

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Petra KREFT

**ASIMBIOTSKA KALITEV SEMEN ORHIDEJE
Bletilla striata (Thunb.) PO HLADNEM
CENTRIFUGIRANJU**

DIPLOMSKO DELO

Visokošolski strokovni študij - 1. stopnja

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Petra KREFT

**ASIMBIOTSKA KALITEV SEMEN ORHIDEJE *Bletilla striata*
(Thunb.) PO HLADNEM CENTRIFUGIRANJU**

DIPLOMSKO DELO
Visokošolski strokovni študij - 1. stopnja

**ASYMBIOTIC SEED GERMINATION OF ORCHID *Bletilla striata*
(Thunb.) AFTER COLD CENTRIFUGATION**

B. SC. THESIS
Professional Study Programmes

Ljubljana, 2014

Diplomsko delo je zaključek Visokošolskega strokovnega študija Kmetijstvo – agronomija in hortikultura – 1. stopnja. Delo je bilo opravljeno na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Zlato Luthar.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Marijana Jakše
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Zlata Luthar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za agronomijo

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

Datum zagovora:

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

Petra Kreft

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dv1
DK UDK 582.59:581.142:57.085.2(043.2)
KG terestična orhideja/*Bletilla striata*/fiziološka starost/seme/hladno centrifugiranje/asimbiotska kalitev/morfološke faze
AV KREFT, Petra
SA LUTHAR, Zlata (mentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
LI 2014
IN ASIMBIOTSKA KALITEV SEMEN ORHIDEJE *Bletilla striata* (Thunb.) PO HLADNEM CENTRIFUGIRANJU
TD Diplomsko delo (Visokošolski strokovni študij - 1. stopnja)
OP X, 35 str., 11 pregl., 15 sl., 29 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI V poskus *in vitro* kalitve so bila vključena nezrela in zrela semena terestične orhideje *Bletilla striata*. Zrela semena so bila dve leti hranjena pri 4 °C, nezrela pa 6 tednov pri sobni temperaturi. Nezrelo in zrelo semensko glavico ter semena smo razkuževali 10 oz. 8 minut z 1,6 % dikloroizocianurno kislino pri sobni temperaturi. Nato smo dve minutno razkuževanje semen in 3-krat po dve minutno spiranje nadaljevali s centrifugiranjem pri sobni temperaturi oz. 4 °C. S hladnim centrifugiranjem smo žeeli izboljšati kalitev. Semena na kalitvenem gojišču smo 3-krat bonitirali. Neglede na obravnavanje so skoraj vsa semena kalila v obdobju 11 dni. 19 dni po inokulaciji je večina semen že prešla v morfološko fazo, protokorm z listom, ki je bila v razponu od 42,6 % pri zrelem semenu centrifugiranem pri sobni temperaturi do 67,7 % pri zrelem semenu iz razkužene semenske glavice. V obdobju 32 dni po inokulaciji je bila najbolj zastopana in izenačena morfološka faza, protokorm z listom. Pri petih obravnavanjih (SS sT, ZS sT, ZS 4 °C, SS RK in SS 4 °C) je nihala od 84,5 do 88,1 %. Najmanj (74,3 %) protokormov z listom je bilo pri nezrelem semenu iz razkužene semenske glavice. V tem obdobju ni bilo bistvenih razlik v morfoloških fazah med nezrelim in zrelim semenom. Rastline smo po 109 dneh s kalitvenega gojišča prestavili na subkultivacijsko gojišče in tudi tu opravili 3 bonitiranja. Vse rastline so ob subkultivaciji imele vsaj 2 lista, večina pa že korenino oz. korenini. V zadnjem 6. obdobju spremljanja, ko so bile rastline 83 dni na subkultivacijskem gojišču, so že vse imele bulbuluse. Nekatere so pridobile še list oz. liste in prav tako korenine ter faza razraščanja je bila v porastu. Rastlin v fazi razraščanja je bilo več (9 %) nastalih iz zrelega semena in manj (5,2 %) nastalih iz nezrelega semena.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dv1
DC UDC 582.59:581.142:57.085.2(043.2)
CX terestic orchid/*Bletilla striata*/physiological age/seed/cold centrifuge/asymbiotic germination/morphological stages
AU KREFT, Petra
AA LUTHAR, Zlata (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
PY 2014
TY ASYMBIOTIC SEED GERMINATION OF ORCHID *Bletilla striata* (Thunb.)
AFTER COLD CENTRIFUGATION
DT B. Sc. Thesis (Professional Study Programmes)
NO X, 35 p., 11 tab., 15 fig., 29 ref.
LA sl
AI sl/en
AB Immature and mature seeds of orchid *Bletilla striata* were included in the *in vitro* germination experiment. Mature seeds were stored for two years at 4 °C, while the immature seeds were stored at room temperature for 6 weeks. The immature and mature seed head and seeds were disinfected at room temperature. Both types were exposed to 1.6 % dichloroisocyanuric acid for 10 or 8 minutes respectively. After two minute long seed disinfection and three times two minutes long rinsing, we proceeded with the centrifugation process at room temperature or 4 °C. By cold centrifugation, we wanted to improve germination. We evaluated the seeds on germination medium three times. Despite of the use of different procedures, all seeds germinated within 11 days. 19 days after inoculation most of the seeds went into a morphological stage – a protocorm with a leaf – that ranged from 42.6 % for mature seeds, which had undergone the process of centrifugation at a room temperature, and to 67.7 % for mature seeds, where the seed head was disinfected. 32 days after inoculation the prevailing morphological stage was the protocorm with a leaf. In five treatments it varied from (SS sT, ZS sT, ZS 4 °C, SS RK in SS 4 °C) 84.5 % to 88.1 %. The least protocorms (74.3 %) with a leaf developed from immature seeds from disinfected seed heads. In this observation period there were no substantial differences in the morphological stages of immature and mature seeds. After 109 days the plants were transferred from the germination medium onto the subcultivation medium. Here we also performed 3 evaluations. At subcultivation the plants already had at least two leaves, and a large majority also had one to two roots. In the last (sixth) observation period, the plants that were onto the subcultivation medium for 83 days, all developed bulbs. Some of the plants gained an additional leaf or leaves, roots and there were also signs of increased proliferation. The percentage of plants in proliferation that grew from mature seeds (9 %) was higher compared to plants that grew from immature seeds (5.2 %).

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VIII
 1 UVOD	 1
1.1 NAMEN NALOGE	1
1.2 DELOVNA HIPOTEZA	1
 2 PREGLED OBJAV	 2
2.1 ZNAČILNOSTI DRUŽINE Orchidaceae - KUKAVIČEVKE	2
2.2 BOTANIČNA UVRSTITEV IN OPIS ORHIDEJE <i>Bletilla striata</i>	3
2.3 RASTIŠČE IN OBLIKA RASTI ORHIDEJ	4
2.4 ZGRADBA CVETA ORHIDEJ	6
2.4.1 Oprasitev	7
2.4.2 Oploditev in razvoj semena	8
2.5 DORMANCA SEMEN	9
2.6 MIKORIZA	10
2.7 MIKROPROPAGACIJA	10
 3 MATERIALI IN METODE	 12
3.1 SEMENSKI MATERIAL	12
3.2 METODE DELA	12
3.2.1 Površinsko razkuževanje rastlinskega materiala	12
3.2 SESTAVA IN PRIPRAVA GOJIŠČA	13
3.3 INOKULACIJA SEMEN NA GOJIŠČE	14
3.4 SUBKULTIVACIJA	15
3.5 GOJENJE	16
3.6 BONITIRANJE	16
 4 REZULTATI	 18
4.1 ASIMBIOTSKA KALITEV NA GOJIŠČU A	18
4.1.1 Prvo bonitiranje: 11 dni po inokulaciji semen na gojišče A	18
4.1.2 Drugo bonitiranje: 19 dni po inokulaciji semen na gojišče A	19
4.1.3 Tretje bonitiranje: 32 dni po inokulaciji semen na gojišče A	21

4.2 SUBKULTIVACIJA NA GOJIŠČE B.....	22
4.2.1 Četrto bonitiranje: 20 dni po inokulaciji rastlin na gojišče B	23
4.2.2 Peto bonitiranje: 44 dni po subkultivaciji rastlin na gojišče B	24
4.2.3 Šesto bonitiranje: 83 dni po subkultivaciji rastlin na gojišče B	25
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	28
5.1 RAZPRAVA.....	28
5.1.1 Prazna semena	28
5.1.2 Asimbiotska kalitev na gojišču A	28
5.1.3 Subkultivacija rastlin na gojišče B.....	29
5.2 SKLEPI.....	30
6 POVZETEK.....	32
7 VIRI	34
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	Str.
Preglednica 1: Načini opašitve in opaševalci orhidej (Jevšnik, 2006).....	7
Preglednica 2: Čas potreben za oblikovanje plodu pri nekaterih orhidejah (Jevšnik, 2006)	9
Preglednica 3: Sestava gojišča za kalitev (A) in za subkultivacijo (B) orhideje <i>B. striata</i>	14
Preglednica 4: Število nekaljivih in nabreklih semen, protokormov ter protokormov z rizoidi 11 dni po inokulaciji semen <i>Bletilla striata</i> na gojišče A	19
Preglednica 5: Število nabreklih semen, protokormov, protokormov z rizoidi in protokormov z listom 19 dni po inokulaciji semen <i>Bletilla striata</i> na gojišče A	20
Preglednica 6: Število nabreklih semen, protokormov, protokormov z rizoidi, protokormov z listom ter 2 lista in korenina 32 dni po inokulaciji semen <i>Bletilla</i> <i>striata</i> na gojišče A	21
Preglednica 7: Odstotek morfoloških faz pri nezrelem in zrelem semenu 11, 19 in 32 dni po inokulaciji semen <i>Bletilla striata</i> na gojišče A	22
Preglednica 8: Število rastlin <i>Bletilla striata</i> z listi in koreninami v različnih morfoloških fazah 20 dni po subkultivaciji na gojišče B	23
Preglednica 9: Število rastlin <i>Bletilla striata</i> z listi in koreninami, bulbulusi ter razraščanjem v različnih morfoloških fazah 44 dni po subkultivaciji na gojišče B	24
Preglednica 10: Število rastlin <i>Bletilla striata</i> z listi in koreninami, bulbulusi ter razraščanjem v različnih morfoloških fazah 83 dni po subkultivaciji na gojišče B	26
Preglednica 11: Odstotek morfoloških faz pri nezrelem in zrelem semenu 20, 44 in 83 dni po subkultivaciji rastlin <i>Bletilla striata</i> na gojišče B	27

KAZALO SLIK

	Str.
Slika 1: Orhideja <i>Bletilla striata</i> : A – oblika rasti (BioLib ..., 2008); B – oblika cveta (Orchidées ..., 2009)	3
Slika 2: Način rasti orhidej: A – epifitni (Flickr ..., 2010); B – litifitni (Australian ..., 2011); C – terestični (Wild ..., 2007).....	4
Slika 3: Rast nadzemnih delov: A – simpodialna; B – monopodialna (Wordpress ..., 2010)	5
Slika 4: Sestavni deli cveta: A – venčni listi (petala); B – cvetni pecelj, plodnica, stebriček, brazda in poliniji; C – zunanji čašni listi (sepala); D – poliniji s prašnično kapico; E – poliniji (Kreft P.).....	6
Slika 5: Umetno – ročno oprševanje orhidej (Kreft P.)	8
Slika 6: Označene petrijevke s štirimi kvadrami znotraj katerih so bila opravljena bonitiranja.....	15
Slika 7: Gojenje orhidej <i>Bletilla striata</i> : A – na kalitvenem gojišču A; B – na subkultivacijskem gojišču B.....	16
Slika 8: Gojenje orhidej <i>Bletilla striata</i> : A – druga subkultivacija; B – razraščanje v steklenih kozarcih; C – primerna za aklimatizacijo (Kreft P.)	16
Slika 9: Morfološke faze od kalitve in do razvoja prvega lista: A – nabrekanje, povečanje kalčka; B – razvoj protokorma; C – sprostitev protokorma iz teste in pojav rizoidov; D – povečani protokorm z rizoidi; E – protokorm z listom (An assessment ..., 2005)	17
Slika 10: Odstotek nekaljivih in nabreklih semen, protokormov ter protokormov z rizoidi 11 dni po inokulaciji semen <i>Bletilla striata</i> na gojišče A	19
Slika 11: Odstotek nabreklih semen, protokormov, protokormov z rizoidi in protokormov z listom 19 dni po inokulaciji semen <i>Bletilla striata</i> na gojišče A	20
Slika 12: Odstotek nabreklih semen, protokormov, protokormov z rizoidi, protokormov z listom ter 2 lista in korenina 32 dni po inokulaciji semen <i>Bletilla striata</i> na gojišče A:	22
Slika 13: Odstotek rastlin <i>Bletilla striata</i> z listi in koreninami v različnih morfoloških fazah 20 dni po subkultivaciji na gojišče B	23
Slika 14: Odstotek rastlin <i>Bletilla striata</i> z listi in koreninami, bulbulusi ter razraščanjem v različnih morfoloških fazah 44 dni po subkultivaciji na gojišče B	25
Slika 15: Odstoki rastlin <i>Bletilla striata</i> z listi in koreninami, bulbulusi ter razraščanjem v različnih morfoloških fazah 83 dni po subkultivaciji na gojišče B	26

SIMBOLI IN OKRAJŠAVE

ZS 4 °C - nezrelo, zeleno seme centrifugirano pri 4 °C, pridelek 2010

ZS sT - nezrelo, zeleno seme centrifugirano pri sobni temperaturi, pridelek 2010

ZS RK - nezrelo, zeleno seme, razkuženo kot nezrela semenska glavica, pridelek 2010

SS 4 °C - zrelo, staro seme centrifugirano pri 4 °C, pridelek 2008

SS sT - zrelo, staro seme centrifugirano pri sobni temperaturi, pridelek 2008

SS RK - zrelo, staro seme, razkuženo kot zrela semenska glavica, pridelek 2008

gojišče A - kalitveno gojišče proizvajalca Sigma Aldrich P1056

gojišče B - subkultivacijsko gojišče, mešanica mikroelementov MS gojišča (Murashige in Skoog, 1962) in makroelementov B5 gojišča (Gamborg in sod., 1968) ter ostalih sestavin, razen banane v prahu in oglja, povzete po Hinnen in sod. (1989).

