1/2 B pri kombinacijah od 1 do 8 in od 9 do 14. Nekoliko manj razviti protokormi so bili na istem gojišču pri kombinacijah 9, 15 in 16 (preglednica 7).

Slabši rezultati so bili pri zadnjih kombinacijah križanja od 9 do 16 na gojiščih A in B, kjer so protokormi in rizoidi v razvoju počasi napredovali. Na gojišču A se je pri kombinacijah 1, 2, 3, 7 in 8 pojavilo propadanje nabreklih - kaljivih semen. Propad kaljivih semen se je pojavil tudi na gojišču B pri kombinacijah 1, 5, 6, in 7. Redki nastali protokormi so bili večinoma v začetnih fazah. Največja razlika se je v teh dveh tednih pojavila v obliki protokormov. Na gojišču 1/2 A so bili podolgovati protokormi, medtem ko so bili na ostalih gojiščih okrogli. Gojišča s polovičnima koncentracijama hranil so bila primernejša za rast in razvoj orhidej (preglednica 7).

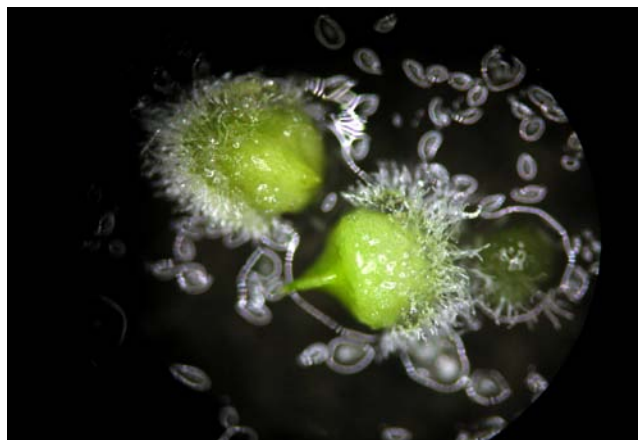
4.3.5 Sedem in osem tednov po inokulaciji semen

Preglednica 8: Protokormi z močno razvitimi rizoidi in pojav prvih listov sedem in osem tednov po inokulaciji semen *Phalaenopsis* na gojišče

Kombinacija križanja	Koncentracija in oznaka gojišča			
	A	1/2 A	B	1/2 B
1	KS začela propadati	pojav prvih L, povečani P, podaljšani R	ni sprememb od tretjega in četrtega tedna	pojav prvih L, povečani P, podaljšani R
2	1/2 KS propadlo, majhni P	pojav prvih L, povečani P, podaljšani R	nekaj povečanih P	pojav prvih L, povečani P, podaljšani R (dobra rast)
3	pojav Č, nekaj povečanih P	pojav prvih L, povečani P, podaljšani R	malo povečani P in podaljšani R	pojav prvih L, povečani P, podaljšani R (dobra rast)
4	KS propada, pojav Č	pojav prvih L, povečani P, podaljšani R	malo povečani P in podaljšani R	pojav prvih L, povečani P, podaljšani R (dobra rast)
5	KS propada, zastoj v razvoju	pojav Č, nekaj povečanih P	povečani P in podaljšani R	pojav prvih L, povečani P, podaljšani R (dobra rast)
6	KS propada, zastoj v razvoju	povečani P, podaljšani R	redki povečani P in podaljšani R	pojav prvih L, povečani P, podaljšani R (dobra rast)
7	KS propada, nekaj povečanih P	povečani P, podaljšani R	redki povečani P in podaljšani R	povečani P in podaljšani R
8	KS propada, nekaj povečanih P	pojav prvih L, povečani P, podaljšani R	samo 2 povečana P	pojav prvih L, povečani P, podaljšani R (dobra rast)
9	KS propada, nekaj povečanih P	povečani P, podaljšani R	samo nabreklo S	povečani P in podaljšani R
10	KS propada, nekaj povečanih P	povečani P, podaljšani R	redki P	povečani P in podaljšani R
11	KS propada, nekaj povečanih P	povečani P, podaljšani R	redki P	povečani P in podaljšani R
12	KS propada, nekaj povečanih P	pojav prvih L, povečani P, podaljšani R	samo nabreklo S	pojav prvih L, povečani P, podaljšani R (dobra rast)
13	redki povečani P	nekaj povečanih P	samo nabreklo S	povečani P in podaljšani R
14	samo nabreklo S	nekaj povečanih P	samo nabreklo S	redki povečani P
15	redki povečani P	nekaj povečanih P	samo nabreklo S	redki povečani P
16	redki P	nekaj povečanih P	samo 1 P	redki P

LEGENDA:

KS - kaljiva semena, P – protokormi, R – rizoidi, Č – črni, propadli protokormi, L - listi



Slika 5: Pojav prvih listov sedem in osem tednov po inokulaciji semen *Phalaenopsis* na gojišče

Sedem in osem tednov po inokulaciji semen je prišlo do velikih sprememb v rasti in razvoju. Protokormi so se bistveno povečali, nastali so številni, podaljšani rizoidi, pojavili so se tudi zametki za prve liste (preglednica 8, slika 4). Zelo velika razlika v fenofazah je bila tudi med gojišči. Protokormi so boljše uspevali na gojiščih 1/2 A in 1/2 B s polovično koncentracijo hranil. Očitno je, da so polna koncentracija hranil in dodani hormoni v gojiščih prevelik odmerek za ustrezno začetno rast in razvoj orhidej *Phalaenopsis*. Dokaz zato je postopno propadanje kaljivih semena in protokormov na gojiščih A s polno koncentracijo, ki je bilo pogostejše v tem obdobju kot en oz. dva tedna prej (preglednica 7, slika 4). Propad semen, predvsem protokormov se je začel z rumenenjem, začetek razpada klorofila, nato so postali rjavi oz. črni (preglednica 7 in 8, slika 4).

Najboljši rezultati so bili pri kombinacijah križanja od 2 do 6, 8 in 12 na gojišču 1/2 B. Večina protokormov se je povečala, zgoštili in podaljšali so se rizoidi in pojavili so se prvi listi. Opazna je bila dobra rast, kar se je odražalo na vitalnih, čvrstih protokormih z listi. Prav tako so se povečani protokormi, podaljšani rizoidi in zametki za liste začeli pojavljati na gojišču 1/2 A pri kombinacijah križanja od 1 do 4 in 8 ter 12, pri križanjih od 4 do 7 na istem gojišču ni bilo še vidnih zametkov za liste. Pri križanju 5 so se na gojišču 1/2 A pojavili črni, propadli protokormi. Le te smo zasledili tudi pri križanjih 3 in 4 na gojišču A. Pri križanjih od 9 do 16 so bili rezultati podobni. Na gojiščih A in 1/2 A ter B je bilo v tem obdobju največ nabreklih semen in zelo malo protokormov. Na gojišču 1/2 B so bili rezultati boljše, izstopala je kombinacija 12 (preglednica 7, slika 5).

