

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Marko FRANK

**KALITEV FIZIOLOŠKO RAZLIČNO ZRELIH SEMEN
LEPEGA ČEVELJCA (*Cypripedium calceolus* L.)
V *IN VITRO* RAZMERAH**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Marko FRANK

**KALITEV FIZIOLOŠKO RAZLIČNO ZRELIH SEMEN LEPEGA
ČEVELJCA (*Cypripedium calceolus* L.) V *IN VITRO* RAZMERAH**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

***IN VITRO* GERMINATION OF YELLOW SLIPPER ORCHIDS
(*Cypripedium calceolus* L.) FROM DIVERSELY RIPE SEEDS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

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:	akad. prof. dr. Ivan Kreft Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
Članica:	izr. prof. dr. Zlata LUTHAR Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
Član:	prof. dr. Dominik VODNIK Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani Marko Frank 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 Frank

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 582.59:631.53.03:631.547.1.2(043.2)
KG	terestična orhideja / lepi čveljc / gojišče / asimbiotsko razmnoževanje / fiziološka starost semen / kalitev / razvoj / rast
KK	AGRIS F02
AV	FRANK, Marko
SA	LUTHAR, Zlata (mentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
LI	2010
IN	KALITEV FIZIOLOŠKO RAZLIČNO ZRELIH SEMEN LEPEGA ČEVELJCA (<i>Cypripedium calceolus</i> L.) V <i>IN VITRO</i> RAZMERAH
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP	X, 42, [6] str., 6 pregl., 11 sl., 4 pril., 36 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	Lepi čveljc (<i>Cypripedium calceolus</i> L.) je edina evropska vrsta iz rodu <i>Cypripedium</i>. Kljub temu, da se rastišča raztezajo preko večjega dela Evrope, jo je danes na določenih območjih, zaradi načina rabe površin, skoraj nemogoče najti. Razmnoževanje v naravi je počasno in slabo raziskano, zato se poskuša z asimbiotskim razmnoževanjem, ki se kaže kot cenovno in časovno ustrezna metoda, zadostiti povpraševanju po teh redkih trajnicah. Namen poskusa je bil preučiti kaljivost in nadaljnji razvoj različno zrelega semena, pobranega od 35 do 65 dni po ročni opraitvi, ter fiziološko zrelega semena nabranega med leti 2000 in 2008, kjer smo za mehčanje teste uporabili hladno centrifugiranje med razkuževanjem semen. Semena smo inokulirali na komercialno gojišče proizvajalca Sigma P6668 v polni 27,3 g/L (S) in polovični 13,65 g/L (S ½) koncentraciji, ter na enostavno gojišče na osnovi aminokislin (M). Pri sterilizaciji z 2 % dikloroizocianurno kislino smo v poskusu zaradi okužb izločili samo 27,4 % petrijevk. Pri fiziološko različno zrelem semenu smo najboljšo kalitev dosegli pri semenskih glavicah odstranjenih med 40. in 54. dnevom po opraitvi. Pri fiziološko zrelem semenu je slabo kalilo samo seme nabrano v letu 2008, medtem ko starejše seme sploh ni kalilo. Pri kalitvi med posameznimi gojišči ni bilo statistično značilnih razlik, $p = 0,86$. Večje razlike so bile opazne pri nadaljnjem razvoju protokormov, kjer je bil razvoj pri fiziološko različno zrelem semenu najboljši na gojiščih S in S 1/2. V primeru fiziološko zrelega semena smo nadaljnji razvoj opazili le na gojiščih S ½ in M. Rezultati pri fiziološko zrelem semenu kažejo, da je s hladnim centrifugiranjem možno omehčati testo in omogočiti dostop vode do embrija. Vendar so v semenu prisotni še drugi mehanizmi, ki preprečujejo kalitev.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 582.59:631.53.03:631.547.1.2(043.2)
CX terrestrial orchid / *Cypripedium calceolus* / medium / asymbiotic propagation / physiological age of seed / germination / development / growth
CC AGRIS F02
AU FRANK, Marko
AA LUTHAR, Zlata (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
PY 2010
TI *IN VITRO* GERMINATION OF YELLOW SLIPPER ORCHIDS (*Cypripedium calceolus* L.) FROM DIVERSELY RIPE SEEDS
DT Graduation thesis (University studies)
NO X, 42, [6] p., 6 tab., 11 fig., 4 ann., 36 ref.
LA sl
AL sl/en
AB A yellow lady's orchid (*Cypripedium calceolus* L.) is the only European species of the genus *Cypripedium*. Despite the fact that the sites stretch across large part of Europe, it is today in certain areas, because of land use, almost extinct. Reproduction in nature is slow and poorly studied. In horticultural production asymbiotic *in vitro* propagation has been shown to be convenient and inexpensive method to meet the demand for these rare perennials. The purpose of the research was to investigate the germination and further development of immature seeds, which were collected 35-65 days after pollination, and of ripe seeds, which were collected between years 2000 and 2008 and where cold centrifuge has been used to rupture the testa between seeds disinfection. Seeds were inoculated on a commercial media produced by Sigma P6668 in full 27.3 g/L (S) and half 13.65 g/L (S ½) concentration and media base on amino acid (M). In the case of sterilization with 2% dichloroisocyanuric acid we eliminated only 27.4% of petri dishes. The immature seeds produced the best germination when seed pods were removed in the period of 40 to 54 days after the pollination. Amongst the ripe seeds, poor germination appeared only with the seeds collected in year 2008, while the older seed is not germinated at all. The results of germination show that there are no statistically significant differences between different media $P = 0.86$. Major difference appears in further development of protocorms, where the better development of immature seeds was on media S and S ½. With ripe seeds, further development appears only on media S ½ and M. The result showed that the use of cold centrifuge enables the penetration of water into the testa and the embryo to imbibe. However seeds also contain several other mechanisms that prevent germination.

KAZALO VSEBINE

	KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
	KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
	KAZALO VSEBINE	V
	KAZALO PREGLEDNIC	VII
	KAZALO SLIK	VIII
	KAZALO PRILOG	IX
	OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1	UVOD	1
1.1	POVOD ZA RAZISKAVO	1
1.2	NAMEN RAZISKAVE	1
1.3	DELOVNA HIPOTEZA	2
2	PREGLED DOSEDANJIH OBJAV	3
2.1	ZNAČILNOSTI RODU <i>Cypripedium</i>	3
2.2	OPIS LEPEGA ČVELJCA	4
2.3	OPRAŠEVANJE	5
2.4	OPLODITEV IN RAZVOJ SEMENA	7
2.5	SEME	8
2.6	MIKORIZA PRI ORHIDEJAH	8
2.6.1	Vzpostavitev mikorize ob kalitvi kukavičnic	9
2.7	KALITEV SEMENA	10
2.7.1	Nabrekanje in kalitev semena	10
2.7.2	Kalitev v naravi	10
2.8	RAZVOJ SEJANČKOV	11
2.9	RAZMNOŽEVANJE TERESTIČNIH ORHIDEJ	12
2.9.1	Simbiotsko razmnoževanje in vitro	12
2.9.2	Asimbiotsko razmnoževanje in vitro	12
2.9.3	Dormanca semena	12
2.9.3.1	Prekinitev dormance s stratifikacijo	12
2.9.3.2	Skarifikacija in sterilizacija	13
2.9.4	Metoda zelene semenske glavice	14
2.9.5	Nadaljnji razvoj sejanc̣kov <i>in vitro</i>	14
2.9.6	Mikropropagacija	15
2.10	GOJIŠČE	15
3	MATERIAL IN METODE DELA	16
3.1	FIZIOLOŠKO NEZRELO SEME – ZELENNA SEMENSKA GLAVICA	16
3.2	POSKUS Z ZRELIMI SEMENI	17
3.3	PRIPRAVA GOJIŠČA	17

3.4	RAZKUŽEVANJE SEMENSKIH GLAVIC	19
3.5	RAZKUŽEVANJE SEMENA	19
3.6	RASTNE RAZMERE	20
3.7	SUBKULTIVACIJA	20
3.8	VREDNOTENJE	20
4	REZULTATI	22
4.1	NAVZKRIŽNA OPRAŠITEV	22
4.2	KALIVA IN OKUŽENA SEMENA	22
4.3	MORFOLOŠKE FAZE OD KALITVE DO SEJANCA	24
4.4	VPLIV GOJIŠČA NA RAZVOJ RAZLIČNO STARIH SEMEN IZ ZELENIH GLAVIC	27
4.5	VPLIV GOJIŠČA NA RAZVOJ FIZIOLOŠKO ZRELEGA SEMENA	32
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	33
5.1	RAZPRAVA	33
5.1.1	Navzkrižna oprasitev	33
5.1.2	Dosežena aseptičnost kulture po razkuževanju semena	33
5.1.3	Fiziološko nezrelo seme – zelena semenska glavica	34
5.1.4	Fiziološko zrelo seme	36
5.2	SKLEPI	37
6	POVZETEK	38
7	VIRI	40
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Oznaka semenskih glavic nastalih po križanju lepega čveljca in vključenih v poskus zelene semenske glavice	16
Preglednica 2:	Oznaka fiziološko zrelih semen lepega čveljca vključenih v poskus zrelo seme	17
Preglednica 3:	Sestava gojišč uporabljenih za kalitev ter rast in razvoj lepega čveljca	18
Preglednica 4:	Oznaka gojišča glede na proizvajalca, koncentracijo hranil in dodanega strjevalca za kalitev ter rast in razvoj lepega čveljca	19
Preglednica 5:	Starost semen po opraitvi in pojav okužb ter povprečno število kalivih semen lepega čveljca na gojiščih	22
Preglednica 6:	Morfološke faze od kalitve semen lepega čveljca do razvoja sejanca	24