1 UVOD

Še pred slabim desetletjem so bile pri nas orhideje kot lončnice težko dostopne in cenovno dražje okrasne rastline. Na razpolago so bile le manj zahtevne vrste in hibridi iz rodov *Phalaenopsis*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Oncidium*, *Paphiopedilum*, itd. Sedaj se jih dobi vsepovsod, pestrost vrst se je zelo povečala in cenovno so dostopne vsakomur. Vedno več se pojavljajo v prodaji tudi talne orhideje in to večletnice. Orhideje so glede gojenja, posebno razmnoževanja, zahtevne rastline, saj gre za skupino rastlin, ki imajo zelo majhna semena brez endosperma in pri katerih je kalitev v naravi vezana na mikorizno glivo.

Vrsta orhideje, ki smo jo vključili v poskus proučevanja prekinitve dormance semen s hladnim centrifugiranjem je bila *Bletilla striata* (Thunb.). To je terestična v zemlji rastoča orhideja, pokončne rasti in dekorativnih rožnatih cvetov. Pri nas relativno malo poznana, vendar povpraševanje po njej iz leta v leto narašča ne samo v okrasne namene, ampak tudi farmakološke, saj so odebujene korenine vir zdravilnih, astringentnih učinkovin.

Orhideja *Bletilla striata* je trajnica. Semena prezimijo v tleh, zato potrebujejo za kalitev prekinitev mehanizmov, ki uravnavajo počitek in mehčanje teste. Pri zrelem semenu z razvitim kalčkom, je testa otrdela, da ga varuje pred poškodbami, vdorom vlage in kisika v notranjost. Pogosto je poleg dormance otrdelost teste največji problem *in vitro* kalitve.

1.1 NAMEN NALOGE

Namen naloge je bil vzpostaviti *in vitro* kalitev zrelih semen z mehčanjem teste s hladnim centrifugiranjem in preizkusiti kalivost nezrelega semena s še neotrdelo testo.

1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Predpostavljal smo, da bodo nezrela semena, ki še niso prešla v dormanco in pri katerih testa še ni otrdela, boljše *in vitro* kalila v primerjavi z zrelimi semenimi, ki so bila hranjena skoraj 2 leti pri 4 °C in pri katerih je bila testa otrdela.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZNAČILNOSTI DRUŽINE Orchidaceae - KUKAVIČEVKE

Družina kukavičevk je razdeljena v dve skupini oziroma poddružini. V prvo je uvrščena poddružina *Cypripedioideae*, kamor spada *Cypripedium*, pri nas zelo znani lepi čoveljc, vse ostale orhideje, med katerimi so večinoma epifiti in litofiti so uvrščene v poddružino *Orchidoideae*, ki v Sloveniji ni zastopana (Martinčič in sod., 1999; Ravnik, 2002).

Epifitne in litofitne orhideje so najbolj razširjene v tropskem območju, nekaj jih uspeva tudi v subtropskem. Terestrične orhideje rastejo v tleh in s pomočjo korenin črpajo vodo in hranilne snovi iz tal, razširjene so vsepo vsod, razen na ekstremnih, mejnih območjih, kjer rastline lahko še uspevajo. To jim omogoča simbioza z mikoriznimi glivami in nezahtevnost glede hrani. Mikorizne glive so iz tal sposobne črpati mineralna hraniila, ki jih rastline s svojim koreninskim sistemom ne morejo. Zato lahko rastline, ki so v simbiozi z mikoriznimi glivami poseljujejo mejna območja, kjer druge rastline ne uspevajo. Po številčnosti in raznovrstnosti so zelo zastopana družina, saj predstavljajo približno 10 % vseh rastlinskih vrst na Zemlji. V družino kukavičevk je vključenih priližno 750 različnih rodov z 20.000 do 30.000 vrstami in podvrstami. Število te družine se iz leta v leto povečuje s številnimi križanci oziroma sortami, ki so bile vzgojene v okrasne namene (Cronquist, 1981; Dressler, 1981; Arditti, 1992).

V Evropi je bilo najdenih približno 300 vrst. V Sloveniji, podatek je iz leta 2002, pa je identificiranih 83 vrst, podvrst in varietet, ki so uvrščene v 27 rodov. Ta zastopanost se spreminja, saj se rastišča v zadnjem obdobju tako hitro spreminja, kar ima za posledico, da se z njih umikajo oziroma izginjajo tudi določeni predstavniki ali celo vrste (Ravnik, 2002).

Ker so vrste kukavičevk zelo raznolike, je splošne značilnosti družine težko določiti oz. je nemogoče vse zajeti, kljub temu je nekaj takih lastnosti po katerih so razpoznavne in se najbolj pogosto pojavljajo.

Osnovne botanične lastnosti kukavičevk (Jevšnik, 2006):

- Za vse vrste je značilna tvorba plodov oziroma semenskih glavic, ki vsebujejo zelo veliko število izredno majhnih semen brez oziroma z zelo malo rezervnimi snovmi.
- Kalitev semen je mogoča le v simbiozi z glivo. Ko seme vzkali, se oblikuje značilna struktura, ki se imenuje protokorm, šele nato iz nje požene klični list (enokaličnice).
- Cvet je enosomeren in sestavljen iz šestih cvetnih listov, ki so razvrščeni v dveh nizih. Zunanji obroč sestavlja tri sepale, notranje obroč pa tri petale, od

katerih je en pogosto modificiran v živopisano strukturo najrazličnejših oblik. Imenuje se medena ustna ali labelum in je namenjen privabljanju opaševalcev.

- Pelodna zrna so družena v bolj ali manj kompaktne skupke, ki se imenujejo poliniji.
- Prašniki in pestič so zrasli in tvorijo značilno strukturo, ki jo imenujemo stebriček.

2.2 BOTANIČNA UVRSTITEV IN OPIS ORHIDEJE *Bletilla striata*

permatophyta - semenke

PODEBLO: SDDEBLO: Magnoliophytina (Angiospermae) - kritosemenke

RAZRED: Liliopsida (Monocotyledoneae) - enokaličnice

PODRAZRED: Liliidae

NADRED: Orchidanae

RED: Orchidales - kukavičevci

DRUŽINA: Orchidaceae - kukavičevke

PODDRUŽINA: Orchidoideae

ROD: *Bletilla*

VRSTA: *striata*

Bletilla striata (Thunb.) Rchb. F. (slika 1) pripada majhni skupini kopenskih orhidej, ki izvirajo iz Kitajske, Japonske, Vietnamja in Tajvana. Odkrita je bila leta 1784 na Japonskem, leta 1878 jo je Heinrich Gustav Reichenbach pravilno uvrstil v sistematiko rastlin. V Evropo so jo prinesli v začetku 19. stoletja (Dressler, 1981).



A



B

Slika 1: Orhideja *Bletilla striata*: A – oblika rasti (BioLib ..., 2008); B – oblika cveta (Orchidées ..., 2009)

Bletilla spada med talno rastoče orhideje. V tleh ima bulbuluse (neprava čebulica) iz katerih izraščajo pokončni listi, ki so suličasti in na koncu priostreni. Pozimi, ko nadzemni organi odmrejo se bulbulusi obdržijo pod zemljo in spomladi spet iz njih poženejo novi listi in cvetna steba (slika 1A). Iz vsakega poganjka zraste 4 do 6 listov, visokih približno 15 cm, celotna rastlina pa meri v višino približno 30 cm. Vsak list razen prvega ima cevasto listno steblo, ki ga obkroža centimetrski pecelj. Listi so izmenično nameščeni v dveh vertikalnih nizih. Na vrhu poganjka izrašča klasasto socvetje s 6 - 10 cvetov, ki se odpirajo postopoma, od spodnjih do višje ležečih cvetov. Sočasno je odprtih več cvetov, ponavadi 3 - 4, ki cvetijo približno mesec. Barva cvetov je lahko od izrazito svetle (rumene in bele v kombinaciji z rumeno-oranžno medeno ustno) do svetlorožnate do temno vijoličaste. Cvetni in venčni listi so si zelo podobni. Medena ustna, ima nekaj nagubanih brazd, ki so lahko v isti ali drugi barvi kot preostali cvetni listi (slika 1B).

2.3 RASTIŠČE IN OBLIKA RASTI ORHIDEJ



A



B



C

Slika 2: Način rasti orhidej: A – epifitni (Flickr ..., 2010); B – litifitni (Australian ..., 2011); C – terestični (Wild ..., 2007)

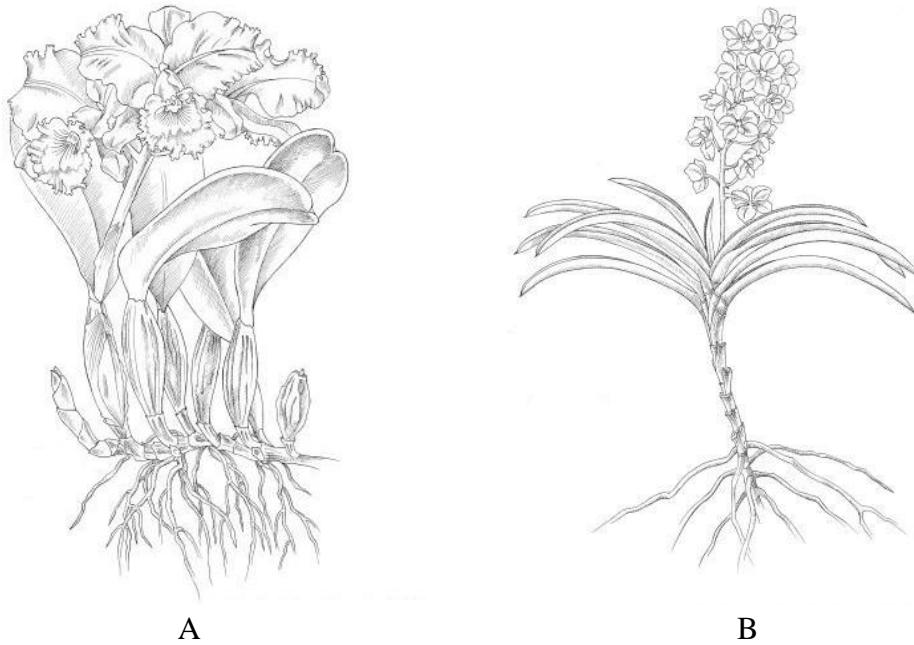
Glede načina rasti, orhideje delimo v tri skupine:

- Epifiti
- Litifiti
- Geofiti oz. terestične orhideje

Kukavičevke imajo vegetativen del zelo raznolik. Nekatere zrastejo komaj nekaj milimetrov, medtem ko nekatere zrastejo v prave večmetrske orjake, katerih masa lahko presega tisoč kilogramov. Določene vrste rastejo v krošnjah dreves, druge v tleh na zemlji, nekatere so popolnoma v zemlji, le cvetijo na prostem (Pridgeon, 1999).

Epifiti so rastline, ki se pritrdijo na druge rastline (drevesa, grmovje). Litofiti se pritrdijo na skale in kamne. Orhideje niso paraziti svojih gostiteljev, rastejo samostojno, gostitelja koristijo samo za podlago (slika 2A in B). Hrane ne črpajo iz rastline na katero se pritrdijo, ampak se prehranjujejo s snovmi, ki so raztopljene v deževnici in z ostanki, ki se nabirajo okoli njihovih korenin. Geofiti oz. terestične orhideje so v tleh rastoče in črpajo hrano iz tal (slika 2C).

Glede na rast nadzemnih delov so orhideje razdeljene v dve skupini:



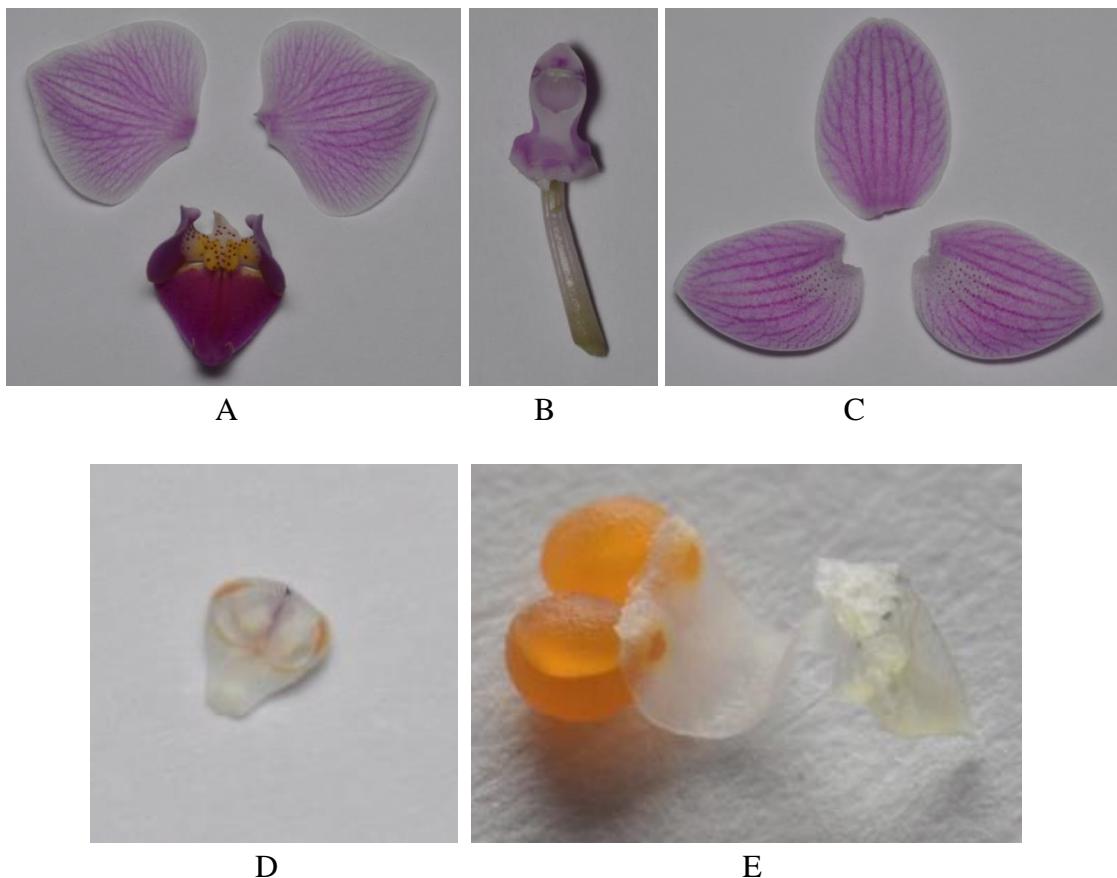
Slika 3: Rast nadzemnih delov: A – simpodialna; B – monopodialna (Wordpress ..., 2010)

Simpodialne se razraščajo iz osnove tako, da poženejo vsako leto nov poganjek iz osnove lanskoletne rasti. Poganjki tega rastnega tipa so lahko zadebeljeni (*Oncidij*) ali pa ne

(*Paphiopedilum*). Zadebeljeni poganjki tvorijo neprave čebulice ali bulbuluse, ki so lahko okrogli ali podolgoviati. Pseudobulbusi služijo za shranjevanje vode in hrane, pomagajo ji preživeti v sušnih dneh in preko zime. Pri simpodialnih orhidejah požene cvetno steblo iz vrha dozorele neprave čebulice ali iz njegovega vznožja (slika 3A) (Kramer, 1997).