4.3.6 Devet tednov po inokulaciji semen

Preglednica 9: Pojav drugih listov in prvih korenin devet tednov po inokulaciji semen *Phalaenopsis* na gojišče

Kombinacija križanja	Koncentracija in oznaka gojišča			
	A	1/2 A	B	1/2 A
1	propadlo KS	povečani P, pojav drugih L in prvih K	večina KS propadla	pojav drugih L in prvih K
2	povečani P z daljšimi R	povečani P z daljšimi R	povečani P	povečani P z daljšimi R
3	nekaj KS propadlo, povečani P	povečani P z daljšimi R	povečani P z daljšimi R	pojav drugih L in prvih K
4	povečani P z daljšimi R	povečani P z daljšimi R	povečani P	pojav drugih L in prvih K
5	povečani P z daljšimi R	pojav drugih L in prvih K	povečani P z daljšimi R	povečani P z daljšimi R
6	pojav drugih L in prvih K	pojav drugih L in prvih K	povečani P z daljšimi R	povečani P z daljšimi R
7	propadlo KS, nekaj povečanih P	pojav drugih L in prvih K	posamezni povečani P	pojav drugih L in prvih K
8	P v različnih fazah, tudi s podaljšanimi R	pojav drugih L in prvih K	posamezni povečani P	pojav drugih L in prvih K
9	povečani P z daljšimi R, nekaj Č	povečani P z daljšimi R in nekaj Č	1 P, ki propada	povečani P z daljšimi R
10	P v različnih fazah, tudi s podaljšanimi R	pojav drugih L in prvih K	1 P v začetni fazi	pojav drugih L in prvih K
11	propadlo KS, nekaj P v začetni fazi	povečani P z daljšimi R in nekaj Č	posamezni P z razvitimi R	pojav drugih L in prvih K
12	P v začetni fazi	povečani P z daljšimi R in nekaj Č	posamezni povečani P	posamezni P z R
13	P v začetni fazi, nekaj Č	povečani P z daljšimi R in nekaj Č	1 P v začetni fazi	pojav drugih L in prvih K
14	1 P v začetni fazi	P v različnih fazah, tudi s podaljšanimi R in Č	samo nabreklo S	povečani P s podaljšanimi R
15	posamezni povečani P	P v različnih fazah, tudi s podaljšanimi R in Č	posamezni P v začetni fazi	povečani P s podaljšanimi R
16	posamezni povečani P	P v različnih fazah, tudi s podaljšanimi R in Č	posamezni P v začetni fazi	posamezni P v začetni fazi

LEGENDA:

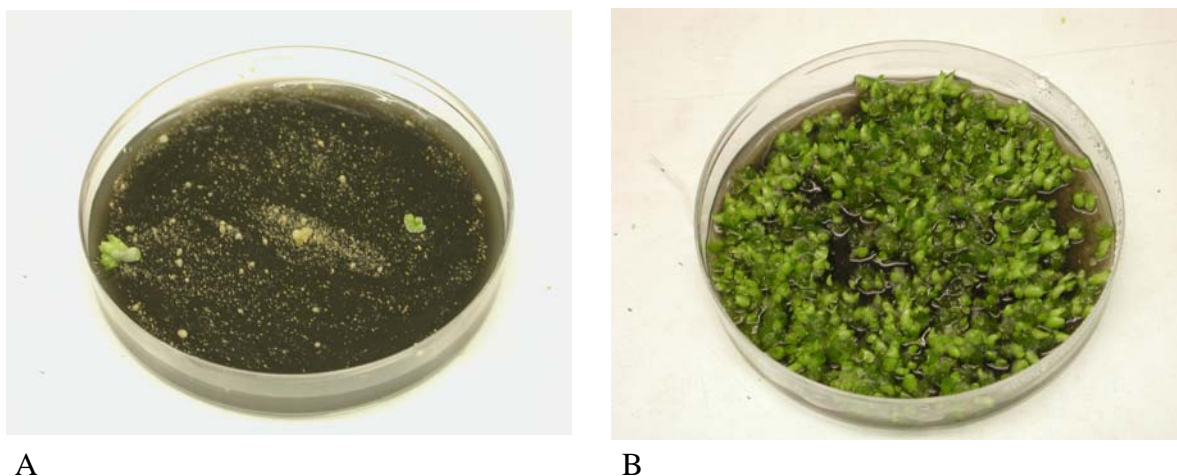
KS - kaljivo seme, L - listi, K - korenine, Č - črni, propadli protokormi, P - protokormi, R - rizoidi



Slika 6: Pojav drugih listov devet tednov po inokulaciji semen *Phalaenopsis* na gojišče

Devet tednov po inokulaciji semen na gojišče so rezultati zelo podobni sedmemu in osmemu tednu, le da so protokormi napredovale v razvoju. Na gojišču 1/2 A so se pri kombinacijah križanja 1, 5, 6, 7, 8 in 10 pojavili drugi listi in prve korenine. Prav tako so se drugi listi in prve korenine pojavile na gojišču 1/2 B pri kombinacijah 1, 3, 4, 7, 8, 10, 11 in 13 (preglednica 9, slika 6 in 7B). Na polnih koncentracijah gojišč A in B je veliko kaljivih semen propadlo, nastalo je le nekaj protokormov, ki so se počasi razvijali (preglednica 9, slika 7A).

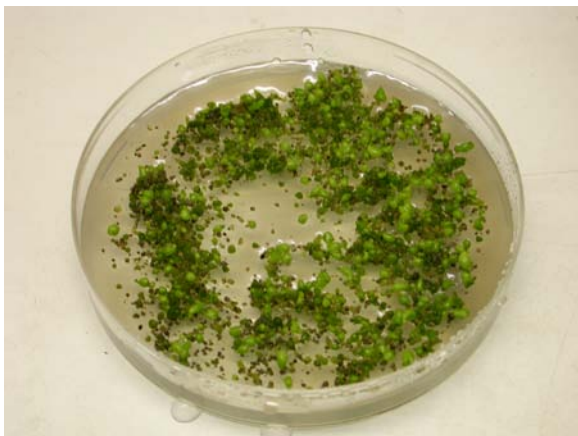
Pojavljali so se tudi rumeni, rjavi in končno črni, propadli protokormi pri kombinaciji 9 na gojišču A in pri kombinacijah 9, 11, 12, 13, 14, 15 in 16 na gojišču 1/2 A (slika 7A). Pri kombinacijah križanja od 9 do 16 so bili rezultati povprečni. Protokormi so se zelo počasi razvijali in rast je bila slaba (preglednica 9).



Slika 7: Propadanje in razvoj na gojišču B z različno koncentracijo hranil devet tednov po inokulaciji semen *Phalaenopsis*: A - propadanje kaljivih semen in protokormov na gojišču B; B - podaljšani listi in pojav korenin na gojišču 1/2 B

4.3.7 Dvanajst tednov po inokulaciji semen

Dvanajst tednov po inokulaciji semen ni bilo bistvenih razlik od devetih tednov. Na gojiščih 1/2 A in 1/2 B so se dokončno izoblikovali listi in korenine (slika 8B in D). Drugi list se je pojavil na gojišču 1/2 B pri kombinacijah 3, 7 in 11. Na gojiščih A in B je bil razvoj zavrt že v prvih fazah rasti, zaradi prevelikih odmerkov makro- in mikrohranil (slika 8A in C). Najslabši rezultati so bili na gojišču A zaradi propadanja semen pri kombinacijah 1, 3, 7, 11 in 13. Propadanje semen je bilo vidno tudi na gojišču B pri kombinacijah 1 in 9. Pri kombinacijah križanj 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 in 16 je bila rast slaba že od začetka kalitve na vseh gojiščih. Na gojišču 1/2 A so se pojavljali podolgovati protokormi (slika 8B).