KAZALO SLIK

Slika 1:	Rastlina lepega čoveljca: a - habitus; b - sepal; c - petal; d - sinsepal; e - medena ustna; f - stebriček s spolnimi organi in sterilnim prašnikom; g - sterilni prašnik; h - sterilni prašnik v prečnem prerezu; i - prerez plodnice (Cribb, 1997)	5
Slika 2:	Cvet lepega čoveljca: a - odprtina v medeni ustni z zavihanim robom, skozi katero žuželka vstopi; b - zavihan rob na koncu medene ustne preprečuje izhod mimo brazde in prašnika; c - sterilni prašnik; d - prašnik; e - brazda; f - prašna vrečka, ki se nahaja na prašniku; g - tuja prašna vrečka po ročni oprašitvi prenesena na lepljivo brazdo	6
Slika 3:	Morfološke faze semen lepega čoveljca iz semenske glavice 1 pobrane z rastline 35. dan po oprašitvi	27
Slika 4:	Morfološke faze semen lepega čoveljca iz semenske glavice 2 pobrane z rastline 40. dan po oprašitvi	28
Slika 5:	Morfološke faze semen lepega čoveljca iz semenske glavice 4 pobrane z rastline 40. dan po oprašitvi	29
Slika 6:	Morfološke faze semen lepega čoveljca iz semenske glavice 5 pobrane z rastline 45. dan po oprašitvi	29
Slika 7:	Morfološke faze semen lepega čoveljca iz semenske glavice 6 pobrane z rastline 50. dan po oprašitvi	30
Slika 8:	Morfološke faze semen lepega čoveljca iz semenske glavice 7 pobrane z rastline 54. dan po oprašitvi	31
Slika 9:	Morfološke faze semen lepega čoveljca iz semenske glavice 8 pobrane z rastline 60. dan po oprašitvi	31
Slika 10:	Morfološke faze semen lepega čoveljca iz semenske glavice 9 pobrane z rastline 64. dan po oprašitvi	32
Slika 11:	Morfološke faze fiziološko zrelega semena lepega čoveljca na gojiščih iz leta 2008	33

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Število kalivih in okuženih semen lepega čveljca na šestih gojiščih
- Priloga B: Izbor rastlin in peloda (prašne vrečke) za ročno opraševanje lepega čveljca v naravi in oblikovanje ter zoritev semenskih glavic po oploditvi
- Priloga C: Razkuževanje semenskih glavic in semen lepega čveljca ter inokulacija fiziološko različno zrelega semena na gojišče
- Priloga D: Razvoj semena in subkultivacija sejančkov

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Okrajšava	Pomen
pH	negativni logaritem koncentracije vodikovih ionov
° C	stopinja Celzija
oz.	oziroma
SA	gojišče Sigma P6668 v polni koncentraciji s strjevalcem agar
SP	gojišče Sigma P6668 v polni koncentraciji s strjevalcem Gellan gum [®]
S1/2A	gojišče Sigma P6668 v polovični koncentraciji s strjevalcem agar
S1/2P	gojišče Sigma P6668 v polovični koncentraciji s strjevalcem Gellan gum [®]

1 UVOD

1.1 POVOD ZA RAZISKAVO

Talne orhideje zmerne pasu, predvsem rod *Cypripedium*, v zadnjih nekaj letih ponovno pridobivajo na pomenu, tako v tujini kot tudi pri nas. Povečano povpraševanje po redkih trajnicah za gojenje v vrtovih in parkih kaže velik potencial tudi pri razmnoževanju in gojenju teh orhidej.

Predvsem amaterji in nekatere specializirane vrtnarije že desetletja poskušajo z vrstnim in medvrstnim križanjem priti do zanimivih in nezahtevnih križancev za gojenje tudi na prostem. Velika pozornost se posveča tudi asimbiotskemu razmnoževanju iz semena, ki se kaže kot cenovno in časovno ustrezna metoda. Rezultati tovrstnih raziskav so pripeljali do novih spoznanj o teh redkih rastlinah in bi lahko pripomogli k njihovi ohranitvi.

Zaradi različnih posegov v naravo lahko na rdečem seznamu praprotnic in semenk najdemo večino slovenskih kukavičevk (Orchideaceae), ki so označene z različnimi kategorijami ogroženosti. Na podlagi predhodnih raziskav, ki kažejo pozitivne rezultate bi bilo smiselno nadaljevati s poskusi, ki bi pripomogli k izdelavi uspešnih metod za asimbiotsko gojenje iz semena ali mikropogacijo. Tako bi lahko lepi čveljc *Cypripedium calceolus* L. in ostale kukavičevke postale dostopnejše in manj ogrožene.

Ugotovljeno je bilo, da lahko delež kalivih semen *Cypripedium* spp., pri asimbiotskem razmnoževanju povečamo tako, da uporabimo nezrelo seme, ki v primerjavi z zrelim semenom še nima popolnoma razvite teste, ki otežuje dostop vode in hranil do kalčka (Rasmussen, 1995).

1.2 NAMEN RAZISKAVE

Mnenja o razmnoževanju talnih orhidej iz semena, se glede uporabe fiziološko različno zrelih semen med seboj zelo razlikujejo. V okviru diplomske naloge smo želeli optimizirati asimbiotsko razmnoževanje zaščitene talne orhideje lepi čveljc (*Cypripedium calceolus* L.). V poskus smo vključili fiziološko zrela semena nabrana med leti 2000 in 2008, razen leta 2004 ter 9 različno zrelih semenskih glavic tekočega leta 2008.

Namen raziskave je bil preučiti vpliv uporabljenih gojišč na kalitev in nadaljnji razvoj različno zrelega semena, ki smo ga vključili v poskus v obdobju od 35 do 65 dni po ročni oprašitvi ter kalivost in nadaljnji razvoj fiziološko zrelega semena, kjer smo za mehčanje teste uporabili hladno centrifugiranje med razkuževanjem semen.

1.3 DELOVNA HIPOTEZA

Izhajajoč iz podobnih raziskav, v katerih je bilo ugotovljeno, da je kalivost odvisna predvsem od primerne fiziološke zrelosti semena, na pa toliko od sestave gojišča, ne pričakujemo večjih razlik med posameznimi gojišči.

Večje razlike v uspešnosti kalitve pričakujemo med fiziološko različno zrelim semenom, kjer se lahko pojavijo slabši rezultati v začetku poskusa, zaradi nerazvitega embrija ter kasneje zaradi nepropustne teste in razvitih inhibitorjev.

Pri fiziološko zrelem semenu predpostavljamo, da bo kalivost starejšega semena zaradi starosti in hranjenja pri sobni temperaturi slabša.

2 PREGLED DOSEDANJIH OBJAV

2.1 ZNAČILNOSTI RODU *Cypripedium*

Družina kukavičevk (Orchidaceae) obsega okoli 20.000 do 30.000 različnih vrst in podvrst (Cronquist, 1981; Dressler, 1981; Ravnik, 2002). To pomeni, da predstavljajo okoli 10 odstotkov vseh rastlinskih vrst na Zemlji. Njihova rastišča so tropski predeli Južne Amerike in jugovzhodne Azije, kjer v večini rastejo kot epifiti. Vendar pa vse vrste niso tropske, okoli 300 jih raste tudi v Evropi, od tega je v Sloveniji znanih 76 vrst in podvrst (Ravnik, 2002), ki rastejo kot geofiti. Z drugo besedo jih imenujemo tudi terestične orhideje. Med njimi lahko najdemo redke, ogrožene vrste, kot lepi čoveljc (*Cypripedium calceolus* L.) (Ramsay in Stewart, 1998) ali pogoste vrste, kot je navadna kukavica (*Orchis morio* L. ssp. *morio*).

Rod *Cypripedium*, je uvrščen v poddružino Cypripedioideae, znotraj družine Orchidaceae (Cribb, 1997). Cribb (1997) je rod *Cypripedium* razdelil še v 11 sekcij z dvema podsekcijama v katerih je 46 različnih vrst in 4 varietete. Med njimi je bilo 25 že uporabljenih za križanja. Danes je poznanih več kot 70 registriranih križancev.

Rod je razširjen predvsem v zmernih predelih severne poloble. Na jugu se območje razteza do Himalaje v Aziji ter Gvatemale in Hondurasa v Ameriki. Na severu je rod razširjen vse do Aljaske in Sibirijske. Največja pestrost vrst je na Kitajskem, kjer je bilo odkritih 30 vrst in Severni Ameriki (Cribb, 1997).

Za ta rod rastlin je značilno formiranje kolonij, vendar ima vsaka vrsta svoje okoljske zahteve. Razširjene so v iglastih, listnatih in mešanih gozdovih, gozdnih jasah, močvirjih, barjih, travnikih in prerijah. Na različnih nadmorskih višinah od morske gladine pa vse do visokih gora. Uspevajo na svetlih in senčnih mestih, v vlažnih in suhih razmerah, tako v kislih kot bazičnih tleh (Cribb, 1997).

Nekatere vrste kot sta *C. calceolus* in *C. parviflorum* var. *parviflorum* so razširjene na večjem območju, medtem ko so nekatere druge vrste prisotne samo na določenih manjših območjih (Cribb, 1997).

C. calceolus je edina evropska vrsta. Kljub njeni razširjenosti, jo je na določenih območjih danes skoraj nemogoče najti. Zaradi prelepih cvetov so rastlino množično trgali in izkopavali (Cribb, 1997). V Grčiji je vrsta izumrla, v drugih državah pa jo je uspelo ohraniti in je uvrščena na seznam ogroženih rastlinskih vrst (Rasmussen, 1995). Pri nas je še razmeroma pogosta in je uvrščena na seznam ranljivih rastlinskih vrst (Martinčič in sod., 1999).

V Sloveniji je lepi čoveljc razširjen v alpskem svetu osrednjih in zahodnih kamniških Alp, zahodnih Karavank in v severozahodnih Julijcih, kjer se pojavlja raztreseno in ima lokalno tudi razmeroma velike populacije s preko 100 primerki, vendar so številne populacije zelo

šibke z le nekaj cvetočimi rastlinami. Posamezna raztresena rastišča, z nekaj primerki, so znana tudi v višjih predelih izven Alp v Idrijski Beli in severnem delu Gorjancev (Čušin, 2003).