Monopodialne rastejo le v eni osi tako, da novi listi rastejo na vrhu glavne osi. Z rastjo novih listov spodnji počasi odmirajo, vzdolž zgornjega dela pa rastejo nove korenine in cvetna steba. Pri nekaterih rodovih iz glavnega steba rastejo stranski poganjki in tako odstopajo od pravila rasti ene osi. Steblo je lahko zelo kompaktno in ne potrebuje opore (*Phalaenopsis*, *Vanda*, ...) ali pa hitrorastoče kot vzpenjalka (*Vanillia*) (slika 3B) (Kramer, 1997).

2.4 ZGRADBA CVETA ORHIDEJ



Slika 4: Sestavni deli cveta: A – venčni listi (petala); B – cvetni pecelj, plodnica, stebriček, brazda in poliniji; C – zunanji čašni listi (sepala); D – poliniji s prašnično kapico; E – poliniji (Kreft P.)

Kukavičevke so enodomne rastline z večinoma dvospolnimi cvetovi. Čašni in venčni listi (slika 4A in C) so pri orhidejah obarvani, medtem ko so pri ostalih cvetočih rastlinah čašni listi večinoma zeleni in so obarvani le venčni listi. Cvet kukavičevk je someren (v

vertikalni ravnini je cvet razdeljen na dve enaki polovici) in sestavljen iz šestih cvetnih listov. Zunanji trije čašni listi (sepala) (slika 4C) varujejo notranje tri venčne liste (petale) (slika 4A). Najnižji venčni list se razlikuje po obliki od ostalih dveh, je največji in najbolj obarvan, imenuje se medena ustna (labelum) (slika 4A). Medena ustna ima funkcijo privabljanja žuželk za oprševanje cvetov in je navadno podaljšana v ostrogo, v katerih se nahajajo žleze. V sredini cveta je stebriček (gimnostemij) (slika 4 B), ki ima združene reprodukcijske moške in ženske spolne organe. Pelodna zrna so združena v polinije in pokrita s prašnično kapico (slika 4D in E).

2.4.1 Opršitev

Orhideje imajo pisane in nekatere tudi dišeče cvetove različnih oblik. Ta lepota cvetov ima naloge privabiti oprševalce, ker je večina orhidej tujeprašnih (alogamnih). Alogamnost je lastnost, ki omogoča navzkrižno oprševanje med različnimi rastlinami. Oprševalce se med hranjenjem z nektarjem v ostrogi z glavo dotakne lepljive ploščice polinarija (slika 4D). Ta se mu prilepi na glavo in oprševalce polinarij odnese s sabo na drug cvet, kjer ga nevede odloži na lepljivo brazdo (viscidij). Ob umiku spet vzame nove polinarije. Alogamne orhideje ali tujeprašnice so za opršitev odvisne od drugih organizmov oz. dejavnikov (žuželke, veter,...). Žuželke opršujejo kar 87 % orhidej, oprševalci so lahko tudi ptiči, žabe, mravlje, itd. (preglednica 1). Navezanost na oprševalce je pri mnogih orhidejah zelo specializirana, kar pomeni, da ima neka vrsta orhidej točno določeno vrsto žuželke, ki jo opršuje. Če oprševalce iz kakršnegakoli vzroka ni prisoten, lahko vrsta po določenem času tudi izumre (Petauer 1998).

Poznamo pa tudi druge načine oprševanja, ki pa niso tako pogosti. Avtogramne orhideje (samoprašnice) se opršujejo znotraj ene rastline oziroma cveta tako, da se kavdikula upogne in polinarij oziroma poliniji se prilepijo na brazdo. Kleistogramne orhideje so tudi samoprašnice in do opršitve pride še preden se cvet odpre. Apogamne orhideje pa za tvorbo ploda in semen ne potrebujejo opršitve (Jevšnik, 2006).

Preglednica 1: Načini opršitve in oprševalci orhidej (Jevšnik, 2006)

Način opršitve (oprševalci)	Opršitev odstotek (%)
Tujeprašne vrste in oprševalci	
Kožokrilci	60
Molji	8
Metulji	3
Ptice	3
Muhe	15
Drugi organizmi (žabe, mravlje, ...)	7
Samoprašne vrste (predvsem kleistogramija)	3
Apogamne vrste	1

V stanovanjih in rastlinjakih orhideje oprashimo umetno oziroma ročno, saj tam nimajo možnosti naravnega oprševanja. Ročno se opršuje orhideje tudi v žlahniteljske namene, kjer načrtno izberemo starše. Pri tem si pomagamo z ošiljenim predmetom (slika 5), s katerim odstranimo polinije. Iz polinijev odstranimo prašnično kapico in jih namestimo na lepljivo brazdo stebrička. Poliniji se morajo s čim večjo površino prilepiti na brazdo, da je oprashitev uspešna.



Slika 5: Umetno – ročno oprševanje orhidej (Kreft P.)

2.4.2 Oploditev in razvoj semena

Od opršitve pa do oploditve lahko poteče le nekaj dni ali pa tudi več mesecev, kar pa je odvisno od posamezne vrste (preglednica 2). Proses oploditve se prične, ko na brazdi začne pelodno zrno (poliniji) kaliti. Ko pelodna cev s spermalnima celicama doseže plodnico, ki je podrasla, se ena spermalna celica združi z jajčno celico in tvorita zigoto, ki je prva celica sporofitne generacije. Druga spermalna celica po združitvi s polarним jedrom propade ali do združitve sploh ne opride (Moore in sod., 1998). Dozorelo seme sestavlja kalček in testa.

Preglednica 2: Čas potreben za oblikovanje plodu pri nekaterih orhidejah (Jevšnik, 2006)

Rod, vrsta	Čas (dnevi)
<i>Bletilla striata</i>	108
<i>Brassavola nodosa</i>	122
<i>Catlleya bowringiana</i>	265
<i>Cymbidium</i> sp.	245-550
<i>Dendrobium nobile</i>	290
<i>Dendrobium phalaenopsis</i>	165
<i>Epiendrum radicans, ibaguense</i>	51
<i>Paphiopedilum callosum</i>	333
<i>Phalaenopsis</i> sp.	90-124
<i>Pleione formosana</i>	170
<i>Vanda</i> sp.	270-300

2.5 DORMANCA SEMEN

Semena nekaterih rastlinskih vrst takoj po fiziološki zrelosti niso kaljiva, kljub temu, da so razmere v okolju primerne za kalitev. Seme pred kalitvijo potrebuje počitek ali dormanco. Dormanca semenom omogoča preživetje v neugodnih razmerah, podaljša pa tudi njihovo razširjanje. Vzroki in mehanizmi za dormanco so lahko različni. Izvirajo oziroma so povezani s kalčkom ali z endospermom, perikarpom in semensko lupino – testo. Testa lahko zaradi otrdelosti in voščene kutikule, predstavlja oviro za vstop vode in kisika v notranjost semena in do kalčka, kar zavira nabrakanje kalčka in dihanje. Testa lahko preprečuje izhod nastalim inhibitorjem, ki zavirajo razvoj in kalitev kalčka (Vodnik, 2012).

Dormanca povezana s kalčkom je v povezavi s prisotnostjo zaviralcev kalitve (abscizinsko kislino) in odsotnostjo pospeševalcev kalitve (giberlinov). Seme vzdržuje dormanco s sintezo abscizinske kisline. Prekinitev dormance pa je povezana s padcem razmerja med abscizinsko kisino in giberlini. Sprememba koncentracije teh dveh hormonov je povezana z anaboličnimi in kataboličnimi encimi, ki sodelujejo v njuni presnovi, regulirani pa so z razvojnimi procesi v semenu in okoljskimi dejavniki, med katerimi sta najpogostejša temperatura in svetloba. Dormanco semen, ki za kalitev potrebujejo izpostavitev mrazu, lahko prekinemo z namakanjem v raztopini giberelina. Pri rastlinah, ki imajo drobna semena z malo hranili, počitek prekinja svetloba, ustrezno razmerje med kratkovalovno in dolgovalovno rdečo svetlogo (Vodnik, 2012).

2.6 MIKORIZA

Mikoriza je simbioza (sožitje) med glivami in višjimi rastlinami. Tu gre za mutualizem, kar pomeni, da imata oba udeleženca simbioze korist. Do izmenjave hrani pride med glivnimi hifami in koreninami rastlin. Mikoriza je lahko endotrofna ali ektotrofna. Pri endotrofnih mikorizi hife gliv prodrejo v celico, kjer se vraščajo tako da se gostiteljeva plazmalema uviha. Pri ektomikorizi hife gliv ostajajo v apoplastu oz. intercelularno, obsežnejšo biomaso pa tvorijo na površini korenin. Gliva preskrbuje rastlino z vodo in rudninskimi snovmi (fosfor, dušik, kalij, kalcij, ...), rastnimi hormoni in nekaterimi vitaminimi. Rastline pa preskrbujejo glice z organskimi snovmi. Semena orhidej v naravi kalijo le če jih okužijo mikorizne glice iz rodov *Rhizoctonia*, *Tulasnella* in *Ceratobasidium* (Werner, 1992; Rasmussen, 1995; Smith in Read, 1997).

Kukavičevke (Orchidaceae) imajo razvito orhidejsko mikorizo. Semena kukavičevk so zelo majhna in nimajo oziroma imajo zelo malo sekundarnega endosperma, zato so za kalitev in razvoj potrebne simbiotske glive. Nujno je, da se pri kukavičevkah simbioza vzpostavi zelo hitro po nabrekanju kalčka oz. kalitvi semen, ko se pretrga testa. Po pojavu rizoidov jih hite gliv prerastejo in prodrejo v celice kalčka. Gliva z encimi razgrajuje organske snovi in jih pripravi v obliki dostopne kalčku. Z uporabo simbiotskih gliv lahko dosežemo uspešnejšo in hitrejšo kalitev semen orhidej *in vitro*. Gliva med razvojem preskrbuje z vsemi potrebnimi hranili kalček in kasneje tudi mlade rastline. Vse kar v naravi gliva preskrbi semenu in rastlini za normalno kalitev, rast in razvoj lahko v *in vitro* razmerah nadomestimo z dodatki v gojišče (Bohanec, 1992; Carlile in Watkinson, 1994; Sinkovič, 2000).

2.7 MIKROPROPAGACIJA

Mikropropagacija je temeljna tehnika tkivnih kultur in je tudi osnova vsem ostalim tehnikam. Mikropropagacija je vegetativno razmnoževanje oz. kloniranje rastlin v *in vitro* razmerah. Rastline razmnožujemo po postopku mikropropagacije ker (Bohanec, 1992):

- omogoča zelo hitro razmnoževanje rastlin,
- smiselno za rastline pri katerih je razmnoževanje *in vitro* ekonomsko učinkovitejše (okrasne rastline, orhideje, lesnate rastline, ...),
- gojenje zelo velikega števila rastlin v zelo majhnem prostoru,
- rastline lahko gojimo neglede na letni čas.

Danes se v raziskovalne in predvsem komercialne namene izkoriča mikropropagacija za gojenje orhidej, zaradi hitrejšega prehoda iz vegetativne v generativno fazo, stabilneg fenotipa, neodvisnosti od klimatskih razmer in možnosti natančnega planiranja proizvodnje.

Faze mikropropagacije orhidej z zasnovano semensko kulturo (asimbiotska kalitev):

- kolekcioniranje semen,
- vzpostavitev sterilne semenske kulture s površinskim razkuževnjem,
- nabrekanje kalčka oziroma kalitev,
- oblikovanje protokormov in rizoidov,
- razvoj listov in korenin, rast rastlin,
- aklimatizacija,
- avtotrofno gojenje.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 SEMENSKI MATERIAL

V poskus *in vitro* so bila vključena semena terestične orhideje *Bletilla striata*, ki so bila pobrana iz rastline, ki raste na prostem v Ljubljani. Zelene semenske glavice so bile pobrane konec avgusta 2010 in do poskusa 12.11.2010, ko smo opravili površinsko razkuževanje in inokulacijo na gojišče, shranjene pri sobni temperaturi. V poskusu smo imeli tudi zrele semenske glavice iste rastline pobrane konec septembra leta 2008 in do poskusa shranjene v hladilniku pri 4 °C.

3.2 METODE DELA

3.2.1 Površinsko razkuževanje rastlinskega materiala

Nezrele in zrele semenske glavice ter nezrela in zrela semena smo pred inokulacijo na gojišče površinsko razkužili z dikloroizocianurno kislino ($\text{C(O)NCl}_2\text{(C(O)NH)}$) (Sigma-Aldrich) z dodatkom nekaj kapljic močila Tween 20 (Sigma-Aldrich) v brezprašni komori. Komoro smo pred uporabo vsaj 10 do 15 minut prej prižgali, da je sterilni zrak nadomestil sobnega. Tako smo zagotovili sterilne pogoje dela. Tudi orodje, ki smo ga uporabljali v brezprašnih komorah smo sterilizirali v visokotemperaturnem grelcu pri 815 °C.