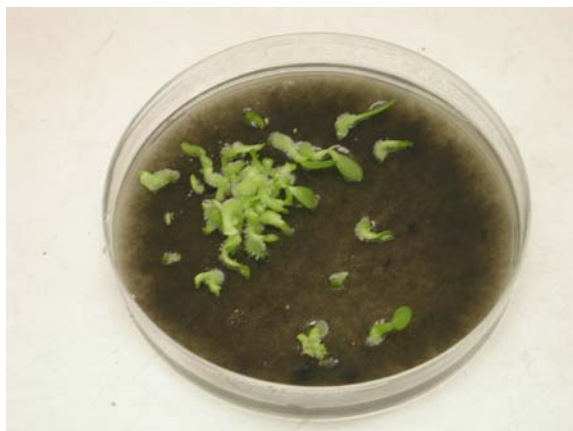
A



B



C



D

Slika 8: Razvoj in propadanje protokormov dvanajst tednov po inokulaciji semen *Phalaenopsis*: A - propadanje kaljivih semen in protokormov ter razvoj protokormov v začetnih fazah na gojišču A; B - podolgovati protokormi z listi na gojišču 1/2 A; C - propadanje kaljivih semen in protokormov v začetnih fazah na gojišču B; D - razvoj listov in korenin na gojišču 1/2 B

4.3.8 Šestnajst tednov po inokulaciji semen

Preglednica 10: Število kaljivih, nekaljivih in propadlih semen ter vitalnih in propadlih protokormov na cm² šestnajst tednov po inokulaciji semen *Phalaenopsis* na gojišču

KK	Koncentracija in oznaka gojišča																			
	A					1/2 A					B					1/2 B				
	S			P		S			P		S			P		S			P	
	KS	NS	PS	VP	PP	KS	NS	PS	VP	PP	KS	NS	PS	VP	PP	KS	NS	PS	VP	PP
1	66				66	55			55		6	15	12	6		20	9		20	
2	7		9	7		45			45		8	229		8	43				43	
3	9	22		9		77			77		10	115		4	6	9			9	
4	15			15		15	15		15			110	10			24			24	
5	25	15		8	17	29			29			35			10	26			10	
6	19	12		10	9	30	7		28	2	1	77		1		13			13	
7	29			29		12			12		25	101		25		23				
8	5	30		3	2	4	57		4		2	195		2	2	144			2	
9	2	50		1	1	7	7		7			22			1				1	
10	16	12		4	12	4			4		1	221		1	5				5	
11	9	2		8	1	20			19	1		195			4	83			4	
12	2	41			2	5	8		5		1	34		1	2	67			2	
13		52				4	72		4			213			1	51			1	
14		192					66					131			2	152			1	1
15	6	164		6			207					77			2				1	1
16		204				1	109		1		1	86		1		55				

LEGENDA:

KK - kombinacija križanja

S - seme

P – protokormi

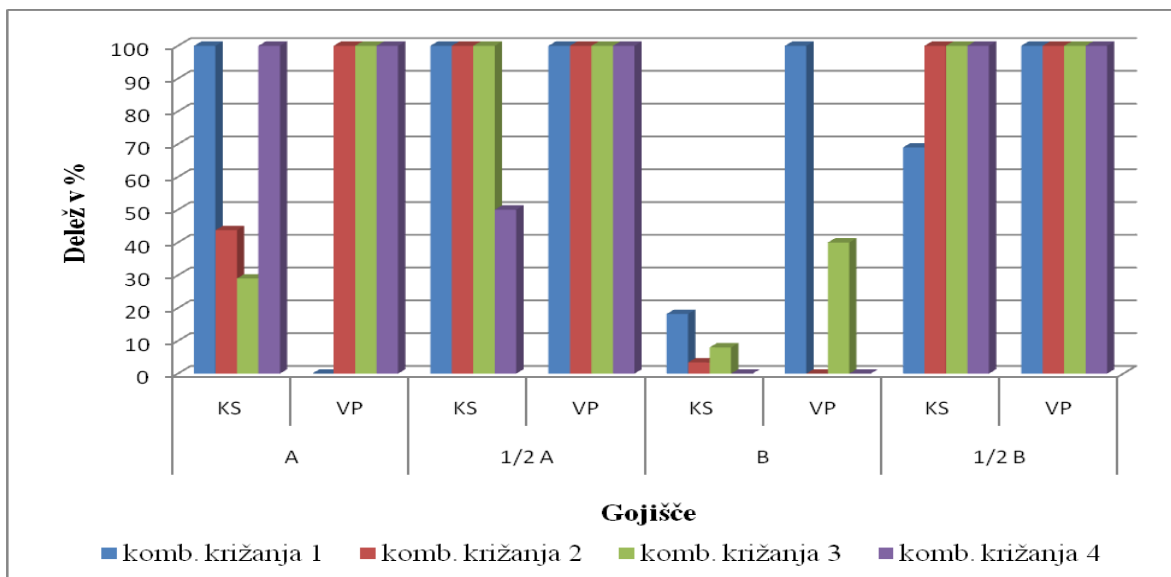
KS - kaljivo seme

NS - nekaljivo seme

PS - propadlo seme po kalitvi

VP - vitalni protokormi

PP - propadli protokormi



Slika 9: Delež kaljivih semen (KS) in vitalnih protokormov (VP) na cm² pri križanju od 1 do 4 šestnajst tednov po inokulaciji semen *Phalaenopsis* na gojišče

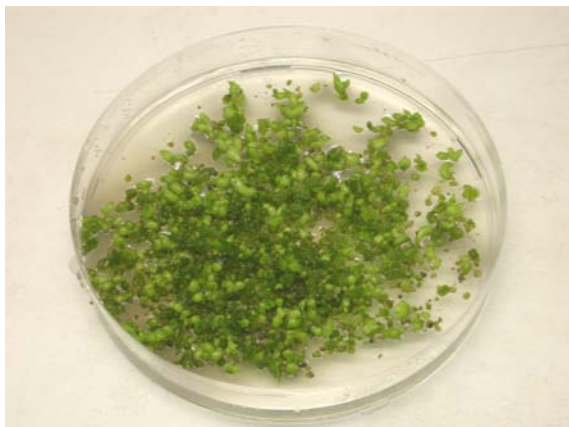
Pri kombinaciji križanja 1 so na gojišču A vsa semena kalila, vendar so v naslednjih fazah razvoja protokormi propadli. Na gojišču 1/2 A so prav tako vsa semena kalila in se za razliko od gojišča A razvila v vitalne protokorme. Na gojišču B je samo 18,2% semen kalilo, 45,4% je bilo nekaljivih in 36,4% semen je po nabrekanju oz. kalitvi propadlo. Na gojišču 1/2 B je kalilo 69% semen in vsa so se razvila v vitalne protokorme, medtem ko je bilo 31% nekaljivih semen (preglednica 10 in 11, slika 9).

Pri kombinaciji križanja 2 je na gojišču A 43,7% semen kalilo in se razvila v vitalne protokorme, nekaljivih semen ni bilo in 56,3% kaljivih semen je propadlo. Na gojišču 1/2 A so vsa semena kalila in se nato razvila v vitalne protokorme. Na gojišču B je samo 3,4% semen kalilo in se razvila v protokorme, ki so propadli, kar 96,6% semen je bilo nekaljivih, propadlih semen po kalitvi ni bilo. Gojišče 1/2 B se je prav tako kot gojišče 1/2 A izkazalo za zelo uspešno, saj so vsa semena kalila in se razvila v vitalne protokorme (preglednica 10 in 11, slika 9).