2.2 OPIS LEPEGA ČEVELJCA

Cypripedium calceolus L. ali navadni lepi čeveljc je 15 do 60 cm visoka rastlina in pogosto tvori manjše skupine. Avtohtono raste od severne Evrope skozi srednjo Evropo v severno Sredozemlje, kavkaške dežele in severno Azijo. Raste v delni senci hrastovih, bukovih gozdov in grmičevja iglavcev ter leske, redko na polnem soncu v visokogorju. Večinoma uspeva v rahli, z apnencem bogati zemlji na apnenčasti geološki podlagi, do 2500 m nadmorske višine (Cribb, 1997).

Korenika ali rizom je luskast, z nitastimi koreninami in se plazi skoraj vodoravno. Steblo je okroglo, kratkodlakavo, pri dnu z rjavimi luskastimi listi. Nad njimi so trije do štirje dvoredno nameščeni, eliptično-ovalni listi, ki obdajajo listno nožnico, 6 do 18 cm dolgi in 3 do 9 cm široki. Listni robovi so pogosto zaviti navzgor, listne žile so vzporedne in na listni površini tvorijo brazde (slika 1) (Hegi in sod., 1980; Cribb, 1997).

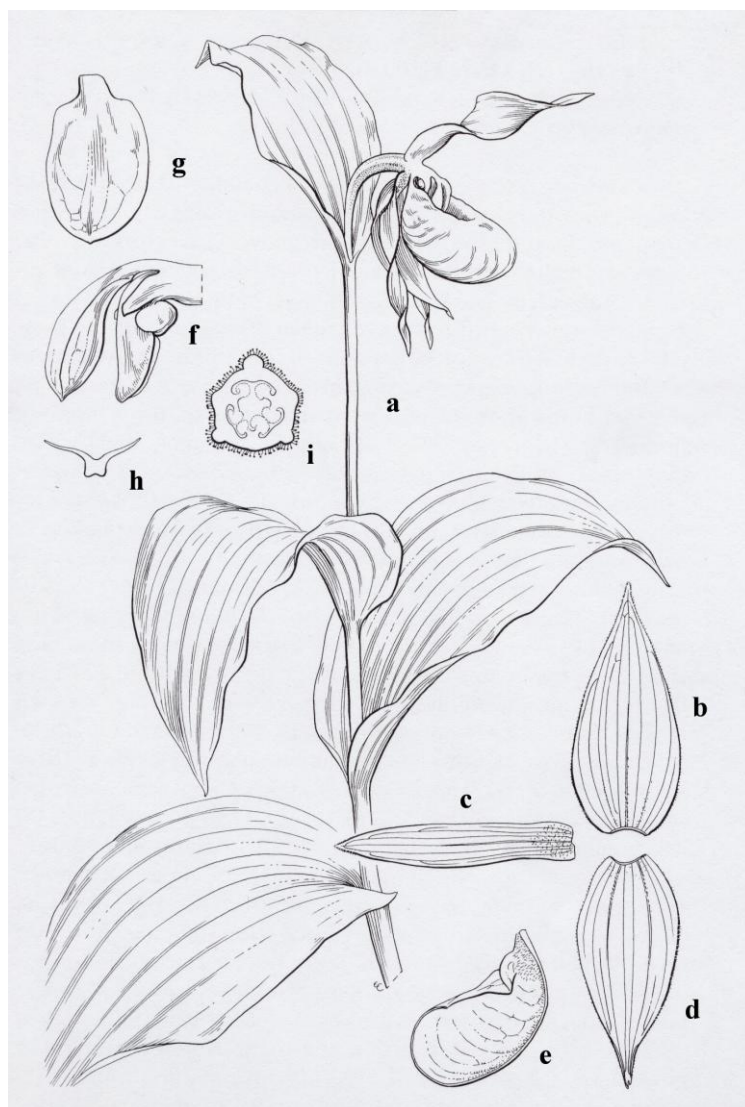
Na stebelu sta eden do dva, redko trije cvetovi. Ovršni list je eliptične ali ovalne oblike, na koncu priostren, 1 do 6 cm dolg. Cvetnemu peclju podobna plodnica je rahlo upognjena in se ob dozorevanju izravna, dolga približno 3 cm, porasla s kratkimi dlačicami. Cvetovi so sestavljeni iz šestih cvetnih listov, ki so razvrščeni v dveh vretencih. Zunanje vreteno je iz treh sepal, kjer sta spodnji dve sepali zrasli in tvorita sinsepal in treh petal, od katerih največjemu srednjemu listu pravimo medena ustna ali labelum. Z izjemo medene ustne, ki je rumene barve z rdečimi pikami in žilami na notranji strani, so ostali cvetni listi kostanjevo rjave, redko zelene barve. Hrbtni (dorzalni) sepal je elipsasto podolgovate ali ovalne oblike, na koncu priostren, 3,5 do 5 cm dolg in 1,5 do 2 cm širok, včasih rahlo zavrit. Sinsepal je elipsasto podolgovate ali suličaste oblike, 3,5 do 5 cm dolg in 1,5 do 1,8 cm širok, z dvema konicama na koncu in rahlo ukrivljen nazaj. Stranska petala sta nameščena približno pod kotom 45 °, enkrat do trikrat spiralno zavita, 3,5 do 6,5 cm dolga in 0,5 do 0,7 cm široka, na koncu priostrena, pri osnovi na notranji strani obraščena. Medena ustna je sijoča, trebušasto napihnjena, 3 do 5,3 cm dolga in 2,5 do 3 cm široka, rob je gladek, zavrit navznoter, na obeh straneh pri osnovi ima zavihek. Stebriček je dolg približno 1 cm, staminodij (sterilni prašnik) je na kratkem peclju, pri vrhu rahlo upognjen, jajčast s srčasto osnovo, 1 do 1,2 cm dolg in 0,7 do 0,9 cm širok (slika 1 in 2) (Cribb, 1997).

Cveti od maja do junija. Plod je glavica (kapsula), ki skozi vzdolžne razpoke vsuje številna semena (Hegi in sod., 1980; Cribb, 1997; Ravnik, 2002).

Življenjska doba posamezne rastline je tudi preko 20 let, prvih nekaj let (6 - 10) živi mikotrofno na račun simbiotskih gliv (Čušin, 2003).

2.3 OPRAŠEVANJE

Cvetovi rodu *Cypripedium* in ostalih pripadnikov poddružine Cypripedioideae so prepoznavni po svoji značilni trebušasti medeni ustni, ki spominja na coklo ali čoveljc (slika 1, 2). Na vrhu medene ustne je velika odprtina z zavihanim robom, katera preprečuje izhod žuželki, ki vstopi v cvet (Ravnik, 2002). Edina možna pot za izhod iz cveta vodi mimo sterilnega prašnika (staminodij), ki ovira izhod skozi ustno in tvori dva manjša prehoda, na vsaki strani enega, mimo stebrička (ginostemija, kolumna). Žuželka najprej oplazi razširjeno brazdo, na katero se prilepi pelod, ki ga žuželka prinese iz prejšnjega cveta. Ob enem brazda služi kot opora in omogoča, da žuželka upogne ustno ter si utre pot mimo enega od prašnikov na prosto. Pri tem se na oprasovalca prilepi pelod, ki ga lahko prenese na drug cvet (Cribb, 1997).



Slika 1: Rastlina lepega čoveljca: a - habitus; b - sepal; c - petal; d - sinsepal; e - medena ustna; f - stebriček s spolnimi organi in sterilnim prašnikom; g - sterilni prašnik; h - sterilni prašnik v prečnem prerezu; i - prerez plodnice (Cribb, 1997)

Samo čebele primerne velikosti se lahko skozi cvet prebijejo tako, da je oprašitev uspešna. Nilsson (1979) je odkril, da so najpogostejši opraševalci ženski osebkovi vrste *Andrena haemorrhoa* L. Vendar lahko tudi druge vrste uspešno oprašijo cvet (Cribb, 1997).

Notranjost medene ustne je zaradi lažjega prehoda žuželk, predvsem pri osnovi, porasla z dlačicami. Podaljšan sterilni prašnik leži na zgornji strani stebrička, na spodnji strani se nahaja lepljiva brazda, levo in desno nad brazdo pa se nahajata prašnika. Pri večini vrst je sterilni prašnik najbolj vpadljiv organ na stebričku (Cribb, 1997).



Slika 2: Cvet lepega čoveljca: a - odprtina v medeni ustni z zavihanim robom, skozi katero žuželka vstopi; b - zavihan rob na koncu medene ustne preprečuje izhod mimo brazde in prašnika; c - sterilni prašnik; d - prašnik; e - brazda; f - prašna vrečka, ki se nahaja na prašniku; g - tuja prašna vrečka po ročni oprašitvi prenesena na lepljivo brazdo

Z redkimi izjemami imajo kukavičevke le en aktiven in dva sterilna, neizrazita prašnika. Čoveljci imajo dva aktivna prašnika in tretjega, ki je sterilen in tvori posebno strukturo imenovano staminodij (Jevšnik, 2006). V obeh prašnicah nastaja lepljiv cvetni prah, s prostimi pelodnimi zrnji. V nasprotju s poddružino *Cypripedioideae* imajo ostale poddružine pelodna zrna združena v polinije. To so voskaste ali tudi roženasto trde kepice zlepljenih pelodnih zrn in kavdikulo, z lepljivo ploščico, s katero se prilepijo na čelo opraševalcev (De Wit, 1978; Ravnik, 2002).

Ugoden čas za umetno oprašitev rodu *Cypripedium* je štiri dni po odprtju cveta. Taka oprašitev ima nekaj prednosti, saj je količina peloda, ki ga nanesemo na brazdo veliko večja v primerjavi z naravno oprašitvijo (Camiel, 2002).