Nezrele in zrele semenske glavice smo razkuževali v sterilnih petrijevkah z 1,6 % dikloroizocianurno kislino z dodatkom nekaj kapljic močila Tween 20 (Sigma-Aldrich), 10 minut pri sobni temperaturi, nato smo jih 3 krat sprali s sterilno destilirano vodo.

Nezrela in zrela semena smo s spatulo prenesli v dve Eppendorf-ovi mikrocentrifugirki in v vsako dodali 0,8 ml 1,6 % razkuževalno raztopino z dikloroizocianurno kislino in močilom Tween 20 ter razkuževali 8 min pri sobni temperaturi, vmes smo jih večkrat pretresli. Nato smo postopek sterilizacije nadaljevali v centrifugi (Beckman J2-HS) pri 5000 obratih na minuto. Centrifugirali smo 2 minuti pri 4 °C. Po dveh minutah smo jih vzeli iz centrifuge in z mikropipeto odstranili razkuževalno raztopino. Nato smo dodali 0,8 ml destilirane in avtokavirane vode in polovico semen centrifugirali 2 minuti pri 4 °C in drugo polovico pri sobni temperaturi. Postopek spiranja smo ponovili še 2x.

V poskusu smo proučevali asimbiotsko kalitev zrelih semen iz leta 2008, ki smo jih do poskusa 2 leti hranili v hladilniku pri 4 °C in nezrelih semen iz leta 2010. Primerjali smo tudi kalitev semen iz razkužene semenske glavice, s semenami, ki smo jih direktno razkužili pri sobni temperaturi ter dodali postopek centrifugiranja pri sobni temperaturi in hladno centrifugiranje pri 4 °C.

Oznake obravnavanj:

- ZS 4 °C - nezrelo, zeleno seme centrifugirano pri 4 °C, pridelek 2010
- ZS sT - nezrelo, zeleno seme centrifugirano pri sobni temperaturi, pridelek 2010
- ZS RK - nezrelo, zeleno seme, razkuženo kot nezrela semenska glavica, pridelek 2010
- SS 4 °C - zrelo, staro seme centrifugirano pri 4 °C, pridelek 2008
- SS sT - zrelo, staro seme centrifugirano pri sobni temperaturi, pridelek 2008
- SS RK - zrelo, staro seme, razkuženo kot zrela semenska glavica, pridelek 2008

3.2 SESTAVA IN PRIPRAVA GOJIŠČA

Kalitveno gojišče z oznako A smo pripravili tako, da smo zatehtali kompleksno gojišče P1056 proizvajalca Sigma Aldrich in prelili z destilirano vodo ter stopili. Subkultivacijsko gojišče z oznako B smo pripravili tako, da smo zatehtali posebej mikroelemente MS gojišča (Murashige in Skoog, 1962) in posebej makroelemente gojišča B5 (Gamborg in sod., 1968) ter ostale sestavine povzete po Hinnen in sod. (1989), jih prelili z destilirano vodo, stopili, iz založnih raztopin dodali mikroelemente in organske snovi v sledovih. Sestavine smo dobro premešali s teflonskim magnetom na električnem mešalniku. Nato smo obe gojišči umerili na določen volumen in določili pH vrednost 5,4 z dodajenjem 1N KOH oz. 1N HCl. Potem smo dodali 2,6 g/l strjevalca Phytigel (preglednica 3). Phytigel smo stopili v mikrovalovni pečici s trikratnim segrevanjem do vretja in vmesnim mešanjem. Gojišče smo nato avtoklavirali 20 minut pri 121 °C in tlaku 1.1 bar. Avtoklavirano gojišče smo dobro pretresli in v brezprašni komori prelili v sterilne petrijevke velikosti 90 x 15 mm ali steklene kozarce s polipropilenskim pokrovom 55 x 75 mm in pustili, da se je gojišče strdilo. Med nalivanjem smo gojišče z oznako A še dodatno večkrat pretresli, da se oglje ni vsedlo.

Preglednica 3: Sestava gojišča za kalitev (A) in za subkultivacijo (B) orhideje *B. striata*

SESTAVINE	GOJIŠČE	
	A	B
MAKROELEMENTI (mg/l)		
KH ₂ PO ₄	85	
NH ₄ NO ₃	825	
KNO ₃	950	2500
CaCl ₂ x 2H ₂ O		150
CaCl ₂	166	
NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O		150
(NH ₄) ₂ SO ₄		135
MgSO ₄	90,35	
MgSO ₄ x 7H ₂ O		250
MIKROELEMENTI (mg/l)		
H ₃ BO ₄	3,1	2,6
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	5,3	8,6
MnSO ₄ x H ₂ O	8,45	
MnSO ₄ x 4H ₂ O		22,3
KJ	0,415	0,83
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,0125	0,25
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,0125	0,25
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,125	0,25
FeSO ₄ x 7H ₂ O	27,85	
Na ₂ Fe –EDTA	37,3	25
OGLJIKOV HIDRAT (g/l)		
Saharoza	20	25
ORGANSKE SNOVI IN VITAMINI (mg/l)		
Inozitol	100	
Pepton	2000	
Bananin prašek, 50 % maltodekstrin	30000	
Oglje	2000	
MES	1000	
Piridoksin – HCl	1	
Tiamin – HCl	10	
Nikotinska kislina	1	
STRJEVALEC (g/l)		
Phytigel	2,6	2,6
VREDNOST		
pH	5,4	5,4

3.3 INOKULACIJA SEMEN NA GOJIŠČE

Po razkuževanju semenskih glavic smo jih podolžno prerezali in semena potresli po gojišču.

Po razkuževanju semen smo jih z mikropipeto inokulirali na gojišče in dodali le toliko vode, da smo lahko seme z ukrivljeno (120°) sterilno stekleno palčko razporedili po gojišču.

Vsako obravnavje smo pripravili v štirih ponovitvah. Ponovitve so predstavljale posamezne petrijevke. Skupno je bilo nastavljenih 24 petrijevk.

Po končani inokulaciji smo petrijevke zaprli in prelepili s parafilmom, s tem smo preprečili sekundarne okužbe ter izhlapevanje.

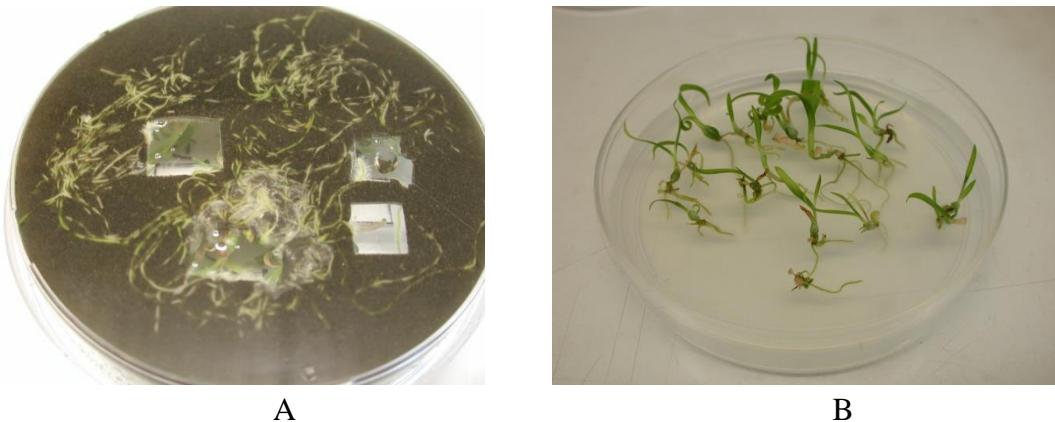
Na vsakem pokrovu petrijevke smo naključno označili 4 kvadrate s stranicami 1 cm in jih označili z A, B, C in D (slika 6). Tako smo si omejili število semen za nadaljnja bonitiranja rastlin.



Slika 6: Označene petrijevke s štirimi kvadrati znotraj katerih so bila opravljena bonitiranja

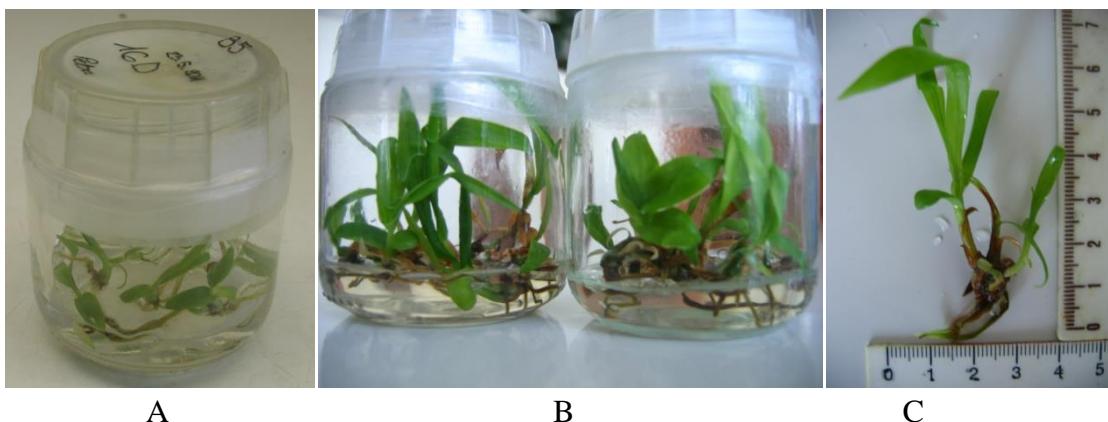
3.4 SUBKULTIVACIJA

Subkultivacijo na gojišče B smo opravili 109 dni (1.3.2010) po inokulaciji semen na gojišče A, ko so rastline imele vsaj 2 lista. V vsaki skupini obravnavanj smo izbrali eno petrijevko ter subkultivirali samo rastline iz posameznih kvadratkov. Rastline iz posameznega kvadrata smo prestavili na gojišče ene petrijevke velikosti 90×20 mm. Kvadratke smo iz gojišča A izrezali s skalpelom ter cel skupek gojišča ter rastlin prestavili na sterilen pladenj. S pomočjo pincete in skalpela smo rastline med seboj ločili in očistili z njih ostanke gojišča A in jih inokulirali na gojišče B (slika 7).



Slika 7: Gojenje orhideje *Bletilla striata*: A – na kalitvenem gojišču A; B – na subkultivacijskem gojišču B

Drugo subkultivacijo smo opravili 193 dni po inokulaciji semena na gojišče A oziroma 84 dni po prvi subkultivaciji na gojišče B. Takrat so se rastline že razraščale. Prestavili smo jih v steklene kozarce velikosti 55 x 75 mm s polipropilenskim pokrovom (slika 8)



Slika 8: Gojenje orhideje *Bletilla striata*: A – druga subkultivacija; B – razraščanje v steklenih kozarcih; C – primerna za aklimatizacijo (Kreft P.)

3.5 GOJENJE

Seme in rastline smo gojili v rastnih komorah LO 650 proizvajalca Inštitut Zoran Rant pri temperaturi 24 ± 1 °C in fotoperiodi 16/8 ur (svetloba/tema) ter intenziteti svetlobe $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

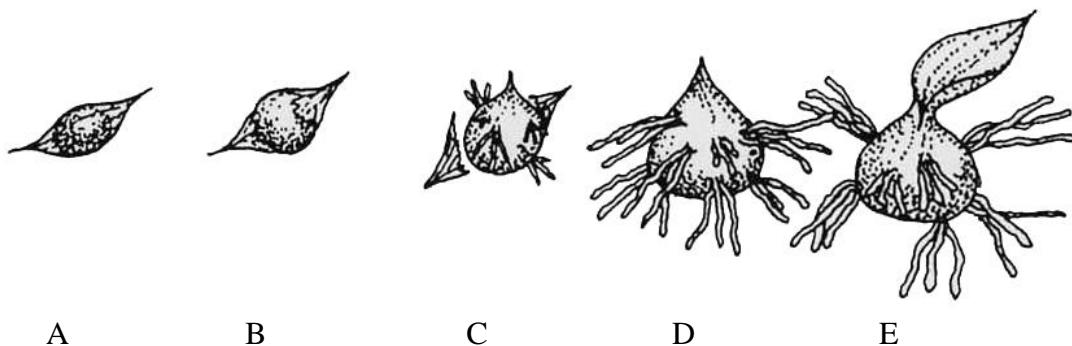
3.6 BONITIRANJE

Od inokulacije semen 12.11.2010 pa do 23.5.2011 smo opravili 6 bonitiranj. Bonitirali smo le v zarisanih kvadratih s stereomikroskopom pri 20 kratni povečavi. Znotraj te površine smo prešteli prazna semena in semena s kalčki ter nastale rastline. Spremljali smo

nabrekanje kalčka oziroma kalitev, razvoj protokormov, rizoidov, listov, korenin, bulbulusov in razraščanje, kot je prikazano na sliki 9 in opisano v nadaljevanju: morfološke faze na kalitvenem gojišču A in na subkultivacijskem gojišču B. Z zbranih podatkov smo izračunali povprečja in odstotke ter jih prikazali v preglednicah in grafih. Na gojišču A smo bonitirali 3 krat, prvič 11 dni po inokulaciji semena na gojišče, drugič 19 dni po inokulaciji in tretjič 32 dni po inokulaciji.

Morfološke faze na kalitvenem gojišču A:

- nekaljivo seme,
- nabreklo seme,
- protokorm,
- protokorm z rizoidi,
- protokorm z listom,
- 2 lista in korenina.



Slika 9: Morfološke faze od kalitve in do razvoja prvega lista: A – nabrekanje, povečanje kalčka; B – razvoj protokorma; C – sprostitev protokorma iz teste in pojav rizoidov; D – povečani protokorm z rizoidi; E – protokorm z listom (An assessment ..., 2005)

Rastline smo 01.03.2011 subkultivirali oz. prestavili na gojišče B v petrijevke in 20.5.2011 na enako gojišče v steklene kozarce. Bonitirali smo 3 krat, 20, 44 in 83 dni po 1. subkultivaciji na gojišče B.