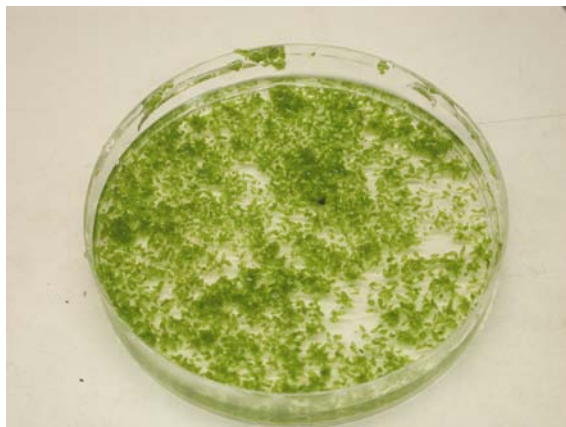
Pri kombinaciji križanja 3 je na gojišču A 29% semen kalilo in se razvila v vitalne protokorme, kar 71% semen je bilo nekaljivih. Vsa semena na gojiščih 1/2 A in 1/2 B so kalila in se razvila v vitalne protokorme. Na gojišču B je 8% semen kalilo in 40% se je razvila v vitalne protokorme in 60% protokormov je propadlo, kar 92% semen ni kalilo (preglednica 10 in 11, slika 9 in 10A, B, C, D).

Pri kombinaciji križanja 4 so na gojišču A, 1/2 A in 1/2 B in vsa semena kalila in se razvila v vitalne protokorme. Na gojiščih A in 1/2 B ni bilo nekaljivih in propadlih semen, medtem ko je bilo kar 50% nekaljivih semen na gojišču 1/2 A. Na gojišču B ni bilo kaljivih semen, kar

91,7% semen je bilo nekaljivih in 8,3% semen je po kalitvi propadlo (preglednica 10 in 11, slika 9).



A



B

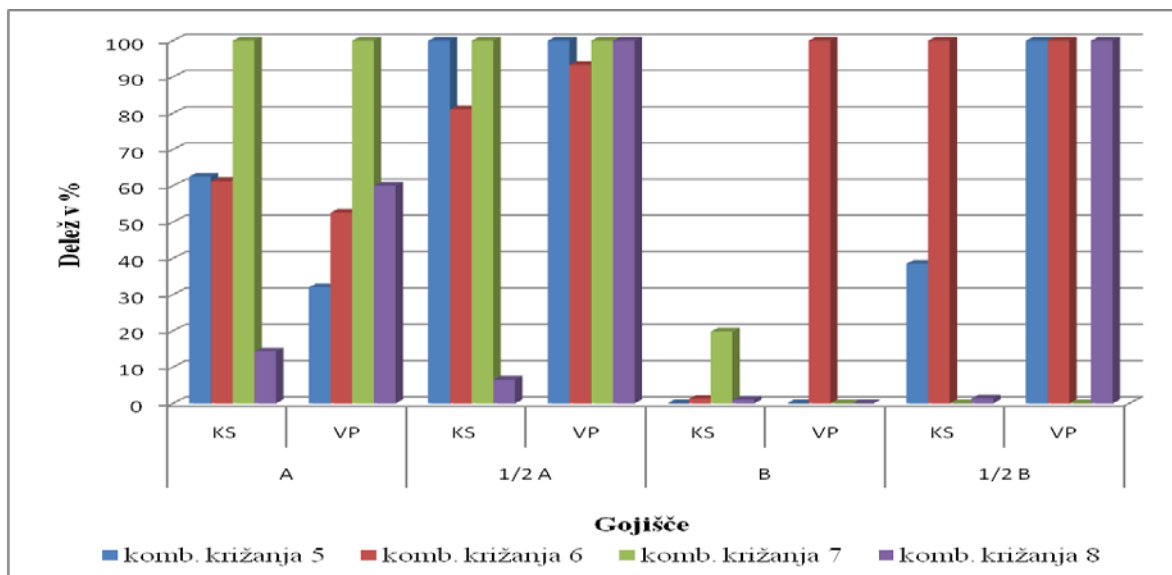


C



D

Slika 10: Kombinacija križanja 3 šestnajst tednov po inokulaciji semen: A - propadanje nabreklih semen in razvoj protokormov na gojišču A; B - podolgovati protokormi na gojišču 1/2 A; C - propadanje nabreklih semen in protokormov ter razvoj vitalnih protokormov na gojišču B; in D - protokormi s prvimi in drugimi listi ter koreninami na gojišču 1/2 B



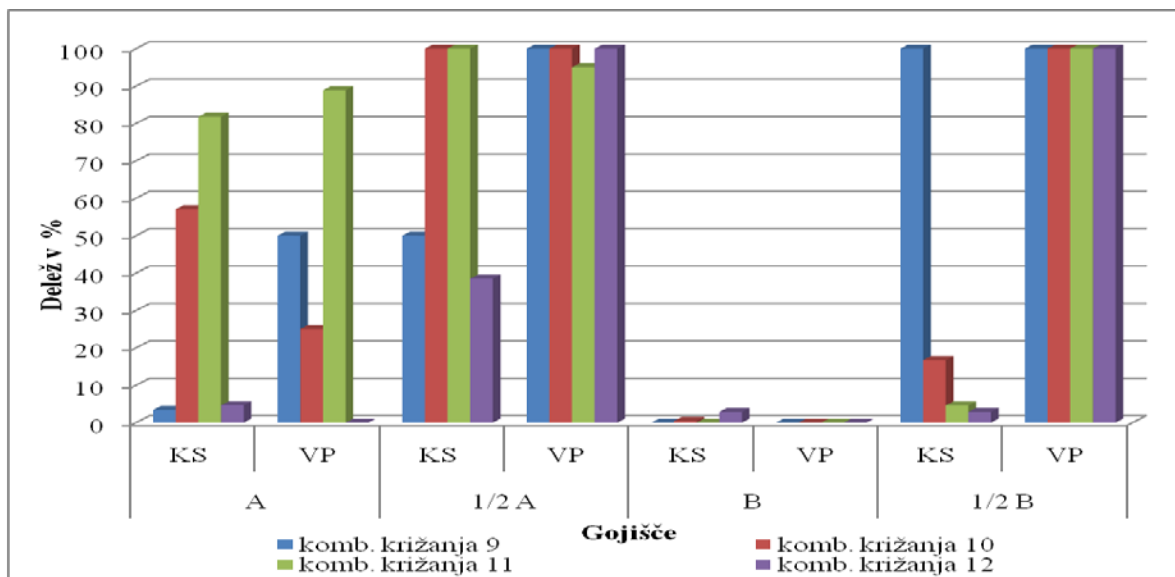
Slika 11: Delež kaljivih semen (KS) in vitalnih protokormov (VP) na cm² pri križanju od 5 do 8 šestnajst tednov po inokulaciji semen *Phalaenopsis* na gojišče

Pri kombinaciji križanja 5 je na gojišču A 62,5% semen kalilo in nastalo je 32% vitalnih protokormov, ostali so propadli. Na gojišču 1/2 A so vsa semena kalila in iz njih so se razvili vitalni protokormi. Na gojišču B semena niso kalila. Na gojišču 1/2 B je bilo 38,5% kaljivih in iz njih so nastali vitalni protokormi (preglednica 10 in 11, slika 11).

