

Anders R. Johnsen  
[www.InVitroOrchids.dk](http://www.InVitroOrchids.dk)  
info@InVitroOrchids.dk

## Introduktion:

Det kan faktisk være enkelt at lave et sterilt vækstmedium til spiring af orkidefrø. Jeg bruger en hjemmelavet opskrift der giver god spiring og vækst for de fleste orkideer. Mediets sammensætning er baseret på flydende Substral gødning til pottedplanter. Substral indeholder, bortset fra calcium, de samme mikro- og makronæringsstoffer som findes i de professionelle orkidemedier Mushirage and Skoog og Phytamax. Substral skal tilsættes i forholdsvis lav koncentration for at nitratinholdet ikke bliver skadeligt. Appelsinjuice og kartoffel tilfører mediet plantehormoner, aminosyrer og andre vækstoffaktorer. Samtidig giver juicen en stor bufferkapacitet så pH holdes konstant. Det hele opløses i almindeligt postevand. Calcium i mediet kommer både fra kartoffel og fra vandet. Agar, som kan købes i mange asiatiske fødevarerbutikker, f.eks. <http://shopasia.dk>, tilsættes for at give mediet en gele-lignende struktur. Mediet steriliseres til sidst i en trykkoger i almindelige tomatglas, syltetøjsglas eller lignende. Glas med en lille åbning er bedst da det mindsker risikoen for kontaminering med svampe og bakterier når frøene skal sås. Fjern etiketter og lim da giftige stoffer fra limen kan frigives under steriliseringen

## Materialer:

Klorin (den i blå flaske)  
Salmiakspiritus (fortyndes 1:10 med vand)  
Lille reagensglas (2-ml eller 5-ml)  
Substral flydende gødning til stueplanter  
Friskpresset appelsinjuice  
Kartoffel  
Sukker  
Agar  
5-ml plastsprøjter – købes på apoteket  
Tomatglas eller syltetøjsglas med lille åbning  
Alufolie  
Køkkenfilm – helst den der kan tåle mikroovnen (men ikke den perforerede)  
Papirklips  
Trykkoger  
Stor pande  
Lighter  
Blender – kan undværes hvis kartofflen rives fint.  
pH teststrimler fra materialisten, strimler til intervallet 4,5 til 7 er de mest præcise.

## Mediet indeholder per liter:

Substral flydende gødning	2 ml
Kartoffel	25 g
Appelsinjuice	25 ml
Sukker	12 g
Agar	8 g
pH	5,7-5,8

## Fremgangsmåde

Skyl agaren 2 gange i vand for at fjerne salte og andre skadelige stoffer. Bland ingredienserne - de 2 ml gødning tilsættes lettest med en 5-ml plastsprøjte - og tilsæt 1 liter postevand. Homogeniser mediet i en blender og hæld det i en gryde. Justér pH til 5,7 til 5,8. Hvis pH er for lav justeres den ved at tilsætte et par dråber fortyndet salmiakspiritus ad gangen. Hvis pH er for høj kan den sænkes ved at tilsætte et par ml appelsinjuice. pH-værdien bestemmes med pH test-strimler. Opvarm mediet til kogepunktet for at opløse agaren, og fordel derefter mediet i glassene, ca. 2 cm i hver. Luk med to lag aluminiumsfolie og kog i en trykkoger i 30 min. Herefter kan kolberne opbevares i lukkede fryseposer i køleskabet til de skal bruges.



Plastfolie til at blive steriliseret i mikroovnen og medium til trykkogeren.



*Gymnadenia conopsea* med flere skud.



Trykkoger til sterilisering af mediet.



*Calypso bulbosa* var *occidentalis*. Spiring og protokormdannelse på det samme medie.



Opskriften virker også godt for tropiske epifytter som *Phalaenopsis*.

### Frø – høst og sterilisering

Jeg høster frøene lige før frøkapslerne åbner sig, for på dette tidspunkt har frøene endnu ikke været udsat for sporer fra bakterier og svampe. Det rigtige tidspunkt er, når kapslerne begynder at blive brune. Frø fra visne halvrådnede kapsler er næsten umulige at sterilisere. For mange arter falder spiringsprocenten hurtigt så det er bedst at så friske frø.

Jeg steriliserer frøene ca. 10-15 minutter i hypochlorit. Hypochlorit er den aktive komponent i Klorin. Bland 1 den klorin med 4 dele demineraliseret vand og tilsæt 1 dråbe opvaskemiddel. Lidt frø overføres til et lille reagensglas og et par milliliter klorinopløsning tilsættes med en 5-ml plastiksprøjte. Ryst røret nu og da.

Nogle gange kan man kun få frø fra brune og halvrådnede frøkapsler. I så fald vil du få 100% svampekontaminering med ovenstående procedure, så mere omfattende procedurer er nødvendige. Sporer af bakterier og svampe er meget modstandsdygtige over for kemiske angreb, så klorinen vil ikke dræbe alle sporer på stærkt forurenede frø. Tricket er at få sporerne til at spire før de dræbes, og dette gøres ved at tilbyde dem sukker. Lav en sukkeropløsning (ca. 1 teske pr liter). Bland frøene med lidt sukkeropløsning i en reagensglas og lad dem stå natten over ved stuetemperatur. Fjern sukkeropløsning med en sprøjte med en kanyle, derefter steriliseres frøene som beskrevet ovenfor.