Morfološke faze na subkultivacijskem gojišču B:

- 2 do 3 listi,
- 2 do 5 listov in 1 korenina,
- 2 do 5 listov in 2 korenini,
- 3 do 5 listov in 3 do 4 korenine,
- 3 do 5 listov in 3 do 4 korenine z bulbulusi,
- 6 listov in 3 do 4 korenine z bulbulusi,
- 6 listov in 5 do 6 korenin z bulbulusi,
- razraščanje.

4 REZULTATI

4.1 ASIMBIOTSKA KALITEV NA GOJIŠČU A

Po inokulaciji semena *Bletilla striata* na gojišče A smo spremljali kalitev ter rast in razvoj kalčka in morfološke faze po kalitvi. Pri prvem bonitiranju, 11 dni po inokulaciji semen na gojišče, smo prešteli prazna semena brez kalčka in jih izločili iz poskusa oz. jih nismo upoštevali pri nadaljnjih bonitiranjih.

Pri nezrelem semenu iz leta 2010 je bilo brez kalčka 33 % semen, ki so bila direktno razkužena in s pipeto inokulirana na gojišče. Pri semenih, ki so bila direktno posuta na gojišče iz razkužene nezrele semenske glavice je bilo 25,3 % semen brez kalčka. V letu 2010 je bilo v povprečju 29,1% semen brez kalčka.

Pri zrelem semenu iz leta 2008 je bilo brez kalčka 28,5 % semen, ki so bila direktno razkužena in s pipeto inokulirana na gojišče. Pri semenih, ki so bila direktno posuta na gojišče iz razkužene zrele semenske glavice je bilo 24,8 % semen brez kalčka. V letu 2008 je bilo v povprečju 26,6 % semen brez kalčka.

Poskus z vsemi obravnavanji je zajemal 1436 semen, od tega je bilo 400 oz. 27,9 % praznih brez kalčka, ostalih 1036 semen je vsebovalo kalček in s tem možnost za asimbiotsko kalitev.

4.1.1 Prvo bonitiranje: 11 dni po inokulaciji semen na gojišče A

11 dni po inokulaciji semen na gojišče A je večina semen kalila in vidni sta bili že morfološki fazi, protokorm in protokorm z rizoidi (slika 9). Pri obravnavanjih nezrelo in zrelo seme iz razkužene semenske glavice (ZS RK in SS RK) so v tem obdobju že vsa semena kalila, pri ostalih štirih obravnavanjih, razkuženo nezrelo in zrelo seme centrifugirano pri 4 °C in sobni temperaturi (ZS sT, ZS 4 °C, SS 4 °C in SS sT) je ostalo še od 0,4 do 2,3 % nekaljivih semen (preglednica 4, slika 10).

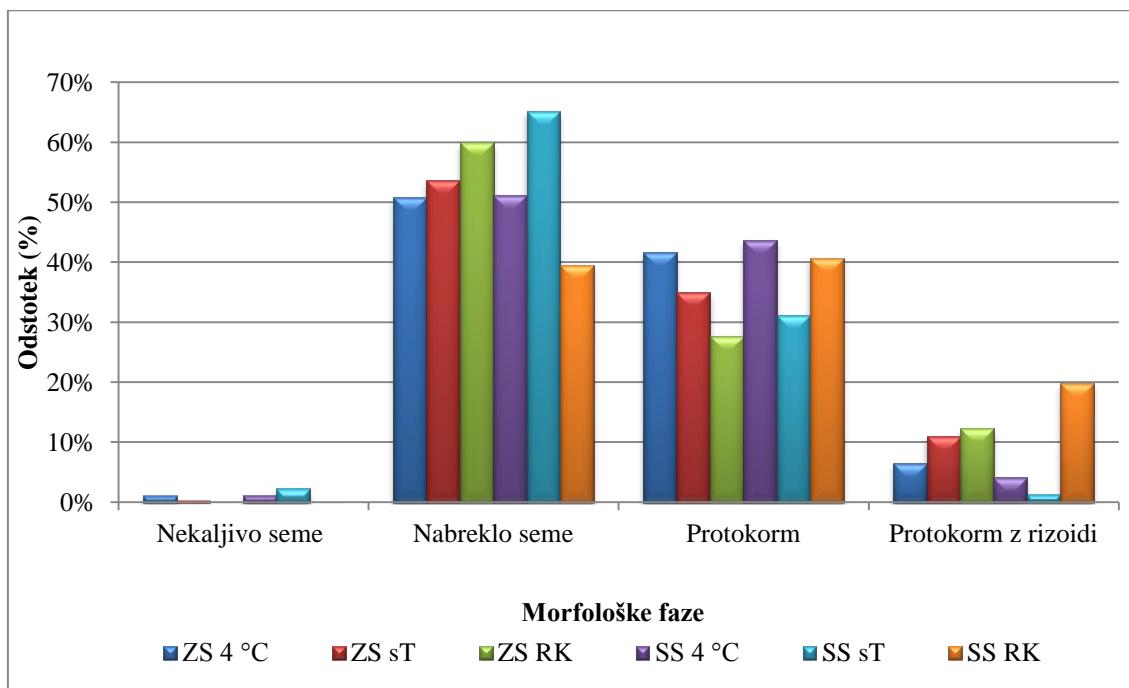
V tem obdobju je bilo največ semen v morfoloških fazah, nabreklo seme in protokorm. V fazi nabreklo seme je bilo najmanj 39,6 % zrelih semen iz razkužene semenske glavice (SS RK) in največ 65,2 % zrelih semen centrifugiranih pri sobni temperaturi (SS sT). V morfološki fazi, protokorm je bilo najmanj 27,7 % nezrelih semen iz razkužene semenske glavice (ZS RK) in največ 43,6 % zrelih semen centrifugiranih pri 4 °C (SS 4 °C). Pojavljati se je začela naslednja morfološka faza, protokormov z rizoidi, ki je bila najštevilčnejša z 19,8 % pri zrelem semenu in 12,1 % pri nezrelem semenu iz razkužene semenske glavice (SS RK in ZS RK). Pri ostalih obravnavanjih je bilo manj kot 11 % protokormov z rizoidi (preglednica 4, slika 10).

Preglednica 4: Število nekaljivih in nabreklih semen, protokormov ter protokormov z rizoidi 11 dni po inokulaciji semen *Bletilla striata* na gojišče A

Morfološke faze	Število					
	ZS 4 °C	ZS sT	ZS RK	SS 4 °C	SS sT	SS RK
Nekaljivo seme	2	1	0	2	5	0
Nabreklo seme	94	146	39	88	144	36
Protokorm	77	95	18	75	69	37
Protokorm z rizoidi	12	30	8	7	3	18

Legenda:

ZS 4 °C - nezrelo, zeleno seme centrifugirano pri 4 °C, pridelek 2010; ZS sT - nezrelo, zeleno seme centrifugirano pri sobni temperaturi, pridelek 2010; ZS RK - nezrelo, zeleno seme, razkuženo kot nezrela semenska glavica, pridelek 2010; SS 4 °C - zrelo, staro seme centrifugirano pri 4 °C, pridelek 2008; SS sT - zrelo, staro seme centrifugirano pri sobni temperaturi, pridelek 2008; SS RK - zrelo, staro seme, razkuženo kot zrela semenska glavica, pridelek 2008



Slika 10: Odstotek nekaljivih in nabreklih semen, protokormov ter protokormov z rizoidi 11 dni po inokulaciji semen *Bletilla striata* na gojišče A

4.1.2 Drugo bonitiranje: 19 dni po inokulaciji semen na gojišče A

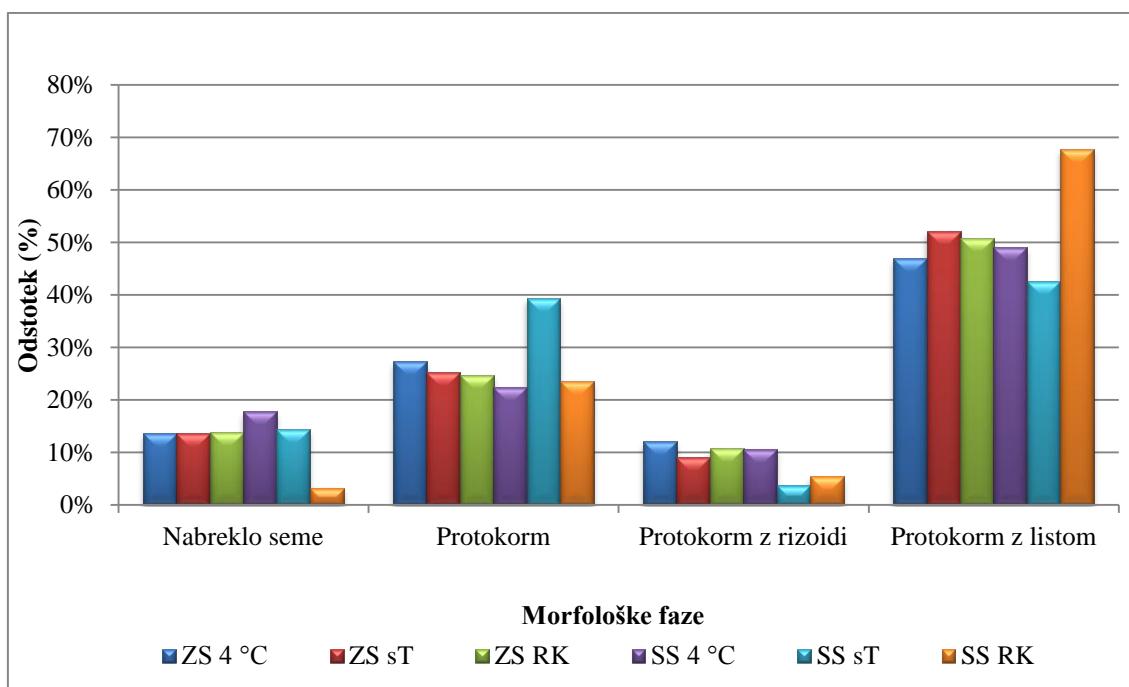
V primerjavi s prvim bonitiranjem je 19 dni po inokulaciji semen na gojišče A, odstotek nabreklih semen bistveno padel, saj je večina semen že prešla v morfološko fazo, protokorm z listom (slika 9). Morfološki fazi, nabreklo seme in protokorm z rizoidi sta bili zastopani v manjšem odstotku.

Preglednica 5: Število nabreklih semen, protokormov, protokormov z rizoidi in protokormov z listom 19 dni po inokulaciji semen *Bletilla striata* na gojišče A

Morfološke faze	Število					
	ZS 4 °C	ZS sT	ZS RK	SS 4 °C	SS sT	SS RK
Nabreklo seme	25	36	9	30	31	3
Protokorm	50	67	16	38	85	22
Protokorm z rizoidi	22	24	7	18	8	5
Protokorm z listom	86	138	33	83	92	63

Legenda (za preglednico 5 in sliko 11):

ZS 4 °C - nezrelo, zeleno seme centrifugirano pri 4 °C, pridelek 2010; ZS sT - nezrelo, zeleno seme centrifugirano pri sobni temperaturi, pridelek 2010; ZS RK - nezrelo, zeleno seme, razkuženo kot nezrela semenska glavica, pridelek 2010; SS 4 °C - zrelo, staro seme centrifugirano pri 4 °C, pridelek 2008; SS sT - zrelo, staro seme centrifugirano pri sobni temperaturi, pridelek 2008; SS RK - zrelo, staro seme, razkuženo kot zrela semenska glavica, pridelek 200



Slika 11: Odstotek nabreklih semen, protokormov, protokormov z rizoidi in protokormov z listom 19 dni po inokulaciji semen *Bletilla striata* na gojišče A

V morfološki fazi, protokorm z listom je bilo 42,6 % zrelih semen centrifugiranih pri sobni temperaturi (SS ST) in 67,7 % zrelih semen iz razkužene semenske glavice (SS RK). V morfološki fazi, protokorm je bilo 22,5 % zrelih semen centrifugiranih pri 4 °C (SS 4 °C) in 39,4 % zrelih semen centrifugiranih pri sobni temperaturi (SS sT). Pri morfološki fazi, nabreklo seme ni bilo velikih odstopanj (od 13,6 do 14,4 %) pri vseh treh obravnavanih nezrelega semena (ZS) in pri zrelem semenu centrifugiranem pri sobni temperaturi (SS sT). Večje odstopanje s 17,8 % je bilo pri zrelem semenu centrifugiranem pri 4 °C (SS 4

°C) in manjše odstopanje z 3,2 % je bilo pri zrelem semenu iz razkužene semenske glavice (SS RK). Delež morfološke faze, protokorm z rizoidi je bil od 5,4 do 12 % in zelo podoben morfološki fazji, nabreklo seme (preglednica 5, slika 11).

4.1.3 Tretje bonitiranje: 32 dni po inokulaciji semen na gojišče A

V obdobju 32 dni po inokulaciji semen na gojišče A je bila najbolj zastopana morfološka faza, protokorm z listom pri vseh obravnavanjih. Predhodne morfološke faze so bile prisotne v manjših odstotkih (slika 9 in 12).

Morfološka faza, protokorm z listom je bila zelo izenačena od 84,5 do 88,1 % pri petih obravnavanjih (SS sT, ZS sT, ZS 4 °C, SS RK in SS 4 °C). Najmanj 74,3 % protokormov z listom je bilo pri nezrelem semenu iz razkužene semenske glavice (ZS RK). V oddobju, 32 dni po inokulaciji semen na gojišče A, se je pojavila z 0,4 % naslednja morfološka faza, 2 lista in korenina pri nezrelem semenu centrifugiranem pri sobni temperaturi (ZS sT) (preglednica 6, slika 12).