2.4 OPLODITEV IN RAZVOJ SEMENA

Po uspešni oprašitvi se cvetni listi začnejo sušiti, saj je njihovo delo opravljeno. Prične se debelitev plodnice, ki je do sedaj opravljala nalogo cvetnega peclja (Jevšnik, 2006).

Oprašitvi sledi oploditev, do katere pri večini orhidej zmerne območja pride eden do dva tedna po oprašitvi. Pri nekaterih drugih predstavnikih, predvsem rodu *Cypripedium*, lahko od oprašitve do oploditve mine tudi 13 tednov (Veyret, 1974, cit. po Rasmussen, 1995).

Pri orhidejah se oploditev začne 50 do 80 dni po oprašitvi, delitev zigote pa 2 do 30 dni za tem (Arditti, 1992). Pri večini vrst embriogeneza traja dva tedna (Rasmussen, 1995), do večjih razlik pa prihaja pri rodu *Cypripedium* (Light in MacConaill, 1990, cit. po Rasmussen, 1995). Lucke (1982) navaja, da se oploditev semenske zasnove pri rodu *Cypripedium* pojavi štiri tedne po oprašitvi. Razvoj embrija pa v petem tednu po oploditvi.

Ko pelodno zrno pade na brazdo pestiča, se prične počasna rast pelodne cevi, po vratu pestiča in v nekaj dneh doseže semensko zasnovo. Ena od spermalnih celic oplodi jajčno celico v mikropilarnem delu notranjega intagumenta jajčeca (Cribb, 1997). Druga spermalna celica pri orhidejah ponavadi degenerira in se ne združi z jedrom, kar prepreči rast sekundarnega endosperma (Arditti, 1992).

Podobno, kot pri nekaterih ostalih cvetnicah, se tudi pri orhidejah po oploditvi zigota nepravilno deli na manjšo terminalno celico in večjo bazalno celico. Ta delitev polarizira embrijo na zgornji del, iz katerega se bo razvil poganjek in spodnji del, iz katerega se bo razvila korenina (Pridgeon, 1999; Arditti, 1992). Oblikuje se kroglast embrij, ki je slabo polariziran, sestavljena iz 8 do 200 slabo diferenciranih, bolj ali manj enakih celic (Arditti, 1992).

Obstaja več različnih tipov oblikovanja embrija, kar je odvisno od vrste (Arditti, 1992). Enega najbolj razvitih embrijev najdemo pri orhideji *Bletilla striata*, ki je zgrajen iz 734 celic (Veyret, 1974, cit. po Rasmussen, 1995).

Faza zorenja semena je v glavnem povezana s procesom dehidracije. Med razvojem semena se zunanji integument znatno poveča in se skoraj popolnoma loči od notranjega integumenta, v končni fazi odmre in tvori testo. Testa je zgrajena iz odmrlih celic zunanjega integumenta, napolnjena z zrakom in prekrita z lipidnim slojem. Notranji integument se skoraj popolnoma absorbira. Ostane le tanka plast, ki se imenuje karapak, ki je hidrofobna in ščiti embrijo (Rasmussen, 1995). Edina odprtina v semenu je mikropila, s katero je seme pritrjeno na plodnico (Cribb, 1997).

Testa pri rodu *Cypripedium* je brezbarvna 7 tednov po oploditvi, med 49 in 56 dnevom po oploditvi se začne barva spreminjati. Po 8 tednu se testa obarva temno rjavo, v tej fazi notranji integument okoli embrija tvori karapak (Lucke, 1982).

2.5 SEME

Po končanem razvoju semena plodnica dozori in tvori semensko glavico, ki vsebuje nekaj tisoč semen (Jevšnik, 2006). Zrela semenska glavica se ponavadi odpre v suhem vremenu in sprosti semena. Ta veter raznese tudi 5 - 10 km naokoli, kar jim omogoča njihova majhnost in številčnost ter napolnjenost z zrakom. Semena nekaterih izjem, med katere spada tudi *Cypripedium calceolus*, se širijo s pomočjo vode. Semenska glavica se odpre le ob dežju in sprosti semena v dežne kapljice (Böckel, 1972, cit. po Rasmussen, 1995). Pri rodu *Cypripedium* se v večini primerov semenska glavica odpre septembra ali oktobra (Camiel, 2002).

Seme talnih orhidej je nekoliko večje od semena tropskih orhidej. Pri talnih orhidejah, kot so čveljci, seme vključno s testo meri 0,07 do 0,4 mm v širino in 0,11 do 1,97 mm v dolžino ter tehta približno 1 - 2 µg (Cribb, 1997; Harvais, 1974, cit. po Rasmussen, 1995).

Seme sestavlja testa, plast odmrlih celic, ki so napolnjene z zrakom in prekrte z lipidnim slojem. V notranjosti teste se nahaja embrijo, ki je obdan s tanko hidrofobno plastjo imenovano karapak, ki ščiti embrijo (Rasmussen, 1995).

Kvaliteta semena je odvisna od številnih dejavnikov med oprašitvijo in razvojem semena. Pomemben je izvor in kvaliteta peloda. Slabša kvaliteta semena je pogosto vzrok samooprašitve ali slabih klimatskih razmer (Rasmussen, 1995). Na število kvalitetnih semen vpliva tudi starost cveta v času oprašitve (Ballard, 1987).

Za seme orhidej je značilno, da ne vsebuje hranilnega tkiva, kot je endosperm. Minimalne količine hranil v semenu se nahajajo v celicah embrija, kjer so shranjena v obliki lipidov in proteinskih teles, redko v obliki škrobnih zrn ali glukoproteinskih teles (Richardson in sod., 1992; Rasmussen, 1995). Seme oz. embrijo ne vsebuje kličnega lista (kotiledona), z izjemo nekaj redkih vrst.

2.6 MIKORIZA PRI ORHIDEJAH

Mikoriza je sožitje ali simbioza rastlinskih korenin in gliv. Mikorizne glive tvorijo v tleh omrežje nitastih hif, ki tvorijo micelij. Delimo jo na dva osnovna tipa. Ektotrofno mikorizo (ektomikoriza), kjer se gliva naseli na površini korenin in prodre samo v intercelularje in endotrofno mikorizo (endomikoriza), kjer hife glive prodrejo v notranjost koreninskih celic gostitelja (Sinkovič, 2000).

Sožitje, kjer rastlina za svojo energijsko oskrbo potrebuje glivo je mikotrofija. Ko sejanček razvije liste in se lahko fotosinteza prične, se odvisnost od glive delno zmanjša (Rasmussen, 1995).

Mikotrofija orhidejam omogoča, da naseljujejo in tolerirajo ekstremne razmere kot so: senčna mesta, poletna suša, revna tla, tla s slabo dostopnostjo hranil, zaradi visokega ali nizkega pH (Rasmussen, 1995).

Vse orhideje imajo v svojem razvojnem krogu obdobje, v katerem so fotosintetsko neaktivne in zato popolnoma odvisne od mikorize (Smith in Read, 1997). V večini primerov je odvisnost orhidej od mikorize omejena na zgodnje faze razvoja (protokorm, sejancek), saj seme vsebuje zelo malo hranil. To so manjše količine visoko energetskih proteinov in lipidov, zelo malo pa je sladkorjev. Semena nekaterih vrst vsebujejo tudi manjše količine škrobnih zrn (Richardson in sod., 1992). Zaradi pomanjkanja encimov seme orhidej ni sposobno izkoristiti lastnih zalog hranil (lipidov, proteinov in polisaharidov) in je za uspešno kalitev v naravi potrebna mikorizna gliva (Manning in Van Staden, 1987, cit. po Rasmussen, 1995).

Mikorizne glive semenu sintetizirajo hranila, predvsem ogljikove hidrate, potrebne za razvoj. Znano je, da večina semen orhidej ne bo kalila, če ne bo prisotne ustrezne glive. To je bil v zgodnjih letih 20 stoletja eden glavnih problemov masovne proizvodnje orhidej. Danes je znano, da lahko orhideje razmnožujemo asimbiotsko, brez prisotnosti glive, če gojišču dodamo vir ogljikovih hidratov (Smith in Read, 1997).

Odvisnost od mikorize se lahko pojavi tudi v zgodnjih fazah dormance, konec rastnega cikla, ko rastlina ostane brez zelenih delov (Rasmussen, 1995).

Nekatere vrste kukavičevk so zaradi evolucijske izgube klorofila popolnoma odvisne od mikotrofije. Takih naj bi bilo približno 200 vrst (Smith in Read, 1997). Ena med njimi je navadna splavka (*Limodorum abortivum*), ki raste tudi v Sloveniji (Stergaršek, 2008).

Večina mikoriznih gliv, ki so kompatibilne z orhidejami pripada rodu *Rhizoctonia* (Rasmussen, 1995).

Za razliko od ostalih vrst mikorize, kjer rastline glivi zagotavljajo ogljikove hidrate in druge organske snovi, gliva pa v zameno oskrbuje rastlino z minerali, je pri orhidejski mikorizi, v zgodnjih fazah razvoja in včasih v zgodnjih fazah dormance odrasle rastline, oskrba orhideje v celoti odvisna od mikoriznih gliv. Gliva oskrbuje rastlino tako z minerali kot ogljikovimi hidrati (Rasmussen, 1995).

2.6.1 Vzpostavitev mikorize ob kalitvi kukavičnic

Okužba semena orhidej nastane po tem, ko embrijo sprejme vodo, nabrekne in pretrga testo (Carlile in Watkinson, 1994). Pojavijo se rizoidi, katere prerastejo hife glive in prodrejo v celice embrija. Ker embrijo vsebuje malo celic se gliva hitro razraste.

V večini primerov gliva okuži seme preko suspenzorja in rizoidov, ki se razvijajo za nadaljnjo okužbo (Mukerji in sod., 2002). Rasmussen (1995) domneva, da lahko okužba

nastane tudi direktno preko epidermalnih celic, saj so rizoidi le njihovi enostavni podaljški. Širjenje glive iz protokorma na korenine ni direktno. Korenine se okužijo ločeno, iz substrata, preko koreninskih laskov ali celic velamna (Mukerji in sod., 2002).