Pri kombinaciji križanja 6 je na gojišču A 61,3% semen kalilo in 52,6% se je razvilo v vitalne protokorme in 47,4% protokormov je propadlo. Na gojišču 1/2 A je kar 81,1% semen kalilo in 93,3% se jih je razvilo v vitalne protokorme. Na gojišču B je samo eno seme kalilo iz katerega je nastal vitalen protokorm, kar 98,7% semen je bilo nekaljivih. Na gojišču 1/2 B so vsa semena kalila in se razvila v vitalne protokorme (preglednica 10 in 11, slika 11).

Pri kombinaciji križanja 7 so na gojiščih A in 1/2 A vsa semena kalila in se razvila v vitalne protokorme. Na gojišču B je bilo kaljivih samo 19,8% semen iz njih so nastali protokormi, ki so propadli. Na gojišču 1/2 B so bila vsa semena nekaljiva (preglednica 10 in 11, slika 11).

Pri kombinaciji križanja 8 je na gojišču A samo 14,3% semen kalilo in 60% se jih razvilo v vitalne protokorme, ostali so propadli. Na gojišču 1/2 A je bilo kaljivih samo 6,5% semen iz katerih so se razvili vitalni protokormi. Na gojišču B in 1/2 B sta samo po 2 semeni kalili in na gojišču 1/2 B sta nastala 2 vitalna protokorma (preglednica 10 in 11, slika 11).



Slika 12: Delež kaljivih semen (KS) in vitalnih protokormov (VP) na cm² pri križanju od 9 do 12 šestnajst tednov po inokulaciji semen *Phalaenopsis* na gojišče

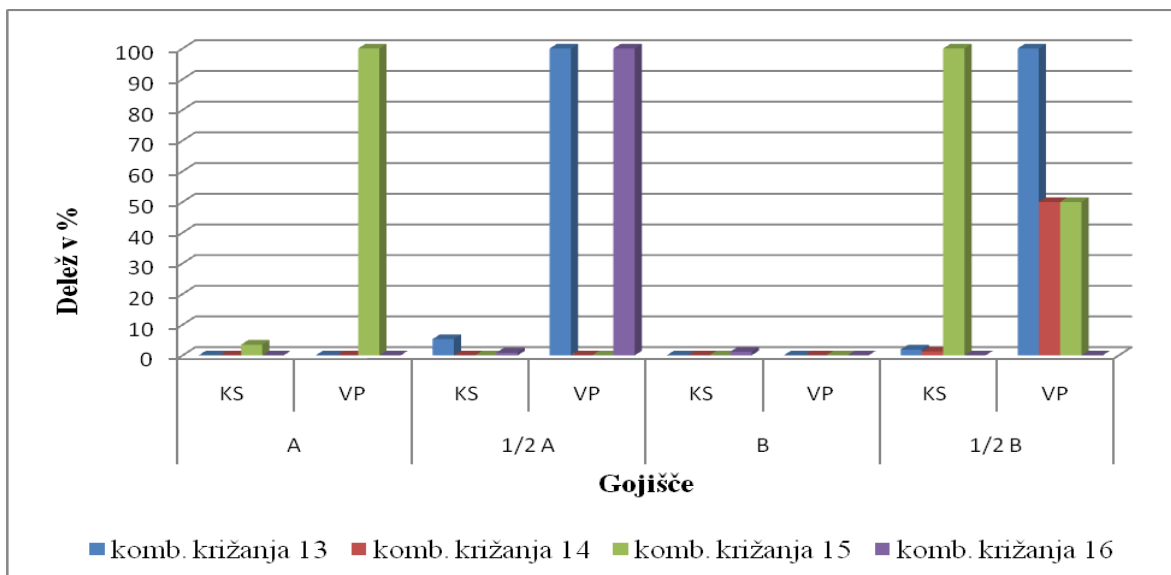
Pri kombinaciji križanja 9 sta bili na gojišču A v vidnem polju 1 cm² samo 2 oz. 3,4% semen kaljivih in samo 1 seme se je razvilo v vitalni protokorm, kar 50 semen oz. 96,6% je bilo nekaljivih. Propadlih semen po kalitvi oz. nabrekanju ni bilo. Na gojišču 1/2 A je bilo kaljivih 50% semen in vsa so se razvila v vitalne protokorme. Na gojišču B nobeno seme ni kalilo, na gojišču 1/2 B je bilo samo eno kaljivo seme, ki se je razvilo v vitalni protokorm, nekaljivih in propadlih semen ni bilo (preglednica 10 in 11, slika 12).

Pri kombinaciji križanja 10 je bilo na gojišču A 57,1% kaljivih semen iz teh se je samo 25% razvilo v vitalne protokorme in kar 75% protokormov je v naslednjih fazah razvoja propadlo ter 42,9% semen je bilo nekaljivih. Na gojišču 1/2 A so vsa 4 semena kalila in se razvila v vitalne protokorme. Na gojišču B je bilo kar 99,5% semen nekaljivih in na gojišču 1/2 B je bilo 16,7% semen kaljivih in vsa so se razvila v vitalne protokorme (preglednica 10 in 11, slika 12).

Pri kombinaciji križanja 11 je bilo 81,8% kaljivih seme in kar 88,9% se je razvilo v vitalne protokorme. Na gojišču 1/2 A so vsa semena kalila in kar 95% se jih je razvilo v vitalne protokorme. Na gojišču B ni bilo kaljivih semen, vseh 195 je bilo nekaljivih. Na gojišču 1/2 B je samo 4,6% semen kalilo in vsa so se razvila v vitalne protokorme (preglednica 10 in 11, slika 12).

Pri kombinaciji križanja 12 je bilo na gojišču A nekaljivih kar 95,3% semen, samo 4,7% semen je kalilo in se razvilo v protokorme, ki so propadli. Na gojišču 1/2 A je bilo 38,5% kaljivih semen in vsa so se razvila v vitalne protokorme in 61,5% je bilo nekaljivih. Na gojišču B je samo 2,9% semen kalilo in vsi protokormi so propadli, kar 97,1% semen ni kalilo. Na

gojišču 1/2 B sta kalili samo dve semeni in kar 100% se jih je razvilo v vitalne protokorme (preglednica 10 in 11, slika 12).



Slika 13: Delež kaljivih semen (KS) in vitalnih protokormov (VP) na cm^2 pri križanju od 13 do 16 šestnajst tednov po inokulaciji semen *Phalaenopsis* na gojišče

Pri kombinaciji križanja 13 na gojišču A in B nobeno seme ni kalilo. Na gojišču 1/2 A je bilo 5,3% kaljivih semen in vsa so se razvila v vitalne protokorme, kar 94,7 % semen je bilo nekaljivih. Na gojišču 1/2 B je od 52 semen kalilo samo 1 in to se je razvilo v vitalen protokorm, vseh ostalih 98,1% semen je bilo nekaljivih (preglednica 10 in 11, slika 13).

Pri kombinaciji križanja 14 na gojiščih A, 1/2 A in B semena niso kalila in tudi na gojišču 1/2 B je kar 98,7% semen bilo nekaljivih (preglednica 10 in 11, slika 13).

Pri kombinaciji križanja 15 je bilo na gojišču A 3,4% kaljivih semen in vsa so se razvila v vitalne protokorme. Na gojiščih 1/2 A in B semena niso kalila, vsa so bila nekaljiva. Na gojišču 1/2 B sta v vidnem polju 1 cm^2 bili samo 2 semeni. Obe sta kalili, iz enega je nastal vitalen protokorm, nekaljivih in propadlih semen ni bilo (preglednica 10 in 11, slika 13).