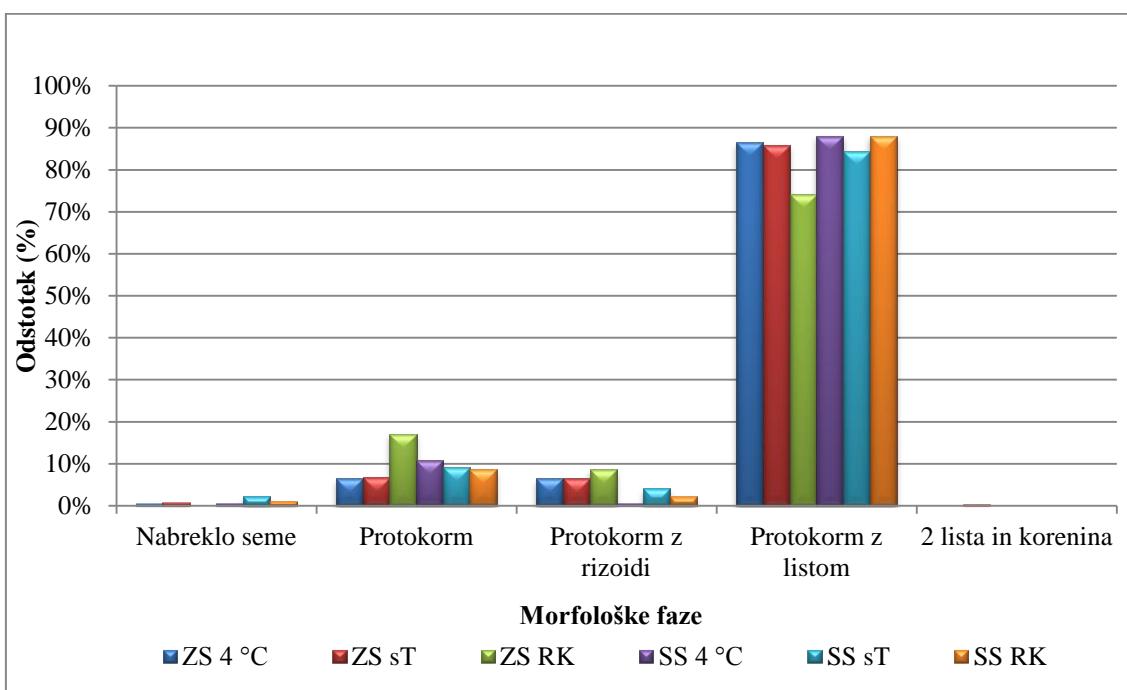
Ne glede na obravnavanje, če izpostavimo samo razlike v morfoloških fazah pri nezrelem in zrelem semenu na gojišču A, ni bilo bistvenih razlik v zastopanosti morfoloških faz od kalitve do pojava dveh listov in korenine. Nasprotno lahko trdimo, da ni bilo razlik v posameznih morfoloških fazah med nezrelim in zrelim semenom (preglednica 7).

Preglednica 6: Število nabreklih semen, protokormov, protokormov z rizoidi, protokormov z listom ter 2 lista in korenina 32 dni po inokulaciji semen *Bletilla striata* na gojišče A

Morfološke faze	Število					
	ZS 4 °C	ZS sT	ZS RK	SS 4 °C	SS sT	SS RK
Nabreklo seme	1	2	0	1	5	1
Protokorm	12	18	12	19	20	8
Protokorm z rizoidi	12	17	6	1	9	2
Protokorm z listom	160	227	52	155	183	81
2 lista in korenina	0	1	0	0	0	0

Legenda:

ZS 4 °C - nezrelo, zeleno seme centrifugirano pri 4 °C, pridelek 2010; ZS sT - nezrelo, zeleno seme centrifugirano pri sobni temperaturi, pridelek 2010; ZS RK - nezrelo, zeleno seme, razkuženo kot nezrela semenska glavica, pridelek 2010; SS 4 °C - zrelo, staro seme centrifugirano pri 4 °C, pridelek 2008; SS sT - zrelo, staro seme centrifugirano pri sobni temperaturi, pridelek 2008; SS RK - zrelo, staro seme, razkuženo kot zrela semenska glavica, pridelek 2008



Legenda:

ZS 4 °C - nezrelo, zeleno seme centrifugirano pri 4 °C, pridelek 2010; ZS sT - nezrelo, zeleno seme centrifugirano pri sobni temperaturi, pridelek 2010; ZS RK - nezrelo, zeleno seme, razkuženo kot nezrela semenska glavica, pridelek 2010; SS 4 °C - zrelo, staro seme centrifugirano pri 4 °C, pridelek 2008; SS sT - zrelo, staro seme centrifugirano pri sobni temperaturi, pridelek 2008; SS RK - zrelo, staro seme, razkuženo kot zrela semenska glavica, pridelek 2008

Slika 12: Odstotek nabreklih semen, protokormov, protokormov z rizoidi, protokormov z listom ter 2 lista in korenina 32 dni po inokulaciji semen *Bletilla striata* na gojišče A:

Preglednica 7: Odstotek morfoloških faz pri nezrelem in zrelem semenu 11, 19 in 32 dni po inokulaciji semen *Bletilla striata* na gojišče A

Morfološke faze	ZS 2010			SS 2008		
	11 dni	19 dni	32 dni	11 dni	19 dni	32 dni
Nekaljivo seme	0,6	0,0	0,0	1,4	0,0	0,0
Nabreklo seme	53,4	13,6	0,6	55,4	13,4	1,4
Protokorm	36,4	25,9	8,1	37,4	30,3	9,7
Protokorm z rizoidi	9,6	10,3	6,7	5,8	6,5	2,5
Protokorm z listom	0,0	50,1	84,4	0,0	49,8	86,4
2 lista in korenina	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0

4.2 SUBKULTIVACIJA NA GOJIŠČE B

Rastline smo po 109 dneh z gojišča A prestavili na gojišče B. Vse rastline so že imele vsaj 2 lista, večina pa že tudi eno ali dve korenini (slika 7).

4.2.1 Četrto bonitiranje: 20 dni po inokulaciji rastlin na gojišče B

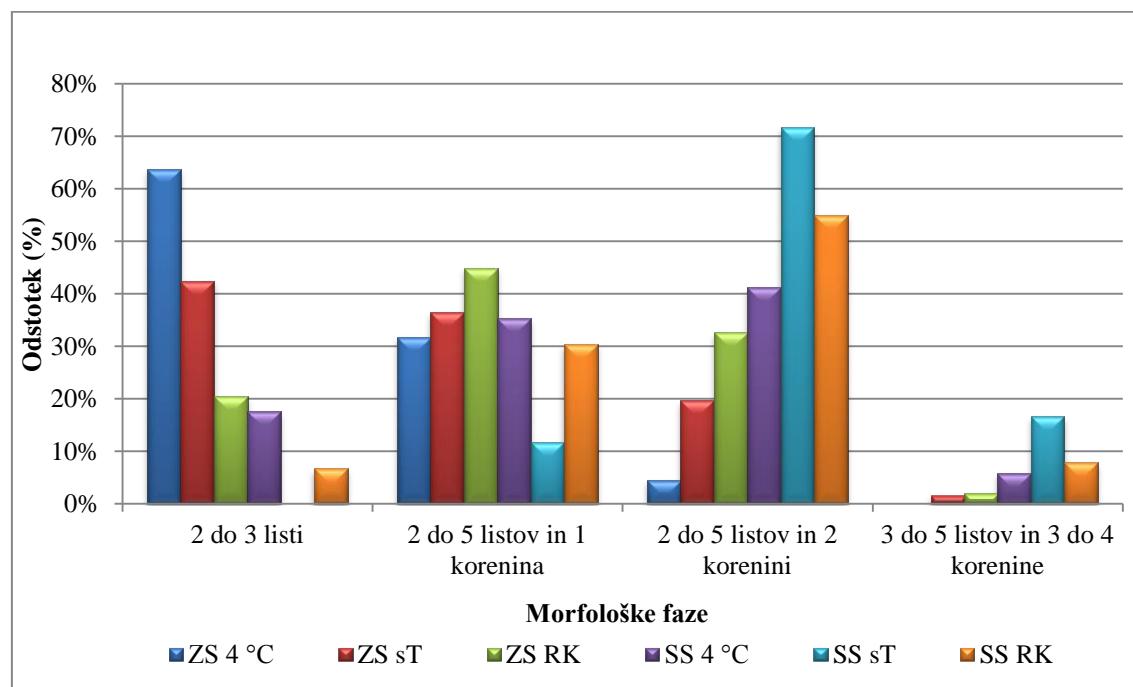
20 dni po subkultivaciji rastlin na gojišče B je imela večina rastlin več kot 2 lista in 1 korenino (slika 7B). V tem obdobju so bile prisotne 3 morfološke faze: 2 do 3 listi, 2 do 5 listov in 1 korenina ter 2 do 5 listov in 2 korenini ter začela se je pojavljati morfološka faza, 3 do 5 lisov in 3 do 4 korenine. Variabilnost znotraj posamezne morfološke faze, razen četrte, je bila zelo očitna med obravnavanji (preglednica 8, slika 13).

Preglednica 8: Število rastlin *Bletilla striata* z listi in koreninami v različnih morfoloških fazah 20 dni po subkultivaciji na gojišče B

Morfološke faze	Število					
	ZS 4 °C	ZS sT	ZS RK	SS 4 °C	SS sT	SS RK
2 do 3 listi	28	28	10	9	0	6
2 do 5 listov in 1 korenina	14	24	22	18	7	27
2 do 5 listov in 2 korenini	2	13	16	21	43	49
3 do 5 listov in 3 do 4 korenine	0	1	1	3	10	7

Legenda:

ZS 4 °C - nezrelo, zeleno seme centrifugirano pri 4 °C, pridelek 2010; ZS sT - nezrelo, zeleno seme centrifugirano pri sobni temperaturi, pridelek 2010; ZS RK - nezrelo, zeleno seme, razkuženo kot nezrela semenska glavica, pridelek 2010; SS 4 °C - zrelo, staro seme centrifugirano pri 4 °C, pridelek 2008; SS sT - zrelo, staro seme centrifugirano pri sobni temperaturi, pridelek 2008; SS RK - zrelo, staro seme, razkuženo kot zrela semenska glavica, pridelek 2008



Slika 13: Odstotek rastlin *Bletilla striata* z listi in koreninami v različnih morfoloških fazah 20 dni po subkultivaciji na gojišče B

Delež rastlin v morfološki fazi, 2 do 3 listi je bil od 0 do 63,6 % in večina rastlin je imela že korenino oz. korenine. Vse rastline nastale iz zrelega semena centrifugiranega pri sobni temperaturi (SS sT) so imele že korenino oz. korenine. Pri ostalih obravnavanjih zrelega semena, razkužena semenska glavica (SS RK) je bilo 6,7 % rastlin brez korenin in 17,4 % rastlin ni imelo korenine, ki so nastale iz semen centrifugiranega pri 4 °C (SS 4 °C). Delež naslednje morfološke faze, 2 do 5 listov in korenina je bil 11,7 % pri rastlinah nastalih iz zrelega semena centrifugiranega pri sobni temperaturi (SS sT) in 44,9 % pri rastlinah nastalih iz zrelega semena razkužena semenska glavica (SS RK). Morfološka faza, 2 do 5 listov in 2 korenini je bila prisotna pri 4,6 % rastlin nastalih iz nezrelih semen centrifugiranih pri 4 °C (ZS 4 °C) in pri 71,7 %, rastlin nastlih iz zrelih semen centrifugiranih pri sobni temperaturi (SS sT). Prav tako je bilo največ 16,7 % rastlin nastalih iz zrelega semena centrifugiranih pri sobni temperaturi (SS sT) v naslednji morfološki fazi, 3 do 5 listov in 3 do 4 korenine (preglednica 8, slika 13).

4.2.2 Peto bonitiranje: 44 dni po subkultivaciji rastlin na gojišče B

Značilno za peto bonitiranje, ko so bile rastline na gojišču B že 44 dni je bilo, da je imela večina že 3 do 5 listov in 3 do 4 korenine ter začele so tvoriti odebeltive - bulbuluse in se razraščati (preglednica 9, slika 8 in 14).

Preglednica 9: Število rastlin *Bletilla striata* z listi in koreninami, bulbulusi ter razraščanjem v različnih morfoloških fazah 44 dni po subkultivaciji na gojišče B

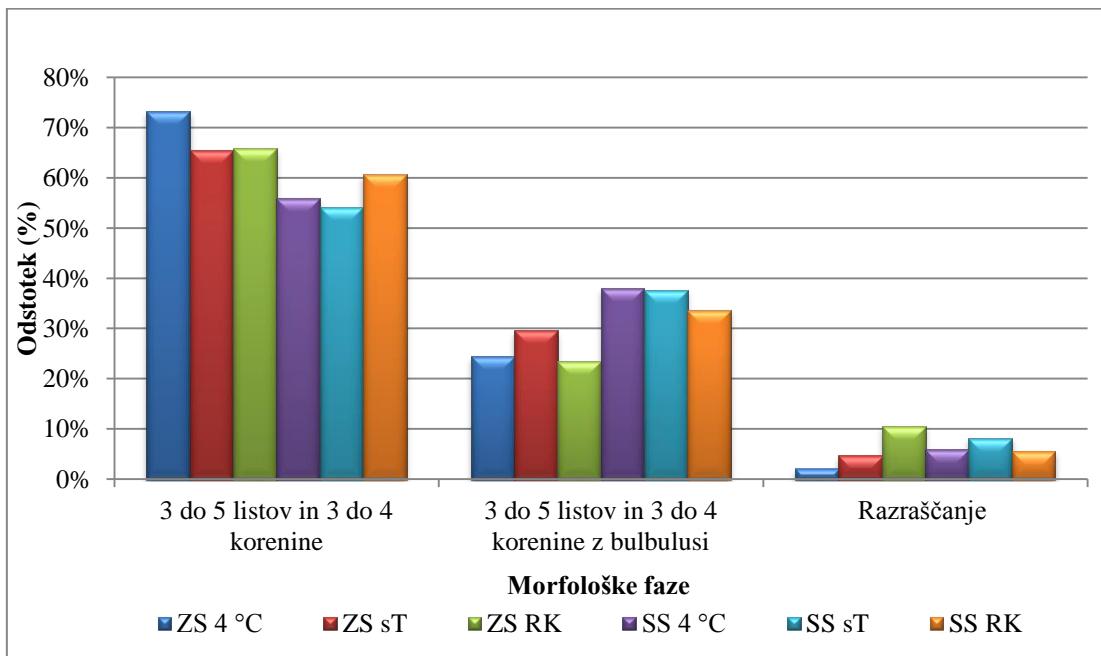
Morfološke faze	Število					
	ZS 4 °C	ZS sT	ZS RK	SS 4 °C	SS sT	SS RK
3 do 5 listov in 3 do 4 korenine	33	42	31	28	33	54
3 do 5 listov in 3 do 4 korenine z bulbulusi	11	19	11	19	23	30
Razraščanje	1	3	5	3	5	5

Legenda (za preglednico 9 in sliko 14):

ZS 4 °C - nezrelo, zeleno seme centrifugirano pri 4 °C, pridelek 2010; ZS sT - nezrelo, zeleno seme centrifugirano pri sobni temperaturi, pridelek 2010; ZS RK - nezrelo, zeleno seme, razkuženo kot nezrela semenska glavica, pridelek 2010; SS 4 °C - zrelo, staro seme centrifugirano pri 4 °C, pridelek 2008; SS sT - zrelo, staro seme centrifugirano pri sobni temperaturi, pridelek 2008; SS RK - zrelo, staro seme, razkuženo kot zrela semenska glavica, pridelek 2008

Najbolj je bila zastopana morfološka faza, 3 do 5 listov in 3 do 4 korenine. V tej morfološki fazi je bilo najmanj 54,1 % rastlin nastalih iz zrelega semena centrifugiranega pri sobni temperaturi (SS sT) in največji 73,3 % pri rastlinah nastalih iz nezrelega semena centrifugiranega pri 4 °C (ZS 4 °C). V naslednji morfološki fazi, 3 do 5 listov in 3 do 4 korenine z bulbulusi je bilo najmanj 23,4 % rastlin nastalih iz nezrelega semena iz

razkužene semenske glavice (ZS RK) in največ 38 % rastlin nastalih iz zrelega semena centrifugiranega pri 4 °C (SS 4 °C). V tem obdobju se je pojavila morfološka faza razraščanje. Najmanj samo 2,2 % rastlin se je razraščalo, nastalih iz nezrelega semena centrifugiranega pri 4 °C (ZS 4 °C) in največ 10,6 % rastlin prav tako nastalih iz nezrelega semena iz razkužene semenske glavice (preglednica 9, slika 8 in 14).