Hife v celicah tvorijo zapredke imenovane pelotoni, ki močno povečajo izmenjalno površino med orhidejo in glivo (Smith in Read, 1997). Tako hife kot tudi pelotoni imajo kratko življenjsko dobo, le nekaj dni. Nato se degenerirajo in postanejo dostopni celicam orhidej (Werner, 1992).

Uspešna okužba se odraža v nadaljnjem razvoju protokorma. Gliva lahko ostane edini vir hranil v prvih letih razvoja (Deacon, 1997). Večina vrst med razvojem postane avtotrofnih in tako manj odvisna od mikorize. Mnogo jih ohrani mikorizni sistem in si tako zagotavlja dodatni vir dušika in fosforja (Smith in Read, 1997).

2.7 KALITEV SEMENA

2.7.1 Nabrekanje in kalitev semena

Za pričetek kalitve zrelega semena je potrebno odpraviti ovire, ki preprečujejo kalitev. V naravi za to poskrbijo naravni procesi, npr. nizke temperature, mehanski stres, ipd. v zemlji. Pri gojenju *in vitro* pa to dosežemo z razkuževanjem semena. Omehčana in pretrgana testa omogoči, da embrijo lahko sprejme vodo in nabrekne. V nabreklem embriju se prične mitotska delitev meristemskih celic. Meristem se poveča in tvori protokorm ter se diferencira (Rasmussen, 1995).

Pri orhidejah ima zrel embrij nediferencirano tkivo, ki se šele po kalitvi diferencira na suspenzorski in kalazni del. Suspenzorski del embrija se diferencira tako, da se iz njega razvije mikotrofn tkivo, iz kaloznega dela pa se tvori meristemsko tkivo (Rasmussen, 1995).

V fazi nabrekanja embrija se proteini hidrolizirajo in hranila se sprostijo. Poteka razgradnja lipidov, ki zahteva večjo metabolično aktivnost in predvsem v *in vitro* razmerah dodatni vir energije v obliki saharoze. Lipoliza je eden najpomembnejših procesov pri kalitvi semena orhidej (Manning in Van Staden, 1987, cit. po Rasmussen, 1995).

2.7.2 Kalitev v naravi

V naravi večina semen orhidej zmerne pasu kali spomladi ali pozno jeseni. To si lahko razlagamo z dejstvom, da je aktivnost gliv največja v jeseni, ko je na razpolago velika količina odmrle biomase, ki je idealno okolje za kalitev semen (Rasmussen, 1995). *C. calceolus* v naravi domnevno kali spomladi. Majhne protokorme so opazili tudi v decembru (Cribb, 1997).

2.8 RAZVOJ SEJANČKOV

Ker se mlade rastline terestičnih orhidej nahajajo v zemlji je malo znanega o poteku njihovega zgodnjega razvoja. Razvoj *in vitro* pa se lahko razlikuje od razvoja v naravi (Rasmussen, 1995).

Protokormi se monopodialno razvijajo in tvorijo mikorizome, ki se kasneje razvijejo v podzemne organe, rizome ali gomolje. *Cypripedium* spp. v zemlji tvori rizome, nekatere druge vrste terestičnih orhidej pa lahko tvorijo koreninske gomolje različnih oblik. Dolžina razvoja podzemnih razvojnih faz je odvisna od različnih dejavnikov: globine na kateri seme kali, vlage v tleh, vsebnosti humusa, okoljskih dejavnikov in genetskih lastnosti semena. Kljub temu, da se protokormi nahajajo v tleh so obarvani zeleno. Površina je ponavadi prerasla z rizoidi ali pa je celo gladka (Rasmussen, 1995). Pri rodu *Cypripedium* so protokormi na vrhu zaobljeni in prerasli z nekaj rizoidi (Cribb, 1997).

Faza protokorma traja od kalitve pa do takrat, dokler se ne razvije apikalni poganjek s primordialnim listom brez korenine.

Faza mikorizoma se začne s podaljševanjem apikalnega meristema in razvojem prve korenine. Ta faza je pričetek razvoja rizoma, ki je eden najmočnejše okuženih rastlinskih delov z glivo. Ko se rizom razvije, se funkcija mikotropije prenese z rizoma na korenine.

S poskusi na prostem je ugotovljeno, da lahko kaleče seme že naslednjo pomlad razvije majhen list. Vendar je bilo potrjeno, da prvi zelen list pogosto ne mora opravljati fotosinteze in je mikoriza nujno potrebna (Rasmussen, 1995).

Korenine terestičnih orhidej so ponavadi tanke, mesnate, krhke in nerazvejane. Prvo jesen po kalitvi se pojavi prva korenina, ki z rastjo nadaljuje še v zimo in pomlad. Prva korenina na protokormu je obraščena z rizoidi in sestavljena iz večjega deleža floema. Naslednje leto rizom raste v dolžino in v jeseni tvori nove korenine, ki so manj specializirane za mikorizo. Rizom, ki je do sedaj rasel geotropično, raste navzgor in v tretji pomladi razvije velik listni popek. Do tretje jeseni se na nižjih internodijih razvije še ena ali več korenin.

Za prekinitev dormance in razvoj nadzemnih delov je pri *Cypripedium* spp. in nekaterih drugih vrstah terestičnih orhidej nujno potrebno obdobje nizkih temperatur.

Pri odrasli rastlini *C. calceolus* se poganjek za naslednjo sezono diferencira med poletjem in vsebuje zasnove listov in cveta. Novi segmenti rizoma se razvijejo preden se cvetenje konča, nove korenine pa se pojavijo približno dva tedna pozneje in pred začetkom zime dosežejo končno dolžino. Listje odmre v septembru in oktobru in rastlina preide v dormantno stanje (Rasmussen, 1995).

Velikost sejanka in trajanje hladne periode v prvi zimi po kalitvi določa prehod iz faze mikorizoma v fazo sejanka. Kombinacija teh dveh dejavnikov pogojuje prekinitev dormance listnega poganjka.

2.9 RAZMNOŽEVANJE TERESTIČNIH ORHIDEJ

2.9.1 Simbiotsko razmnoževanje *in vitro*

Razmnoževanje terestičnih orhidej iz semena je še vedno najbolj učinkovito (Stewart in Kane, 2006). Simbiotsko razmnoževanje je zapleten proces, saj je potrebno glivo poiskati, identificirati, izvesti test kompatibilnosti in namnožiti preden jo lahko uporabimo. Ker je glive v tleh težko izslediti, so pogosto izolirane iz korenin odraslih rastlin, ki gostijo različne vrste (Zettler, 1997). Dozorela semena površinsko steriliziramo in inokuliramo na primerno gojišče, kamor dodamo tudi izolirano glivo. Gliva embriju in kasneje mladi rastlini, zagotavlja vsa potrebna hranila za razvoj (George, 1993). Večina kalečih semen terestičnih vrst je zelo občutljivih na svetlobo, zato se v prvih mesecih razvoja priporočajo popolno temo (Rasmussen, 1995).

Z uporabo ustreznih gliv, pri simbiotskem razmnoževanju orhidej *in vitro*, lahko dosežemo boljšo kalitev semen in hitrejši nadaljnji razvoj kot pri asimbiotskem razmnoževanju (George, 1993; Johnson in sod., 2007).

2.9.2 Asimbiotsko razmnoževanje *in vitro*

Lewis Knudson je leta 1922, na podlagi predhodnih raziskav ugotovil, da prisotnost glive ni pogoj za kalitev semen orhidej, ampak so pomembni produkti njene presnove (Kauth, 2005). Tako so se skozi leta razvila številna gojišča, ki omogočajo asimbiotsko kalitev. Gojišča so prilagojena posameznim rastlinskim vrstam in vsebujejo vse elemente, ki jih embriju potrebuje za svoj razvoj (George, 1993). Asimbiotski način razmnoževanja orhidej *in vitro* je danes v proizvodnji močno razširjen predvsem zaradi svoje prikladnosti in nižje cene.

2.9.3 Dormanca semena

Pogosto lahko slabo kalitev, fiziološko zrelega semena terestičnih orhidej v *in vitro* razmerah, povežemo tudi z dormantnostjo semena. Iz do sedaj znanih raziskav poznamo nekaj tipov dormance, ki so tako eksogenega kot tudi endogenega izvora (Rasmussen, 1995). V naravi mehčanje teste povzroči voda in mikroorganizmi, kar omogoči kalitev. Nadaljnji razvoj sproži in omogoča simbiotska gliva. Pri *in vitro* asimbiotskem razmnoževanju z različnimi procesi nadomeščamo naravo in prisotnost glive. Za to uporabljamo različne postopke, ki povečajo delež kalivih semen. Pred inokulacijo semena na gojišče ali tik po njej je potrebno seme izpostaviti različnim kemičnim, mehanskim ali temperaturnim procesom.

2.9.3.1 Prekinitev dormance s stratifikacijo

Vzrok za stratifikacijo je potrebno iskati v mehanizmih, ki uravnavajo rast in počitek v semenu. Pri večini rastlin zmernege pasu so se razvile zahteve, da mora seme določen čas pred začetkom kalitve preživeti v zemlji in hladu. Med stratifikacijo se zniža koncentracija

hormona abscizinske kisline (ABA), ki se nahaja v semenu in zavira kalitev. Zlasti proti koncu stratifikacije se začne povečevati koncentracija giberelinov in citokininov, ki omogočajo prehod iz latentnega stanja v kalitev (Smole in Črnko, 2000).

Za večino terestičnih orhidej je znano, da njihovo seme v naravi kali spomladi. Preko zime se testa omehča, razgradijo se kemične snovi, ki zavirajo rast in pričnejo se fiziološke spremembe v embriju.