Pri kombinaciji križanja 16 na gojiščih A in 1/2 B semena niso kalila, vsa so bila nekaljiva. Prav tako je bil odstotek nekaljivih semen na ostalih dveh gojiščih zelo visok, na gojišču 1/2 A kar 99,1% in na gojišču B 98,8% (preglednica 10 in 11, slika 13).

Preglednica 11: Delež nekaljivih in propadlih semen ter propadlih protokormov na cm² šestnajst tednov po inokulaciji semen *Phalaenopsis* na gojišče

Oznaka križanja	Koncentracija in oznaka gojišča											
	A			1/2 A			B			1/2 B		
	S	P	PP	S	P	PP	S	P	PP	S	P	PP
	NS	PS	PP	NS	PS	PP	NS	PS	PP	NS	PS	PP
1	0	0	100	0	0	0	45,4	36,4	100	31,0	0	0
2	0	56,3	0	0	0	0	96,6	0	100	0	0	0
3	71,0	0	0	0	0	0	92,0	0	60,0	0	0	0
4	0	0	0	50,0	0	0	91,7	100	0	0	0	0
5	37,5	0	68,0	0	0	0	100	0	0	72,2	0	0
6	38,7	0	47,4	18,9	0	6,7	98,7	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	80,2	0	100	100	0	0
8	85,7	0	40,0	93,4	0	0	98,0	0	100	98,6	0	0
9	96,2	0	50,0	50,0	0	0	100	0	0	0	0	0
10	42,9	0	75,0	0	0	0	99,5	0	100	0	0	0
11	18,2	0	11,1	0	0	5,0	100	0	0	95,4	0	0
12	95,4	0	100	61,5	0	0	97,1	0	100	100	0	0
13	100	0	100	94,7	0	0	100	0	0	98,1	0	0
14	100	0	100	100	0	0	100	0	0	98,7	0	50,0
15	96,5	0	0	100	0	0	100	0	0	0	0	50,0
16	100	0	100	99,1	0	0	98,8	0	100	100	0	0

LEGENDA:

NS - nekaljivo seme, PS – propadlo seme, PP – propadli protokormi

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V poskus asimbiotske kalitve so bila vključena semena orhideje *Phalaenopsis*, ki so nastala po navzkrižnem in recipročnem križanju 8 rastlin, ki so se razlikovale po barvi cvetov, številu cvetnih stebel in cvetov.

5.1.1 Navzkrižno in recipročno križanje

Uspešnih je bilo 16 kombinacij križanj. Od teh je bilo 11 kombinacij navzkrižnega opravevanja in 5 kombinacij recipročnega. Od 8 vključenih rastlin v križanja jih je bilo 7, razen rastline z oznako 5, uspešnih kot materina rastlina in vseh 8 kot očetova rastlina. Vse kombinacije križanja, kjer je bila rastlina 5 izbrana kot materina rastlina so propadle oz. niso tvorila funkcionalna semena. Na 8 rastlinah, ki so bile vključene v križanja je nastalo 82 cvetov od teh je bilo samo 53 oz. 64,6% opravevanih. Vse cvetove ene rastline nismo opravevali, da ne bi preveč obremenili rastlin. Čim več cvetnih stebel oz. cvetov je imela rastlina tem manj cvetov smo opravevali. Od skupno 36 oz. 68% oplojenih cvetov, ki so oblikovali glavice jih je 16 oz. 44,5% tvorilo semena s kalčki. Ostalih 20 oz. 55,5% glavice je bilo praznih, brez semen oz. semena niso vsebovala kalček. Po opravevanju je 17 oz. 32% cvetov propadlo, se posušilo oz. predčasno odpadlo z rastlin. Ti cvetovi se niso uspešno oplodili, kar je lahko posledica inkompatibilnosti oz. neuspešno izbrane kombinacije križanja (preglednica 3 in 4).

5.1.2 Sterilizacija semen in pridobitev aseptične kulture

Izbrana koncentracija in sterilizacijsko sredstvo dikloroizocianurna kislina ter čas sterilizacije so uspešno vplivali na sterilizacijo semen. 1,6% dikloroizocianurna kislina in 10 minutna sterilizacija sta bili zelo učinkoviti. K učinkoviti sterilizaciji je pripomogla tudi uporaba centrifuge. S centrifugiranjem je bila uspešno nevtralizirana površinska napetost semen, kar je dodatno omogočilo dostop sterilizacijski tekočini do semen in vplivalo na uspeh sterilizacije. Metoda centrifugiranja omogoča tudi preprostejše odstranjevanje sterilizacijske tekočine z mikropipeto, saj so se semena zbrala na dnu mikrocentrifugirke. O podobnem učinku centrifugiranja na sterilizacijo in kalitev navajata Jevšnik (2002) in Zupan (2004). S tem postopkom je bila dosežena 91% aseptična kultura, ki je bila ohranjena do konca poskusa.

Glivična okužba, ki se je pojavila v prvem tednu je bila verjetno posledica neučinkovite sterilizacije in nenatančnega sterilnega dela, v ostalih primerih se je okužba pojavila zaradi strganega parafilma, s katerim so bile oblepljene petrijevke. V komori so nesterilne razmere in skozi odprtine na gojišče lahko prihaja okužen zrak, ki ga ventilator neprestano meša, ko so luči prižgane.

5.1.3 Vpliv gojišča in kombinacije križanj na kalitev, rast in razvoj

Gojišči A in B s polno koncentracijo hranil ter gojišči 1/2 A in 1/2 B s polovično koncentracijo hranil so se razlikovala v sestavi in koncentraciji hranil ter hormonov. Gojišče A je vsebovalo hormona α -naftalen očetno kislino 0,5 mg/l in 6-benzil aminopurin 2 mg/l, medtem ko je gojišče B vsebovalo bananin prašek in oglje ter večje koncentracije vitaminov (preglednica 2).

En teden po inokulaciji so semena oz. kalčki nabrekli, bistvenih razlik med gojišči in kombinacijami križanj ni bilo. Nekoliko bolj nabrekla oz. večja so bila semena na gojišču B s polno koncentracijo hranil. K hitremu nabrekanju in kalitvi je pripomoglo 1 urno namakanje semen v sterilni vodi pri sobni temperaturi pred inokulacijo na gojišča. O ugodnem vplivu kratkotrajnega namakanja do 1 ure na kalitev poroča Zupan (2004).

Dva tedna po inokulaciji so se pojavili zeleni protokormi in tudi posamezni rizoidi.

Tri in štiri tedne po inokulaciji so se v kalitvi in razvoju med kombinacijami križanj in gojišči začele pojavljati razlike. Pri uspešnih kombinacijah križanj na ustreznih gojiščih so se množično pojavljali protokormi z rizoidi. Teh je bilo več na gojiščih s polovično koncentracijo hranil, kar je dokaz, da je v gojiščih s polno koncentracijo prevelika količina makro- in mikrohranil, ki zavirajo tvorbo protokormov in rizoidov (preglednica 6, slika 3).