Legenda:

ZS 4 °C - nezrelo, zeleno seme centrifugirano pri 4 °C, pridelek 2010; ZS sT - nezrelo, zeleno seme centrifugirano pri sobni temperaturi, pridelek 2010; ZS RK - nezrelo, zeleno seme, razkuženo kot nezrela semenska glavica, pridelek 2010; SS 4 °C - zrelo, staro seme centrifugirano pri 4 °C, pridelek 2008; SS sT - zrelo, staro seme centrifugirano pri sobni temperaturi, pridelek 2008; SS RK - zrelo, staro seme, razkuženo kot zrela semenska glavica, pridelek 2008

Slika 14: Odstotek rastlin *Bletilla striata* z listi in koreninami, bulbulusi ter razraščanjem v različnih morfoloških fazah 44 dni po subkultivaciji na gojišče B

4.2.3 Šesto bonitiranje: 83 dni po subkultivaciji rastlin na gojišče B

V zadnjem obdobju spremjanja, ko so bile rastline na subkultivacijskem gojišču že 83 dni, so imele že vse odebilitve oz. bulbuluse. Nekatere so pridobile še list oz. liste in prav tako korenine ter faza razraščanja je bila v porastu (preglednica 10, slika 15).

V morfološki fazi, 3 do 5 listov in 3 do 4 korenine z bulbulusi je bilo najmanj 35,6 % rastlin nastalih iz nezrelih semen iz razkužene semenske glavice (ZS RK) in največ 70,8 % nastalih iz nezrelih semen centrifugiranih pri sobni temperaturi (ZS sT). V naslednji morfološki fazi, 6 listov in 3 do 4 korenine z bulbulusi je bilo najmanj 15,4 % rastlin nastalih iz nezrelega semena centrifugiranega pri sobni temperaturi (ZS sT) in največ 46,7 % nastalih prav tako iz nezrelega semena iz razkužene semenske glavice. Najmanj

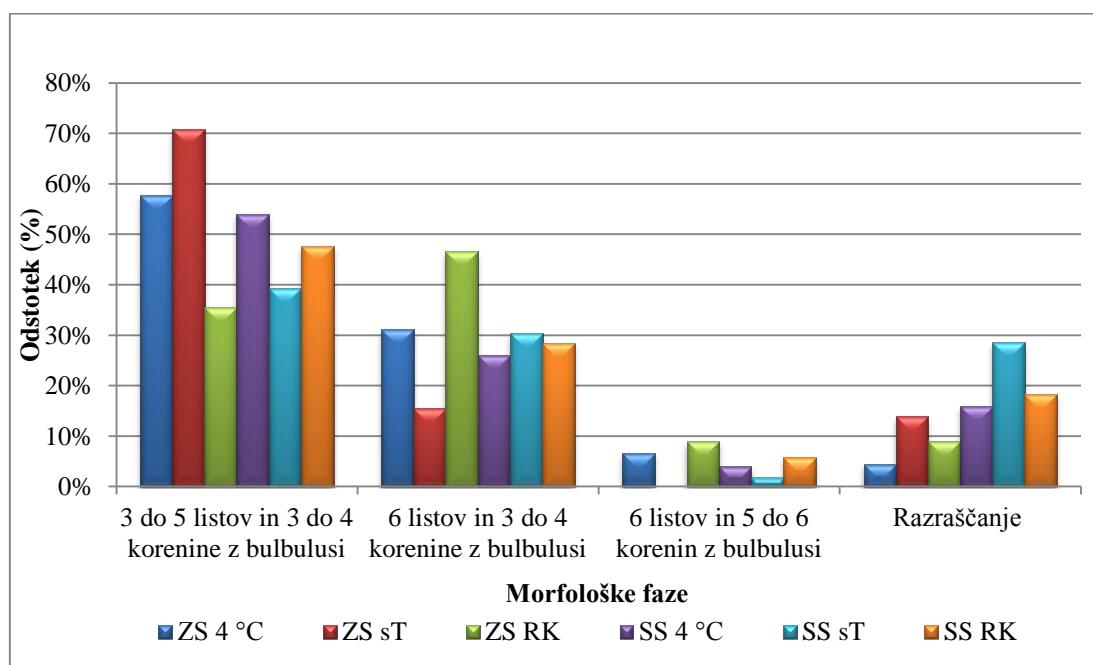
zastopana je bila morfološka faza, 6 listov in 5 do 6 korenin z bulbulusi. V tej fazi je bilo največ 8,9 % rastlin nastalih iz nezrelega semena iz razkužene semenske glavice (ZS RK). V morfološki fazah, razraščanje je bilo najmanj 4,4 % rastlin nastalih iz nezrelega semena centrifugiranega pri 4 °C (ZS 4 °C) in največ 28,6 % nastalih iz zrelega semena centrifugiranega pri sobni temperaturi (preglednica 10, slika 8 in 15).

Preglednica 10: Število rastlin *Bletilla striata* z listi in koreninami, bulbulusi ter razraščanjem v različnih morfoloških fazah 83 dni po subkultivaciji na gojišče B

Morfološke faze	Število					
	ZS 4 °C	ZS sT	ZS RK	SS 4 °C	SS sT	SS RK
3 do 5 listov in 3 do 4 korenine z bulbulusi	26	46	16	27	22	42
6 listov in 3 do 4 korenine z bulbulusi	14	10	21	13	17	25
6 listov in 5 do 6 korenin z bulbulusi	3	0	4	2	1	5
Razraščanje	2	9	4	8	16	16

Legenda:

ZS 4 °C - nezrelo, zeleno seme centrifugirano pri 4 °C, pridelek 2010; ZS sT - nezrelo, zeleno seme centrifugirano pri sobni temperaturi, pridelek 2010; ZS RK - nezrelo, zeleno seme, razkuženo kot nezrela semenska glavica, pridelek 2010; SS 4 °C - zrelo, staro seme centrifugirano pri 4 °C, pridelek 2008; SS sT - zrelo, staro seme centrifugirano pri sobni temperaturi, pridelek 2008; SS RK - zrelo, staro seme, razkuženo kot zrela semenska glavica, pridelek 2008



Slika 15: Odstoki rastlin *Bletilla striata* z listi in koreninami, bulbulusi ter razraščanjem v različnih morfoloških fazah 83 dni po subkultivaciji na gojišče B

Preglednica 11: Odstotek morfoloških faz pri nezrelem in zrelem semenu 20, 44 in 83 dni po subkultivaciji rastlin *Bletilla striata* na gojišče B

Morfološke faze	ZS 2010			SS 2008		
	20 dni	44 dni	83 dni	20 dni	44 dni	83 dni
2 do 3 listi	41,5	0,0	0,0	7,5	0,0	0,0
2 do 5 listov in 1 korenina	37,7	0,0	0,0	26,0	0,0	0,0
2 do 5 listov in 2 korenini	19,5	0,0	0,0	56,5	0,0	0,0
3 do 5 listov in 3 do 4 korenine	1,3	67,9	0,0	10,0	57,5	0,0
3 do 5 listov in 3 do 4 korenine z bulbulusi	0,0	26,3	56,8	0,0	36,0	46,9
6 listov in 3 do 4 korenine z bulbulusi	0,0	0,0	29,0	0,0	0,0	28,4
6 listov in 5 do 6 korenin z bulbulusi	0,0	0,0	4,5	0,0	0,0	4,1
Razraščanje	0,0	5,8	9,7	0,0	6,5	20,6

V povprečju, če upoštevamo samo zrelost semen, je bilo rastlin v nižjih morfoloških fazah, 2 do 3 listi ter 2 do 5 listov in 1 korenina nastalih iz zrelih semen manj kot pri nezrelem semenu, ker so že prešle v višje morfološke faze. V naslednji morfološki fazi, 2 do 5 listov in 2 korenini je bilo več rastlin nastalih iz zrelega semena in manj nastalih iz nezrelega semen. V naslednjih petih morfoloških fazah, 3 do 5 listov in 3 do 4 korenine, 3 do 5 listov in 3 do 4 korenine z bulbulusi, 6 listov in 3 do 4 korenine z bulbulusi ter 6 listov in 5 do 6 korenin z bulbulusi je bil odstotek rastlin nastalih iz nezrelega in zrelega semena zelo izenačen. Rastlin v fazi razraščanja je bilo več (9 %), ki so nastale iz zrelega semena in manj (5,2 %) nastalih iz nezrelega semena (preglednica 11).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V poskus *in vitro* so bila vključena nezrela (ZS) in zrela (SS) semena terestične orhideje *Bletilla striata*, ki raste na prostem. Nezrele (zelene) semenske glavice so bile pobrane konec avgusta 2010 in do poskusa 12.11.2010 hranjene pri sobni temperaturi. Zrele semenske glavice so bile pobrane konec septembra 2008 in do poskusa hrnjene pri 4 °C. Pri teh smo predvidevali, da so imela semena že prekinjeno dormanco in otrdelo testo. Nezrela oz. zelena semena še niso prešla v dormanco, tako da stratifikacija ni bila potrebna in testa še ni otrdela. Arditti (1992) navaja, da je zunanja plast teste pri orhidejah slabo prepustna za vodo. Poleg dormance je otrdelost teste zrelih semen največji problem *in vitro* kalitve, zato smo jo poskušali s hladnim centrifugiranjem pri 4 °C razrahljati ter tako omogočili dostopnost vode do kalčka in povečati kaljivost semen (Cribb, 1977).

Semena iz razkuženih semenskih glavic smo direktno potresli po gojišču in so nam služila kot kontrola.

5.1.1 Prazna semena

Seme orhidej je sestavljeni iz kalčka in prosojne teste ter vmes je prazen prostor. Pri bonitiranju semen s stereomikroskopom smo opazili tudi prazna semena. Prazna semena so brez kalčka, tako da seme sestavlja samo testa in prazen prostor. V letu 2008 je bilo 26,6 % semen brez kalčka, v letu 2010 pa 29,1%, v povprečju 27,9 %, kar ni malo, saj je bila skoraj četrtina do tretjina semen brez kalčka. V eni semenski glavici je lahko od 20 do nekaj tisoč, tudi do 4 milijone semen, odvisno od vrste. *Bletilla striata* je orhideja z večjim številom semen (Arditi in Ghani, 2000).

Semen brez kalčka, ki so bila direktno posuta na gojišče iz semenske glavice, je bilo manj v letu 2008 za 3,7 % in v letu 2010 kar za 7,7 %, v primerjavi z inokulacijo z mikropipeto. Pri direktnem posutju je verjetno več semen s kalčkom padlo na gojišče zaradi večje mase.

Poskus z vsemi obravnavanji je zajemal 1436 semen, od tega je bilo 400 oz. 27,9 % praznih brez kalčka, ostalih 1036 semen je vsebovalo kalček in s tem možnost za asimbiotsko kalitev.

5.1.2 Asimbiotska kalitev na gojišču A

Semena smo 3-krat bonitirali na kalitvenem gojišču A. Spremljali smo morfološke faze: nabrekanje oz. začetek kalitve, razvoj protokorma, protokorm z rizoidi, protokorm z listom ter pojav naslednjih listov in korenine.

V 11 dneh na kalitvem gojišču A, je večina semen že kalila in vidni sta bili morfološki fazni, protokorm in protokorm z rizoidi. Nezrela in zrela semena iz razkuženih semenskih glavic (ZS RK in SS RK) so v tem obdobju že vsa kalila, pri ostalih štirih obravnavanjih, razkuženo nezrelo in zrelo seme ter centrifugirano pri 4 °C in sobni temperaturi (ZS sT, ZS 4 °C, SS 4 °C in SS sT) je ostalo zelo malo od 0,4 do 2,3 % nekaljivih semen. V tem obdobju ni bilo bistvenih razlik v kalitvi med nezrelim in zrelim semenom ter postopkom centrifugiranja pri 4 °C oz. sobni temperaturi. Vsa semena ne glede na obravnavanje so dobro kalila.

V naslednjih 8 dneh je odstotek nabreklih oz. kaljivih semen bistveno padel, saj je večina semen že prešla v morfološko fazo, protokorm z listom, ki je bila v razponu od 42,6 % pri zrelem semenu centrifugiranem pri sobni temperaturi (SS ST) do 67,7 % pri zrelem semenu iz razkužene semenske glavice (SS RK).