Dobri rezultati stratifikacije so se pokazali pri nekaterih vrstah terestičnih orhidej, ki težje kalijo. Seme so po inokulaciji izpostavili temperaturi 5 °C, za obdobje 3 - 5 mesecev. Doseženi so bili boljši rezultati kot pri semenu, ki se je razvijalo pri sobni temperaturi. Najlažji način stratifikacije za večino vrst je shranjevanje semena pri temperaturi okoli 5 °C, za najmanj dva meseca pred inokulacijo na gojišče. Stratifikacija semena ni nujna, vendar lahko zelo skrajša čas in izboljša kalitev (Rasmussen, 1995).

2.9.3.2 Skarifikacija in sterilizacija

Z različnimi kemičnimi snovmi ne dosežemo le prekinitve dormance zrelega semena, z mehčanjem teste, ampak seme tudi površinsko steriliziramo. Najpogosteje se uporabljajo hipokloridi, ki so oksidativni reagenti in močno kisli v raztopini. V dosedanjih raziskavah sta se za razkuževanje in skarifikacijo semena najbolj izkazala raztopina kalcijevega hipoklorida ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$) in natrijevega hipoklorida (NaOCl) v koncentraciji 0,2 % do 0,5 % (Malmgren, 1993, cit. po Rasmussen, 1995). Čas, ki je potreben za sterilizacijo je krajši od časa potrebnega za skarifikacijo. Hipokloridi so hlapljivi, zato raztopino uporabimo čim prej. Učinkovitost raztopine je slabša, če v majhnem volumnu razkužujemo večjo količino semena.

Uporaba alkohola omogoča le površinsko sterilizacijo in ne poveča kalivosti. Vodikov peroksid (H_2O_2) pri učinkovitih koncentracijah pogosto povzroča poškodbe semenske zasnove. Dobri rezultati so bili doseženi tudi pri uporabi natrijevega hidroksida (NaOH). Domneva se, da je za izboljšanje kalivosti bolj pomemben nizek pH raztopine, kot pa oksidativni efekt (Rasmussen, 1995).

V nekaterih primerih za odpravo inhibitorjev zadostuje le nekaj minutno tretiranje semena z 2 do 4 % žvepleno kislino (H_2SO_4), pred sterilizacijo z raztopino hipoklorida (Cribb, 1997).

Za mehčanje teste je možno, ob predhodni sterilizaciji semena, uporabiti tudi encime, ki testo razgradijo. Celotno testo lahko uspešno odstranimo mehanično, z uporabo ultrazvoka (Linden, 1992, cit. po Rasmussen, 1995).

2.9.4 Metoda zelene semenske glavice

Metoda zelene semenske glavice ali kultura embrija je prinesla številne prednosti. Metoda je veliko lažja, zanesljivejša in zagotavlja visok odstotek kalivosti. Slabost metode je to, da čas potreben za razvoj pri posameznih vrstah orhidej in znotraj samih vrst še ni popolnoma raziskan. Tako je semenska glavica od matične rastline pogosto odstranjena prezgodaj in embrijo še ni dovolj razvit. Čas dozorevanja je zelo pomemben in je odvisen od rastlinske vrste ter podnebnih in okoljskih dejavnikov (Rasmussen, 1995; Hicks, 2000).

Najprimernejši čas za odstranitev semenske glavice je preden se testa popolnoma razvije. Na podlagi raziskav je najprimernejši čas za odstranitev semenske glavice pri rodu *Cypripedium* med 42. in 60. dnem po opraitvi, kar je 14 do 32 dni po oploditvi. Oploditev se pojavi približno štiri tedne po opraitvi. Seme dozori med 85. in 110. dnem po opraitvi (Rasmussen, 1995).

Rasmussen (1995) je zbral podatke različnih raziskav, o optimalnem času sejanja semena po opraitvi pri kulturi embrija za rod *Cypripedium*.

C. acaule 60 dni (Withner, 1953),

C. calceolus 42 dni (Lucke, 1982), 49-53 dni (Malmgren, 1989) ali 40 dni (Wagner in Hansel, 1994)

C. candidum 42 dni (Pauw in Remphrey, 1993),

C. parviflorum var. *parviflorum* 56 dni (Pauw in Remphrey, 1993),

C. parviflorum var. *pubescens* 49 dni (Light, 1989) ali 60 dni (Withner, 1959),

C. reginae 42 dni (Lucke, 1978; Friosch 1985), 56 dni (Pauw in Remphrey, 1993) ali 60 dni (Withner, 1959).

Če je semenska glavica odtrgana in semena inokulirana preden se testa popolnoma razvije in postane nepropustna za vodo, bo seme hitro nabreklo. Ker seme še ni razvilo mehanizmov dormance, ni potrebno uporabiti procesov za prekinitev le te (Cribb, 1997).

2.9.5 Nadaljnji razvoj sejančkov *in vitro*

Po setvi kulturo hranimo v temnem prostoru, dokler se ne pojavi listni primordij. Večina vrst najboljše kali pri temperaturi 22 do 25 °C, nekatere kot je *C. calceolus* pa pri temperaturah nižjih od 20 °C. Semena lahko kalijo šele po nekaj mesecih, nadaljnji razvoj pa lahko poteka zelo neusklajeno (Rasmussen, 1995). Pri *C. calceolus* semena kalijo po 2 do 4 tednih. Na vsake 2 do 4 mesece je potrebno prestaviti protokorme na sveže gojišče. Sedem mesecev po setvi se pričnejo razvijati prvi rizomi in korenine. Kmalu zatem se pojavi tudi majhen list, ki na svetlobi ozeleni. V tem času kulturo prenesemo na svetlo mesto, kjer je temperatura 15 do 18 °C. Ko se apikalni brst dovolj razvije je potrebno znižanje temperature, ki omogoči organogenezo. Ugotovljeno je bilo, da je obdobje nizkih temperatur potrebno razdeliti na dva dela. Prvo obdobje pri 10 °C, dva meseca po pojavu apikalnega poganjka, ki pospešuje razvoj korenin. In drugo obdobje treh mesecev pri 2 °C,

po katerem se razvije funkcionalni list (Malmgren, 1989; Cribb, 1997, cit. po Rasmussen, 1995).

V pozni pomladi lahko ustrezno razvite sejančke posadimo v substrat in počasi prilagodimo na *ex vitro* razmere. Imeti morajo primerno razvite korenine, daljše od 1 cm (Malmgren, 1993, cit. po Rasmussen, 1995).

2.9.6 Mikropropagacija

Razmnoževanje večine tropskih orhidej z izsečki, različnih tkiv in organov, v *in vitro* razmerah je danes dobro razvita tehnika. Nekaj poskusov je bilo narejenih tudi pri terestičnih orhidejah zmernega področja. Predvsem z namenom ohranjanja vrst in ne masovne tržne proizvodnje (Arditti, 1992).

Znanih je nekaj uspešnih poskusov razmnoževanja nekaterih vrst terestičnih orhidej. Vendar ni veliko objav o mikropropagaciji pri rodu *Cypripedium*. Kačar (2000) navaja probleme okuženosti pri razmnoževanju z nodiji in internodiji cvetnega stebila lepega čevljca. Prihajalo je do izdolževanja aksialnih brstov, vendar do nadaljnjega razvoja ni prišlo.

2.10 GOJIŠČE

V mnogih raziskavah je bilo ugotovljeno, da so tradicionalna gojišča za tkivne kulture preveč koncentrirana za gojenje orhidej, še posebno orhidej zmernega pasu. Zato se predlaga 2 do 10 kratno redčenje hranilnih raztopin. Večina gojišč, ki se danes uporablja za asimbiotsko razmnoževanje orhidej zmernega pasu je bilo razvitih iz gojišč za gojenje tropskih orhidej. Vsebujejo nižje koncentracije anorganskih soli in večji delež organskih komponent. Dodatki organskih komponent, kot so vitamini, rastni regulatorji in aminokisline, naj bi nadomeščali odsotnost simbiotske glive (Rasmussen, 1995).

Potrebe po hranilih, v času kalitve in nadaljnjim razvojem, se močno razlikujejo med posameznimi rodovi in vrstami. Zato neprestano potekajo raziskave o ustreznih gojiščih za posamezne vrste orhidej (Rasmussen, 1995).

3 MATERIAL IN METODE DELA

V poskus asimbiotske kalitve smo vključili semena navadnega lepega čoveljca, *Cypripedium calceolus* L. (slika 1 in priloga B1). Poskus smo razdelili na dva dela. V prvem delu smo postopno sejali oz. inokulirali na gojišče različno zrelo seme po metodi zelene semenske glavice, ki je znana tudi pod imenom kultura embrija. V drugem delu smo inokulirali suha, fiziološko zrela semena, nabrana v tekočem letu oz. v sedmih predhodnih letih (preglednica 6A in a).

3.1 FIZIOLOŠKO NEZRELO SEME - ZELENA SEMENSKA GLAVICA

Prvi del poskusa smo zasnovali maja in junija 2008, ko so rastline zacvetele. Dve rastlini sta bili iz lastne zbirke, iz okolice Ljubljane. Ostale rastline smo našli v bukovem gozdu na Ljubelju (preglednica 1). Na podlagi opazovanja v predhodnem letu, ko na rastlinah nismo našli nobene semenske glavice, smo se odločili, da cvetove oprašimo ročno.

Na rastlinah iz domače zbirke smo 17.5.2008, 5 dni po odprtju cvetov, navzkrižno oprašili 4 cvetove. Rastline na Ljubelju so zacvetele nekoliko pozneje, 4.6.2008 in oprašili smo 20 cvetov, približno 5 - 7 dni po odprtju (preglednica 1). Za vsako opraševanje smo nabrali pelod, ga ločeno shranili in nato navzkrižno oprašili cvetove (priloga B2 in B3). Po 14 dneh smo preverili uspešnost oprašitve in oploditve.

Semenske glavice smo pobirali med 35. in 64. dnem po oprašitvi, v razmaku 4 do 5 dni. Semenske zasnove smo isti ali v naslednjih 20 dneh inokulirali na pripravljena gojišča v dveh ponovitvah (preglednica 1 in priloga A). Semenske glavice smo pred inokulacijo semen na gojišče, hranili v hladilniku pri temperaturi 5 - 8 °C.