Pet in šest tednov po inokulaciji so začela kaljiva semena in protokormi neustreznih kombinacij križanj predvsem na gojiščih A in B propadati. Na gojiščih, kjer so se protokormi povečali, so se podaljšali tudi rizoidi. To je bilo opazno na gojiščih 1/2 A pri kombinacijah od 1 do 12. Slabša rast in razvoj protokormov je bila na istem gojišču pri kombinacijah od 13 do 16, medtem ko so se pri kombinaciji križanja 14 pojavili tudi črni, propadli protokormi (slika 4). Napredek v rasti in razvoju je bil opazen tudi na gojišču 1/2 B pri kombinacijah od 1 do 8 in od 9 do 14. Nekoliko manj razviti protokormi so bili na istem gojišču pri kombinacijah 9, 15 in 16 (preglednica 7). Slabši rezultati so bili pri zadnjih kombinacijah križanja od 9 do 16 na gojiščih A in B, kjer so protokormi in rizoidi v razvoju počasi napredovali. Na gojišču A se je pri kombinacijah 1, 2, 3, 7 in 8 pojavilo propadanje nabreklih - kaljivih semen. Propad kaljivih semen se je pojavil tudi na gojišču B pri kombinacijah 1, 5, 6, in 7. Vzrok za slabo rast v tem obdobju je bil verjetno v neustreznem križanju dveh orhidej - izboru starševskih rastlin, ki sta bili vključeni v križanje in previsoki koncentraciji hranil v gojiščih A in B. Redki nastali protokormi so bili večinoma v začetnih fazah. Največja razlika se je v teh dveh tednih pojavila v obliki protokormov. Na gojišču 1/2 A so bili podolgovati protokormi, medtem ko so bili na ostalih gojiščih okrogli. Gojišča s polovičnima koncentracijama hranil so bila primernejša za rast in razvoj orhidej (preglednica 7).

V sedmem in osmem tednu so se razvili prvi listi predvsem na gojiščih 1/2 A in 1/2 B. Protokormi so se bistveno povečali, nastali so številni, podaljšani rizoidi. Zelo velika razlika v fenofazah je bila tudi med gojišči. Protokormi so boljše uspevali na gojiščih 1/2 A in 1/2 B s polovično koncentracijo hranil. Očitno je, da so polna koncentracija hranil in dodani hormoni

v gojiščih prevelik odmerki za ustrezno začetno rast in razvoj orhidej *Phalaenopsis*. Dokaz zato je postopno propadanje kaljivih semen in protokormov na gojiščih A s polno koncentracijo, ki je bilo pogostejše v tem obdobju kot en oz. dva tedna prej (preglednica 7, slika 4). Propad semen, predvsem protokormov se je začel z rumenenjem, začetek razpada klorofila, nato so postali rjavi oz. črni (preglednica 7 in 8, slika 4). Posledica slabe rasti in razvoja nekaterih kombinacij križanj na gojiščih, kjer so druga dobro uspevala je verjetno posledica neustrezne kombinacije križanja dveh orhidej.

Deveti teden so se pojavili drugi listi in prve korenine in rezultati so bili zelo podobni sedmemu in osmemu tednu, le da so protokormi napredovale v razvoju. Na gojišču 1/2 A so se pri kombinacijah križanja 1, 5, 6, 7, 8 in 10 pojavili drugi listi in prve korenine. Prav tako so se drugi listi in prve korenine pojavile na gojišču 1/2 B pri kombinacijah 1, 3, 4, 7, 8, 10, 11 in 13 (preglednica 9, slika 6 in 7B). Na polnih koncentracijah gojišč A in B je veliko kaljivih semen propadlo, nastalo je le nekaj protokormov, ki so se počasi razvijali (preglednica 9, slika 7A).

Pojavljali so se tudi rumeni, rjavi in končno črni, propadli protokormi pri kombinaciji 9 na gojišču A in pri kombinacijah 9, 11, 12, 13, 14, 15 in 16 na gojišču 1/2 A (slika 7A). Pri kombinacijah križanja od 9 do 16 so bili rezultati povprečni. Protokormi so se zelo počasi razvijali in rast je bila slaba (preglednica 9). Očitno je, da ima na rast in razvoj razen gojišča vpliv tudi izbor navzkrižnega križanja dveh orhidej. Iz teh rezultatov je razvidno, da sta gojišče in kombinacija križanja v našem primeru bistvena dejavnika za uspešno rast orhidej rodu *Phalaenopsis*.

Najboljše, kar 100% so kalila in se 100% razvila v vitalne protokorme semena križanj 1, 2, 3, 5, 7 in 10 na gojišču 1/2 A in križanj 2, 3, 4, 6 in 9 na gojišču 1/2 B ter samo dveh kombinacij 4 in 7 na gojišču A. Na gojišču B semena nobene od kombinacij križanj niso 100% kalila in se razvila v vitalne protokorme. Semena nekaterih kombinacij križanj so srednje do slabo kalila na izbranih gojiščih, a so se 100% razvila v vitalne protokorme. Tako je bilo pri križanju 2, 3 in 15 na gojišču A, pri križanju 8, 9, 10, 12, 13 in 16 na gojišču 1/2 A in samo pri dveh kombinacijah 1 in 6 na gojišču B ter pri petih križanjih 5, 8, 10, 11 in 13 na gojišču 1/2 B.

5.2 SKLEPI

Po ročnem oprraševanju cvetov 8 orhidej *Phalaenopsis* so se pri 44,5% kombinacij razvile glavice s semeni, ki so vsebovala kalček.

Izbira primerno sestavljenega gojišča, postopek sterilizacije in kratkotrajno namakanje semen do 1 ure so ugodno vplivali na kaljivost in razvoj semen.

Sterilizacija semen 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 je bil zanesljiv način sterilizacije, saj smo dobili 91% aseptično kulturo.

Dikloroizocianurna kislina je 100% uničila bakterijsko okužbo, saj se je po sterilizaciji semen pojavila samo glivična okužba.

Kaljivost ter nadaljnja rast in razvoj orhidej rodu *Phalaenopsis* so bili najboljši na gojiščih 1/2 A in 1/2 B s polovičnima koncentracijama hranil.

Teden po inokulaciji so semena oz. kalčki nabrekli, bistvenih razlik med gojišči in kombinacijami križanj v tem obdobju ni bilo. Nekoliko bolj nabrekla oz. večja so bila semena na gojišču B s polno koncentracijo hranil.

Dva tedna po inokulaciji so se pojavili zeleni protokormi in tudi posamezni rizoidi.

Tri in štiri tedne po inokulaciji so se v kalitvi in razvoju med kombinacijami križanj in gojišči začele pojavljati razlike.

Pet in šest tednov po inokulaciji so začela kaljiva semena in protokormi neustreznih kombinacij križanj predvsem na gojiščih A in B propadati.

V sedmem in osmem tednu so se razvili prvi listi predvsem na gojiščih 1/2 A in 1/2 B.

Deveti teden so se pojavili drugi listi in prve korenine.

100% so kalila in se 100% razvila v vitalne protokorme semena križanj 1, 2, 3, 5, 7 in 10 na gojišču 1/2 A in križanj 2, 3, 4, 6 in 9 na gojišču 1/2 B ter samo dveh križanj 4 in 7 na gojišču A. Na gojišču B semena nobene od kombinacij križanj niso 100% kalila in se razvila v vitalne protokorme.

Semena nekaterih križanj so srednje do slabo kalila na izbranih gojiščih, a so se 100% razvila v vitalne protokorme in to pri križanjih 2, 3 in 15 na gojišču A, pri križanjih 8, 9, 10, 12, 13 in 16 na gojišču 1/2 A in samo pri dveh kombinacijah 1 in 6 na gojišču B ter pri petih križanjih 5, 8, 10, 11 in 13 na gojišču 1/2 B.