### Steril såning

For at undgå kontaminering med sporer fra bakterier og svampe, må de sterile glas med vækstmedium kun åbnes i dampen over et kogende vandbad. Dette gøres lettest med en stor pande på komfuret.

De steriliserede frø fra haveorkideer flyder for det meste ovenpå klorinopløsningen så der er ikke behov for filtrering, frøene kan simpelthen overføres til kolberne med en udrettet papirklips, hvor enden er bukket til et loop. Tropiske orkidéfrø synker derimod og man må så fjerne klorinopløsningen med en sprøjte fra apoteket med en steril engangs-kanyle. Steriliser loop og den nederste del af papirklipsen ved at flambere det med en lighter. Lad papirklipsen køle af et øjeblik. Sæt glasset over et kogende vandbad, og løsn aluminiumsfolien i kanterne. Løft alufolie en smule og overfør en dråbe klorin/frø til glasset med papirklipsen. Vær omhyggelig med at kun den flamberede (= sterile) del af papirklipsen rører glasset. Der skal kun sås en meget lille klump frø i hvert glas da konkurrencen mellem småplanterne ellers bliver for stor.

Efter såning skal alufolien udskiftes med køkkenplastfilm. Køkkenfilmen skal helst være den der også kan gå i mikroovnen, men ikke den perforerede version. Køkkenfilmen er semi-steril, når du køber den i supermarkedet, fordi den er fremstillet ved høj temperatur. For at øge sterilitet, kan man placere køkkenfilmen i en mikrobølgeovn sammen med en skål med vand og bestråle i 3 minutter. Alufolien fjernes forsigtigt over det kogende vandbad, her er det vigtigt at du ikke rører den sterile øverste del af glasset som var inde under alufolien. Så sættes hurtigt et lag plastfilm over glassets åbning. Og her skal man passe på ikke at røre den side af filmen som skal vende ind mod glasset og som derfor skal være steril. Herefter dækkes åbningen med endnu et lag plastfilm, og glassene forsegles med tape omkring toppen.

Det er vigtigt, at der ikke er luft-bevægelse i rummet, når du sår frøene og erstatter aluminiumsfolie da luftbevægelse øger risikoen for forurening, så sluk for emhætten og hold vejret. I kolberne er der ofte et par dråber kondensvand som kan bruges til forsigtigt at fordele frøene på agar-overfladen. Hvis agaren er tør, kan du få lidt vand ved at stille glassene skråt i et par dage i køleskabet. Med ovenstående procedure, kommer der kontaminering med bakterier eller svampe i 10 til 50% af glassene. Risikoen for kontaminering er meget lavere, hvis du har adgang til et sterilkabinet stedet for at bruge et vandbad.

Når frøene er blevet sået, skal kolberne stilles mørkt. Spiringstid varierer fra et par dage til mere end et år, men friske frø af nemme arter som *Dactylorhiza*, *Bletilla*, *Calopogon* og nogle *Platanthera* spirer inden for 2-4 uger. Først dannes en klump udifferentierede celler, et protocorm. Når protocormet når en bestemt størrelse, danner den skud og rod den ene ende. Sæt glassene i svagt lys (ingen direkte sol), når småplanterne begynder at danne skud.

Kuldeperioder er vigtige for både spiring og udvikling af tempererede orkideer. Jeg sætter derfor altid glassene i køleskabet i december, januar og februar, både ikke-spirede frø, protocormer og fuldt udviklede planter. For nogle arter øger kuldebehandling spiringen, og for de fleste arter behøver de små planter en kold periode for at bryde vækstsvulgen før de kan plantes i jord.

Frilandsorkideer der er nemme at frøformere:

*Dactylorhiza*, *Liparis*, *Calanthe*, *Bletilla*, *Pleione*, *Spiranthes*, *Calopogon*, *Goodyera*, *Serapias*, *Satyrium*, *Ophrys*, nogle *Orchis* med tynd frøskal (*O. sancta*, *O. pauciflora*, *O. coriophora*, *O. fragrans*, *O. palustris*, *O. laxiflora*, *O. italica*, *O. papilionacea*), nogle *Platanthera* (*P. dilatata*, *P. hysborea*, *P. blephariglottis*).

Frilandsorkideer der er svære eller umulige.

*Orchis* med tyk frøskal (*O. militaris*, *O. purpurea*, *O. mascula*), *Anacamptis pyramidalis*, *Platanthera* med tyk frøskal (*P. chlorantha*, *P. bifolia*). *Gymnadenia*, *Epipactis*, *Cephalanthera*, de fleste *Cypripedium*. Ofte kan forlænget sterilisering med hypoklorit (ca. 45-60 min) af helt friskt frø give lidt spiring af de svære arter. Mange svære arter kan frøformeres fra grønne umodne frøkapsler, men det kræver sterilbænk eller egentlige laboratorieforhold.



1,5 ml Eppendorfrør med frø og hypochlorit, og en papirclip til af så frøene med.



En enkelt spore inde i glas, og du har bakterier eller svampe over det hele.



Risikoen for kontaminering reduceres, hvis glassene placeres på et kogende vandbad når frøene såes.



*Dactylorhiza purpurella* (14 måneder) er klar til komme ud af glasset.