Preglednica 1: Oznaka semenskih glavic nastalih po križanju lepega čoveljca in vključenih v poskus zelene semenske glavice

Lokacija	Datum oprašitve	Datum pobiranja	Število dni po oprašitvi	Datum inokuliranja na gojišče	Število dni od pobiranja do inokulacije	Oznaka semenskih glavic
Ljubelj	4.6.2008	8.7.2008	35	15.7.2008	7	1
Ljubljana	17.5.2008	26.6.2008	40	15.7.2008	20	2
Ljubelj	4.6.2008	13.7.2008	40	15.7.2008	2	3
Ljubelj	4.6.2008	18.7.2008	45	21.7.2008	3	4
Ljubljana	17.5.2008	1.7.2008	45	15.7.2008	14	5
Ljubelj	4.6.2008	23.7.2008	50	28.7.2008	5	6
Ljubelj	4.6.2008	27.7.2008	54	28.7.2008	1	7
Ljubelj	4.6.2008	3.8.2008	60	4.8.2008	1	8
Ljubelj	4.6.2008	7.8.2008	64	7.8.2008	0	9

3.2 POSKUS Z ZRELIMI SEMENI

V drugem delu poskusa, 14.10.2008 smo uporabili fiziološko zrela semena nabrana med letom 2000 in 2008, z izjemo leta 2004, v katerem semena nismo našli. Večino semena smo dobili v Botaničnem vrtu v Ljubljani, kjer hranijo semena iz cele Slovenije. Seme iz leta 2006 nam je podaril ljubiteljski gojitelj terestičnih orhidej iz Nemčije. Semena tekočega leta pa smo nabrali na Ljubelju 12.9.2008, ko so kapsule popolnoma dozorele in počile po šivih (priloga B5). Vsa semena razen semen iz leta 2002, 2003 in 2007, ki jih je bilo premalo, smo inokulirali v dveh ponovitvah (preglednica 2 in priloga A).

Preglednica 2: Oznaka fiziološko zrelih semen lepega čeveljca vključenih v poskus z zreliimi semeni

Leto pridelka in oznaka	Izvor
2000	Botanični vrt
2001	Botanični vrt
2002	Botanični vrt
2003	Botanični vrt
2005	Botanični vrt
2006	Nemčija
2007	Botanični vrt
2008	Ljubelj

3.3 PRIPRAVA GOJIŠČA

Uporabili smo komercialno gojišče Sigma P6668 (Phytamax[™] Orchids Maintenance Madium) v polni (27,3 g/L) in polovični (13,65 g/L) koncentraciji ter gojišče na osnovi organskih komponent, ki ga je leta 1996 zasnoval Svante Malmgren (Hicks, 2000). Kot strjevalec gojišča smo uporabili agar (8 g/L) in Gellan gum[®] (2,6 g/L) (preglednica 3).

Gojišče P6668 smo zatehtali in stresli v bidestilirano vodo ter raztopino raztopili s pomočjo magnetnega mešalnika ter umerili do 1L z merilno bučko. S pH metrom smo izmerili pH 5,16 in ga uravnali na želeno vrednost 5,5 z dodajanjem 1N KOH. Gojišče smo z bučko razdelili na dva dela po 0,5 L ter prelili v pollitrške steklenice za avtoklaviranje, v katere smo predhodno dodali agar ali Gellan gum[®].

Gojišče Malmgren na osnovi organskih komponent smo pripravili tako, da smo zatehtali makroelemente, saharozo, aktivno oglje, jih stresli v bidestilirano vodo in raztopino raztopili s pomočjo magnetnega mešalnika ter umerili do 1L z merilno bučko, izmerili pH 6,23 in ga uravnali z dodajanjem 1N HCl na želeno vrednost pH 5,5. S pomočjo bučke smo gojišče razdelili na dva dela in prelili v steklenici za avtoklaviranje, v kateri smo predhodno dodali agar ali Gellan gum[®]. V vsako od steklenic smo kot kompleks organskih snovi dodali 2 cm³ sesekljanega olupljenega krompirja. Po končanem avtoklaviranju pred razlivanjem gojišča v petrijevke smo preko membranskega filtra, ki omogoča sterilizacijo v

vsako steklenico, dodali še 2,5 ml raztopine Vaminolac(t). Sestavlja jo 18 različnih aminokislin in služi kot vir organskega dušika.

Preglednica 3: Sestava gojišč uporabljenih za kalitev ter rast in razvoj lepega čevljca

Sestavine	Gojišče		
	S	S ½	M
Makroelementi (mg/l)			
NH ₄ NO ₃	825	412,5	
CaCl ₂ x 2H ₂ O	166	0,83	
Ca ₃ (PO ₄) ₂			75000
KNO ₃	950	475	
KH ₂ PO ₄	85	42,5	75000
MgSO ₄	90,35	45,175	75000
Mikroelementi (mg/l)			
EDTA, Na ₂ Fe	37,3	18,65	
FeSO ₄ x 7H ₂ O	27,85	13,925	
MnSO ₄ x H ₂ O	8,45	4,225	
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	5,3	2,65	
H ₃ BO ₃	3,1	1,55	
C ₆ H ₅ Cl ₂ x 6H ₂ O	0,0125	0,00625	
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,0125	0,00625	
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,125	0,0625	
KJ	0,415	0,2075	
Organske snovi in vitamini (mg/l)			
Inositol	100	50	
Vaminolac(t)*			5
Pepton	2000	1000	
MES (pufer)	1000	500	
Aktivno oglje	2000	1000	5000
Nikotinska kislina	1	0,5	
Piridoksin	1	0,5	
Tiamin	10	5	
Ogljikov hidrat (mg/l)			
Saharoza	20000	10000	10000
Dodatek (cm³)			
Krompir			4

*Vaminolac(t) je raztopina aminokislin za intravensko uporabo v zdravstvu. Vsebuje 18 esencialnih in neesencialnih aminokislin potrebnih za sintezo telesnih proteinov (L - alanin 6,3 g/l, L - arginin 4,1 g/l, L - asparaginska kislina 4,1 g/l, L - cistin in cistein 1,0 g/l, L - glutaminska kislina 7,1 g/l, Glicin 2,1 g/l, L - histidin 2,1 g/l, L - izolevcin 3,1 g/l, L - levcin 7,0 g/l, L - lizinijev klorid 5,6 g/l, L - metionin 1,3 g/l, L - fenilalanin 2,7 g/l, L - prolin 5,6 g/l, L - serin 3,8 g/l, L - treonin 3,6 g/l, L - triptofan 1,4 g/l, Taurin 0,3 g/l, L - tirozin 0,5 g/l, L - valin 3,6 g/l).

Gojišča smo označili glede na proizvajalca, koncentracijo hranil in dodan strjevalec (preglednica 4).

Preglednica 4: Oznaka gojišča glede na proizvajalca, koncentracijo hranil in dodanega strjevalca za kalitev ter rast in razvoj lepega čoveljca

Gojišče	Strjevalec	Oznaka gojišča
P6668	Agar	SA
	Gellan gum [®]	SP
P6668 ½	Agar	S ½ A
	Gellan gum [®]	S ½ P
Malmgren	Agar	MA
	Gellan gum [®]	MP

Gojišča smo avtoklavirali 20 minut pri 121 °C in tlaku 1,1 bar. Ko se je gojišče nekoliko ohladilo smo ga v brezprašni komori prelili v sterilne plastične petrijevke velikosti 90 x 15 mm. Petrijevke z gojiščem smo pred uporabo oz. inokulacijo semena zaščitene s folijo hranili v hladilniku.

3.4 RAZKUŽEVANJE SEMENSKIH GLAVIC

Semenske glavice smo površinsko razkužili z dikloroizocianurno kislino natrijeve soli ($C_3Cl_2N_3O_3Na$). Pred razkuževanjem smo s semenske glavice odstranili posušene cvetne liste in ostanke kolumna. V 100 ml erlenmajerici smo pripravili 2 % raztopino dikloroizocianurne kisline in dodali 3 kapljice močila Tween 20, za boljšo omočljivost. Semenske glavice smo razkuževali 10 minut z mešanjem. Po razkuževanju smo jih 3 krat sprali z avtoklavirano bidestilirano vodo in jih prestavili v sterilne petrijevke. S pomočjo sterilnega skalpela in pincete smo odrezali oba konca semenske glavice in jo po dolžini prerežali na pol (priloga C1 in C2). Semena smo pri manj razvitih semenskih glavicah izrezali s pomočjo skalpela, pri bolj razvitih glavicah smo seme enostavno potresli na pripravljena gojišča (priloga C3 in C4).

3.5 RAZKUŽEVANJE SEMENA

Za površinsko razkuževanje semena smo uporabili prav tako kot za razkuževanje semenskih glavic 2 % dikloroizocianurno kislino z dodatkom 3 kapljic močila Tween 20.

Seme smo s pinceto prenesli v mikrocentrifugirko (priloga C5), dodali 0,8 ml razkuževalne raztopine in sterilizirali 8 minut. Med tem smo vsebino mikrocentrifugirk nekajkrat pretresali zaradi boljšega razkuževanja. Nato smo postopek razkuževanja za 2 minuti nadaljevali v centrifugi (Beckman J2-HS) pri 7000 obratih/min in 4 °C. S centrifugiranjem smo razkuževalno raztopino ločili od semena in skušali zmehčati oz. poškodovati testo. Spiranje semena smo izvedli tako, da smo z mikropipeto odpipitali razkuževalno raztopino in dodali avtoklavirano bidestilirano vodo ter centrifugirali 2 minuti pri istih

pogojih. Postopek spiranja smo ponovili trikrat. Po zadnjem centrifugiranju smo tekočino ponovno odpipetirali in dodali avtoklavirano bidestilirano vodo. Nato smo semena z mikropipeto inokulirali na gojišča in ga z ukrivljeno sterilno palčko porazdelili po površini gojišč v petrijevkah (priloga C6).