Gojišči 1/2 A in 1/2 B sta zaradi velikega odstotka kaljivih semen in nastalih vitalnih protokormov primerni tako za kalitev, kot tudi za rast in razvoj orhidej po križanjih z zelo malo vitalnimi semeni.

6 POVZETEK

Orhideje rodu *Phalaenopsis* imajo veliko komercialno vrednost in prilagodljivost na bivalne prostore, zato se zelo pogosto pojavljajo v žlahtniteljskih procesih. Spadajo v družino kukavičevk (*Orchidaceae*) in poddružino (*Orchidoideae*). Izhajajo iz daljnega vzhoda, še posebej močno so zastopane na območjih od Indije, Indonezije, severne Avstralije do Filipinov. Imajo monopodialno rast s kratkimi stebli in brez pseudobulbilov. Rastejo na obrobjih gozdov, na vejah, deblih in kamnih.

Orhideje v glavici razvijejo do milijon majhnih semen, vendar vsa semena pogosto ne vsebujejo dozorelega embrija. Kljub temu lahko iz semen vzgojimo veliko cvetočih rastlin le, da preteče nekaj let preden rastlina prvič zacveti. S tkivno kulturo lahko ta čas bistveno skrajšamo. Rastline vzgojene iz semen, ki pripadajo isti vrsti se genotipsko razlikujejo med seboj, ker je večina orhidej tujeprašnih. Načrtno smo izvedli navzkrižno in recipročno opravevanje osmih komercialnih orhidej iz rodu *Phalaenopsis*.

Namen naloge je bil proučiti asimbiotsko kaljivost, rast in razvoj orhidej *Phalaenopsis* po načrtnem križanju na dveh komercialnih gojiščih s polno in polovično koncentracijo hranil. V ta namen smo cvetove načrtno in navzkrižno oprášili 14. marca 2008. Glavice smo pobirali postopoma, tako kot so dozorevale oz. se odpirale. Zračno smo jih dosušili in hranili pri sobni temperaturi do 18. februarja 2009, ko smo jih površinsko sterilizirali in inokulirali v dveh ponovitvah na 4 gojišča z oznakami A, 1/2 A, B in 1/2 B.

Seme smo s spatulo prenesli v mikrocentrifugirke in dodali 0,8 ml sterilizacijske tekočine - 1,6% dikloroizocianurno kislino in sterilizirali 8 minut pri sobni temperaturi. Nato smo postopek sterilizacije za 2 minuti nadaljevali v centrifugi (Beckman J2-HS) pri 5000 obratih/min in temperaturi 4 °C. 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. Kalitev in nadaljnje 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 23 °C.

Rastline vključene v poskus so se razlikovale po barvi cvetov, številu cvetnih stebel in cvetov. Oprášenih je bilo 64,6% cvetov od teh se jih je oplodilo oz. razvilo semenske kapsule 68% in v 44,5% kapsul oz. 16 kombinacijah križanj so nastala semena s kalčki. S postopkom razkuževanja je bila dosežena 91% aseptična kultura, pojavila se je samo glivična okužba.

En teden po inokulaciji so semena oz. kalčki nabrekli, bistvenih razlik med gojišči in kombinacijami križanj ni bilo. Nekoliko bolj nabrekla oz. večja so bila semena na gojišču B s polno koncentracijo hranil. Dva tedna po inokulaciji so se pojavili zeleni protokormi in tudi posamezni rizoidi. Tri in štiri tedne po inokulaciji so se v kalitvi in razvoju med kombinacijami križanj in gojišči začele pojavljati razlike. Pet in šest tednov po inokulaciji so začela kaljiva semena in protokormi neustreznih kombinacij križanj predvsem na gojiščih A in

B propadati. V sedmem in osmem tednu so se razvili prvi listi predvsem na gojiščih 1/2 A in 1/2 B. Deveti teden so se pojavili drugi listi in prve korenine.

100% so kalila in se 100% razvila v vitalne protokorme semena križanj 1, 2, 3, 5, 7 in 10 na gojišču 1/2 A in križanj 2, 3, 4, 6 in 9 na gojišču 1/2 B ter samo dveh križanj 4 in 7 na gojišču A. Na gojišču B semena nobene od kombinacij križanj niso 100% kalila in se razvila v vitalne protokorme. Semena nekaterih križanj so srednje do slabo kalila na izbranih gojiščih, a so se 100% razvila v vitalne protokorme in to pri kombinacijah križanj 2, 3 in 15 na gojišču A, pri križanjih 8, 9, 10, 12, 13 in 16 na gojišču 1/2 A in samo dve kombinaciji 1 in 6 na gojišču B ter pet kombinacij križanj 5, 8, 10, 11 in 13 na gojišču 1/2 B.

Gojišči 1/2 A in 1/2 B sta zaradi visokega odstotka kaljivih semen in nastalih vitalnih protokormov primerni tako za kalitev, kot tudi za rast in razvoj orhidej po križanjih z zelo malo vitalnimi semeni.

7 VIRI

- Arditti J. 1992. *Fundamentals of Orchid Biology*, New York, John Wiley & Sons: 712 str.
- Arditti J., Krikorian A.D. 1996. Orchid Micropropagation: the path from laboratory to commercialization and an account of several unappreciated investigators. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 122: 183-241
- Bohanec B. 1992. *Tehnike rastlinskih tkivnih kultur*. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Center za rastlinsko biotehnologijo in žlahtnjenje: 168 str.
- Christenson E. 2001. *Phalaenopsis*. Portland, The Haseltine Building: 183 str.
- Duan J. X., Yazawa S. 1995. Floral induction and development in *Phalaenopsis in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 43: 71-74
- Hicks A. J. 2000. Asymbiotic technique of orchid seed germination. Chandler, the Orchid Seedbank Project: 134 str.
- Hinnen M. G. J., Pierik R. L. M., Bronsema F. B. F. 1989. The influence of macronutrients and some other factors on growth of *Phalaenopsis* hybrid seedlings *in vitro*. *Scientia Horticulturae*, 41: 105-116
- Jevšnik T. 2002. Asimbiotsko razmnoževanje tropskih orhidej. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 64 str.
- Kramer J. 1997. *Orchid for everyone*. New York, Smithmark Publisher: 208 str.
- McKenzie Black 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.
- Petauer T. 1998. *Mali leksikon botanike*. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 390 str.
- Pridgeon A. 1999. *The Illustrated encyclopedia of orchids*. The Rocks, Landsowne Publishing Pty Ltd: 304 str.
- Ravnik V. 2002. *Orhideje Slovenije*. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 192 str.
- Rittershausen S., Pilcher, M. 2000. *A Gardner's Guide to Orchids and Bromeliads*. London, Merhurst Ltd: 96 str.

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

Sinkovič T. 2000. Uvod v botaniko: za študente visokošolskega strokovnega študija kmetijstva – agronomija in hortikultura. Ljubljana, Oddelek za agronomijo Biotehniške fakultete : 176 str.

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

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

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.

ZAHVALA

Zahvaljujem se svoji mentorici izr. prof. dr. Zlati Luthar za svetovanje in strokovno pomoč pri izdelavi diplomske naloge.

Strmole M. Rast in razvoj orhidej rodu *Phalaenopsis* v *in vitro* razmerah.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za agronomijo, 2009

PRILOGE