V obdobju 32 dni po inokulaciji semen na gojišče A je bila najštevilčnejša in izenačena, ne glede na obravnavanje, morfološka faza, protokorm z listom. Pri petih obravnavanjih (SS sT, ZS sT, ZS 4 °C, SS RK in SS 4 °C) je bila zelo izenačena od 84,5 do 88,1 %. Najmanj 74,3 % protokormov z listom je bilo pri nezrelem semenu iz razkužene semenske glavice (ZS RK).

Če izpostavimo samo pojav in zastopanost morfoloških faz od kalitve do pojava dveh listov in korenine, lahko zaključimo, da ni bilo bistvenih razlik pri nezrelem in zrelem semenu na gojišču A. Pri zrelem semenu, ki je bilo dve leti hranjeno pri 4 °C je bila dormanca prekinjena in to seme je pri teh razmerah dobro ohranilo kaljivost. Pri nezrelem semenu, glede na rezultate kalitve lahko potrdimo, da še ni prešlo v dormanco, in da testa še ni otrdela, saj je seme direktno inokulirano iz razkužene semenske glavice, zelo dobro kalilo.

5.1.3 Subkultivacija rastlin na gojišče B

Rastline smo po 109 dneh iz kalitvenega gojišča A prestavili na subkultivacijsko gojišče B. Vse rastline so imele ob subkultivaciji vsaj 2 lista, večina pa že tudi korenino oz. korenini.

Po 20-ih dneh na gojišču B je imela večina rastlin več kot 2 lista in 1 korenino. V tem obdobju so bile prisotne 3 morfološke faze, 2 do 3 listi, 2 do 5 listov in 1 korenina ter 2 do 5 listov in 2 korenini ter začela se je morfološka faza, 3 do 5 lisov in 3 do 4 korenine. Variabilnost med obravnavanji znotraj posamezne morfološke faze, razen četrte, je bila zelo očitna. Največji razpon od 0 do 63,6 % je bil pri morfološki fazni, 2 do 3 listi, kar pomeni, da je bila večina rastlin, razen tistih nastalih iz nezrelega semena centrifugiranega pri 4 °C (ZS 4 °C), že v naslednjih morfoloških fazah z več kot 2 listoma in korenino oz. koreninami.

Po 44-ih dneh na gojišču B je imela že večina rastlin 3 do 5 listov in 3 do 4 korenine ter začele so tvoriti odebeline - bulbuluse in se razraščati. Odstotek rastlin v najštevilčnejši morfološki fazni, 3 do 5 listov in 3 do 4 korenine je nihal od 54,1 % pri rastlinah nastalih iz zrelega semena centrifugiranega pri sobni temperaturi (SS sT) do 73,3 % pri rastlinah nastalih iz nezrelega semena centrifugiranega pri 4 °C (ZS 4 °C). Najvišja morfološka faza v tem obdobju - razraščanje, je nihala od 2,2 % rastlin nastalih iz nezrelega semena centrifugiranega pri 4 °C (ZS 4 °C) in do 10,6 % rastlin prav tako nastalih iz nezrelega semena iz razkužene semenske glavice (ZS RK).

V zadnjem obdobju spremljanja, ko so bile rastline 83 dni na subkultivacijskem gojišču B, so imele že vse bulbuluse. Nekatere so pridobile še list oz. liste in prav tako korenine ter faza razraščanja je bila v porastu. Nihala je od 4,4 % rastlin nastalih iz nezrelega semena razkuženega pri 4 °C (ZS 4 °C) ter do 28,6 % rastlin nastalih iz zrelega semena centrifugiranega pri sobni temperaturi (SS sT).

V povprečju, če upoštevamo samo zrelost semen, so rastline na gojišču B nastale iz zrelega semen hitreje prešle v morfološko fazo, 2 do 5 listov in 2 korenini v primerjavi z rastlinami nastalih iz nezrelih semen. V naslednjih petih morfoloških fazah (3 do 5 listov in 3 do 4 korenine, 3 do 5 listov in 3 do 4 korenine z bulbulusi, 6 listov in 3 do 4 korenine z bulbulusi ter 6 listov in 5 do 6 korenin z bulbulusi) je bil odstotek rastlin nastalih iz nezrelega in zrelega semena zelo izenačen. Rastlin v zadnji morfološki fazi razraščanja, je bilo več (9 %) nastalih iz zrelega semena in manj (5,2 %) nastalih iz nezrelega semena.

5.2 SKLEPI

Razkuževanje semenskih glavic in semen z 1,6% dikloroizocianurno kislino v kombinaciji z močilom Tween 20 se je izkazalo za zelo učinkovito, saj smo pridobili 100 % aseptično kulturo.

V povprečju je bilo brez kalčka 27,9 % semen.

Na kalitvenem gojišču A, v obdobju 32 dni, se je pojavilo 5 morfoloških faz: nabreklo seme, protokorm, protokorm z rizoidi, protokorm z listom ter dvema listoma in korenino.

Vse rastline so imele ob subkultivaciji na gojišče B vsaj 2 lista, večina pa že tudi korenine.

Na subkultivacijskem gojišču B, v obdobju 83 dni, so se pojavile 4 morfološke faze: 3 do 5 listov in 3 do 4 korenine, 6 listov in 3 do 4 korenine z bulbulusi, 6 listov in 5 do 6 korenin z bulbulusi ter razraščanje.

Vse rastline, ne glede na morfološko fazo, so bile po 83 dneh subkultivacije primerne za aklimatizacijo.

Oba postopka, hranjenje semen pri 4 °C in uporaba nezrelega semena, sta primerna za uspešno asimbiotsko kalitev orhideje *Bletilla striata*.

Uporaba hladnega centrifugiranja semen je uporaben postopek pri zrelem semenu, kjer je testa otrdela in je seme že prešlo v dormanco.

6 POVZETEK

V poskus *in vitro* so bila vključena semena terestične orhideje *Bletilla striata*, ki so bila pobrana iz rastline, ki raste na prostem v Ljubljani. Zelene semenske glavice so bile pobrane konec avgusta 2010 in do poskusa 12.11.2010, ko smo opravili površinsko razkuževanje in inokulacijo na gojišče, shranjene pri sobni temperaturi. V poskus so bile vključene tudi zrele semenske glavice iste rastline pobrane konec septembra leta 2008 in do razkuževanja shranjene v hladilniku pri 4 °C.

Namen naloge je bil vzpostaviti *in vitro* kalitev zrelih semen z mehčanjem teste s hladnim centrifugiranjem in preizkusiti kalivost nezrelega semena s še neneotrdelo testo.

Nezrele in zrele semenske glavice in semena smo pred inokulacijo razkužili z 1,6 % dikloroizocianurno kislino z dodatkom močila Tween 20. Semenske glavice smo razkuževali 10 minut in jih nato sprali. Semena smo razkuževali 8 min. pri sobni temperaturi in nadaljevali z dvo minutnim centrifugiranjem pri sobni temperaturi oz. pri 4 °C. Nato smo s spiranjem 3-krat ponovili postopek centrifugiranja.

Po razkuževanju smo semena iz semenskih glavic direktno posuli na kalitveno gojišče A (proizvajalca Sigma-Aldrich, P1056) v petrijevke. Direkno razkužena semena smo na gojišče inokulirali z mikropipeto in jih po gojišču razporedili z ukrivljeno stekleno palčko. Vsako obravnavanje smo pripravili v štirih ponovitvah. Ko so rastline po 109 dneh že vse imele vsaj 2 lista, večina tudi korenino oz. korenini, smo jih prestavili na subkultivacijsko gojišče B v steklene kozarce s pokrovom. Gojišče B je vsebovalo mikroelemente gojišča MS (Murashige in Skoog, 1962) in makroelemente gojišča B5 (Gamborg in sod., 1968) ter ostale sestavine, razen banane v prahu in oglja, povzete po Hinnen in sod. (1989).

Seme in rastline smo gojili v rastnih komorah LO 650 proizvajalca Inštitut Zoran Rant pri temperaturi 24 ± 1 °C in fotoperiodi 16/8 ur (svetloba/tema) ter intenziteti svetlobe približno $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Semena in rastline smo bonitirali v zarisanih kvadratih, velikosti 1 cm^2 . Na začetku s stereomikroskopom pri 20 kratni povečavi, rastline na gojišču B pa vizuelno. Znotraj te površine smo semena brez in s kalčki prešeli ter opazovali kalitev, razvoj in rast rastlin. Na gojišču A smo 3-krat bonitirali, prvič 11 dni, drugič 19 dni in tretjič 32 dni po inokulaciji semena na gojišče.

V letu 2008 je bilo 26,6 % semen brez kalčka, v letu 2010 pa 29,1%, v povprečju 27,9 %. Ostala semena so vsebovala kalček in s tem možnost za asimbiotsko kalitev. Na kalitvenam gojišču A, v obdobju 32 dni, smo spremeljali morfološke faze, nabrekanje

semen in povečevanje kalčka, protokorm z rizoidi, protokorm z listom, protokorm z dvema listoma in korenino.

V obdobju 32 dni po inokulaciji semen na gojišče A je bila najštevilčnejša in izenačena, neglede na obravnavanje, morfološka faza protokorm z listom. Pri petih obravnavanjih (SS sT, ZS sT, ZS 4 °C, SS RK in SS 4 °C) je nihala od 84,5 do 88,1 %. Najmanj 74,3 % protokormov z listom je bilo pri nezrelem semenu iz razkužene semenske glavice (ZS RK).

Če izpostavimo samo pojavi in zastopanost morfoloških faz od kalitve do pojava dveh listov in korenine lahko, ne glede na obdelavo semen pred vnosom v kulturo, zaključimo, da ni bilo bistvenih razlik pri nezrelem in zrelem semenu na gojišču A. Pri zrelem semenu, ki je bilo hrano pri 4 °C, je bila dormanca prekinjena, nezrelo seme še ni prešlo v dormanco in testa še ni otrdela.

Rastline smo po 109 dneh iz kalitvenega gojišča A prestavili na subkultivacijsko gojišče B. Vse rastline so imele vsaj 2 lista, večina pa že tudi korenino oz. korenini. V zadnjem obdobju spremeljanja, ko so bile rastline 83 dni na subkultivacijskem gojišču B, so imele že vse bulbuluse, nekatere so pridobile še list oz. liste in prav tako korenine ter faza razraščanja je bila v porastu. Rastlin v zadnji morfološki fazi razraščanja je bilo 9 % nastalih iz zrelega semena in 5,2 % nastalih iz nezrelega semena. Vse rastline v tem obdobju, ne glede na morfološko fazo, so bile primerne za aklimatizacijo.

7 VIRI

An assessment of the fungal specificity of the orchid sub-tribe *Pterostylis*. 2005.

<http://www.anbg.gov.au/cpbr/summer-scholarship/2005-projects/brandner-susan-orchids/> (25.03.2014)

Arditti J. 1992. Fundamentals of orchid biology. New York, John Wiley & Sons: 712 str.

Arditti J. Ghani A.K.A. 2000. Numerical and physical properties of orchid seed and their biological implications. Tansley Review, 145: 367-421

Australien native orchids. 2011.

<http://morselsandscraps.wordpress.com/category/australian-native-orchids/> (25.03.2014)

BioLib - taxonomic tree of plants and animals

<http://www.biolib.cz/en/taxonimage/id74466/?taxonid=197019> (25.03.2014)

Bohanec B. 1992. Tehnike rastlinskih kultur. Ljubljana, BF, Oddelek za agronomijo, Center za rastlinsko biotehnologijo in žlahtnjenje: 168 str.

Carlile M.J., Watkinson S.C. 1994 The fungi. London, Academic Press Ltd: 428 str.

Cribb P. 1997. The genus Cypripedium. Oregon, Timber Press: 301 str.

Cronquist A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Ithaca, New York, Columbia University Prees: 1262 str.

Dressler R. L. 1981. the orchids: natural history and classification. Cambridge, Massachusetts, Harvard University Press: 332 str.

Flickr - photo sharing. 2010.

<http://www.flickr.com/photos/sanskeer/4369595336/in/faves-epiphyte78/> (25.03.2014)

Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K. 1968. Nutrient requirementes of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research, 50: 151-158

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. 2006. orhideje: gojenje tropskih orhidej. Dobrovnik, Ocean Orchids: 149 str.

Kramer J. 1997. Orchid for everyone. New York, Smithmark Publisher: 208 str.

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

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

Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497

Orchidées en Nord. 2009.

http://www.orchid-nord.com/b_page/Bletilla_striata/blet-str.html (25.03.2014)

Petauer T., Ravnik V., Šuštar F. 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.

Rasmussen H.N. 1995. Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plant. Cambridge, Cambridge University Press: 444 str.

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

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

Smith S., Read D.J. 1997. Mycorrhizal Symbiosis. London, Academic Press Ltd: 605 str.

Vodnik D. 2012. Osnove fiziologije rastlin. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 141 str.

Werner D. 1992 Symbiosis of plants and microbes. London, Chapman & Hall: 389 str.

Wild Flora Society. 2007.

<http://www.nswildflora.ca/specPics/hDrope/summer07/summer07.html> (25.03.2014)

Wordpress Tipe Pertumbuhan Anggrek. 2010.

<http://hort eens.wordpress.com/2010/03/06/tipe-pertumbuhan-anggrek/> (25.03.2014)

ZAHVALA

Rada bi se zahvalila svoji mentorici prof. dr. Zlati Luthar za strokovno svetovanje, potrpežljivost, moralno podporo, trud in za ves vložen čas.

Za pregled naloge se iskreno zahvaljujem prof. dr. Dominiku Vodniku in prof. dr. Marijani Jakše.

Za posredovna semena se najlepše zahvaljujem gospe Andreji Schulz.

Zahvaljujem se vsem, ki so mi kakorkoli pomagali pri izvedbi diplomskega dela.

Zahvaljujem se tudi za prijaznost in pomoč pri delu v laboratoriju na Katedri za genetiko, biotehnologijo in žlahtnjenje rastlin Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Hvala tudi staršem, ki so mi omogočili študij in za vso moralno in finančno podporo.

Zahvaljujem se Elmirju in Vanji za pomoč pri grafičnem oblikovanju in Maji za prevod v angleščino.

Hvala tudi vsem ostalim, ki ste mi vsa ta leta stali ob strani.