V obeh primerih smo razkuževanje opravili v brezprašni komori, kjer je zagotovljeno sterilno okolje. Orodje, ki smo ga uporabili je bilo pred uporabo sterilizirano v suhem sterilizatorju. Semena smo na gojišče nanašali v dveh ponovitvah. Izjema so bila suha semena iz leta 2002, 2003 in 2007, kjer je bilo semena premalo in smo jih na gojišče nanesli brez ponovitve.

3.6 RASTNE RAZMERE

S parafilmom zaščitene petrijevke smo zložili v škatle s pokrovom ali pa smo jih zavili v alu-folijo, tako smo ves čas poskusa zagotavljali konstantno temo. Nato smo jih postavili v rastno komoro, kjer je bila temperatura vseskozi 24 ± 1 °C.

3.6 SUBKULTIVACIJA

Prvo subkultivacijo smo opravili 13.1.2008, 178 dni po prvi inokulaciji semenskih zasnov na gojišče. Odbrali smo petrijevke, v katerih je bila zaradi velikega števila sejančkov gneča. Iz odbranih petrijev smo na enako sveže gojišče prestavili sejančke, ki so imeli vsaj dve korenini (morfološka faza 6) (priloga D5). Ostale manj razvite sejančke ali protokorme smo po potrebi razporedili po celotni površini petrijevke. Prav tako smo v petrijevkah, kjer smo pri inokulaciji semenske zasnove izrezali in prenesli na gojišče v kupčkih, protokorme razporedili po celotni površini petrijevke.

Drugo subkultivacijo smo opravili 10.4.2009, 265 dan po prvi inokulaciji. Sejančke, ki so razvili vsaj dve korenini (morfološka faza 6) smo iz petrijev prestavili v 600 ml gojilne posode s filtrom (priloga D6). Uporabili smo polovično koncentracijo komercialnega gojišča Sigma P6668 (SA ½), kot strjevalec gojišča smo uporabili agar. V vsako posodo smo nalili 60 ml gojišča. Posode smo zavili v alu-folijo in jih postavili nazaj v rastno komoro.

3.7 VREDNOTENJE

Med poskusom smo spremljali kalitev in razvoj sejančkov. Na podlagi predhodnih raziskav pri sorodnih vrstah smo izdelali in morfološko opredelili razvojne stadije oz. morfološke faze (preglednica 6). Razvoj semena smo spremljali v obdobju od inokulacije na gojišče do 250 dneva, ko smo opazovanje zaključili.

V petrijevkah iz prvega dela poskusa smo pred prvo subkultivacijo 9.1.2009, to je 174 dni po inokulaciji prvih semenskih zasnov, prešteli kaleča semena. Zaradi velikega števila drobnih, neenakomerno porazdeljenih semen smo prešteli samo semena, ki so kalila in so bila vidna s prostim očesom (priloga D1). S prostim očesom smo lahko opazili morfološko

fazo 3, ko protokorm zapusti testo. Pri semenski glavici 5 zaradi tesnih skupkov kalečih semen oz. protokormov nismo mogli natančno prešteti, zato smo njihovo število ocenili (priloga D2).

Zaradi velike variabilnosti, ki se je pojavila med ponovitvami smo število kalivih semen transformirali s korenom (koren iz števila) in z analizo variance za bločno zasnovno (glavica je blok) testirali razlike med različnimi gojišči (Košmelj, 2001).

V poskusu smo ugotovili, da vrsta strjevalca, agar ali Gellan gum[®], na kalitev semena ni imela vpliva oz. je bil vpliv zanemarljiv. Zato rezultatov nismo obravnavali ločeno.

4 REZULTATI

4.1 NAVZKRIŽNA OPRAŠITEV

Oplojeni so bili vsi izbrani cvetovi, ki smo jih navzkrižno oprašili tako na lokaciji v Ljubljani, 4 cvetovi kot na Ljubelju, 20 cvetov. Na lokaciji v Ljubljani smo jih oprašili 5 dni po odprtju cvetov in na Ljubelju približno 5 - 7 dni po odprtju cvetov. Za ročno opraševanje smo se odločili zato, ker eno leto prej na lokaciji Ljubelj nismo našli nobene semenske glavice.

4.2 KALIVA IN OKUŽENA SEMENA

V povprečju je največ 245 semen iz zelene semenske glavice 7 (priloga B4) kalilo na gojišču M, ki smo jo odstranili 54. dan po oprašitvi na Ljubelju. Približno polovico manj 114 semen iz semenske glavice 4, ki je bila pobrana 45. dan po oprašitvi na Ljubelju, je kalilo na gojišču S. Nekoliko manj v povprečju 92 semen iz semenske glavice 8 je kalilo na gojišču M, ki je bila pobrana 60. dan po oprašitvi na Ljubelju. 89 semen iz semenske glavice 7 je kalilo na gojišču S $\frac{1}{2}$, ki je bila pobrana na Ljubelju 54. dan po oprašitvi. 83 semen iz semenske glavice 2, ki je bila pobrana 40. dan po oprašitvi v Ljubljani je kalilo na gojišču S. Pri ostalih obravnavanjih je kalilo v povprečju manj kot 61 semen. V povprečju najmanj 6 semen iz semenske glavice 5 pobrane 45. dan po oprašitvi na Ljubelju je kalilo na gojiščih M in S. Semena iz semenske glavice 9, ki je bila pobrana na Ljubelju 64. dan po oprašitvi niso kalila na nobenem od izbranih gojišč. Ta semena so bila najstarejša glede na pretečeni čas po oprašitvi (preglednica 5).

Preglednica 5: Starost semen po oprašitvi in pojav okužb ter povprečno število kalivih semen lepega čevljca na gojiščih

Oznaka semena oz. semenske glavice	Št. dni po oprašitvi	Povprečno št. kalivih semen na gojiščih		
		S	S $\frac{1}{2}$	M
1	35	16	12	15
2	40	83	61	7
3	40	x	x	x
4	45	114	33 x	45
5	45	6 x	14	6
6	50	20	25	41
7	54	x	89	245
8	60	7	20	92
9	64	0	0	0

Legenda: x okuženo seme v petrijevki

Analiza variance za bločno zasnovno (glavica je blok) je pokazala, da pri izračunanem tveganju $p = 0,86$ ni statistično značilnih razlik med povprečnim številom kalivih semen in različnimi gojišči.

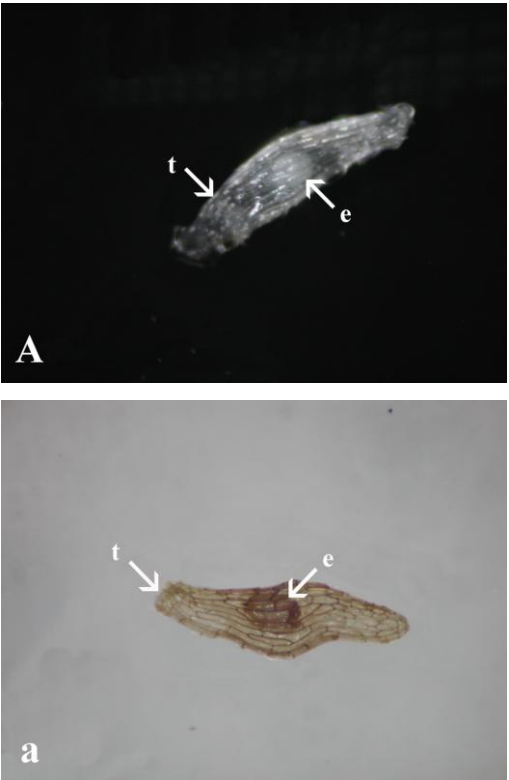
Število kalivih semen v petrijevkah iz drugega dela poskusa, kjer smo sejali fiziološko zrelo seme (priloga B5, C2 in C5), smo prešteli 14.4.2009, 180 dni po inokulaciji semena na gojišče. Kalila so samo semena iz leta 2008 na gojišču S $\frac{1}{2}$ v prvi ponovitvi 4 semena in v drugi ponovitvi 2 semeni, na gojišču M je kalilo 6 semen v prvi ponovitvi in na gojišču M so kalila 3 semena v prvi ponovitvi (preglednica priloga A).

Pri vsakem pregledu smo izločali in beležili okužene petrijevke. V prvem delu poskusa - zelena semenska glavica se je okužilo 30,5 % petrijevk s semeni in v drugem delu - dozorelo seme 23,1 % petrijevk s semeni. Povprečno smo v poskusu zaradi okužb izločili 27,4 % petrijevk s semeni (preglednica 5 in priloga A).

4.3 MORFOLOŠKE FAZE OD KALITVE DO SEJANCA

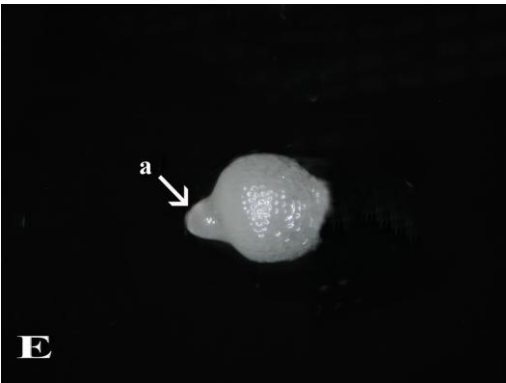
Med poskusom smo spremljali kalitev semena do razvoja sejanca in morfološko opredelili različne faze. Osnovo za morfološko razvrstitev smo povzeli po Valletta in sod. (2008), za orhidejo stasita kukavica *Orchis mascula* L.

Preglednica 6: Morfološke faze od kalitve semen lepega čoveljca do razvoja sejanca

Opis morfoloških faz	Slika
Sliki A in a prikazujeta seme v morfološki fazi mirovanja, v poskusu označeno s številko 0. Na sredini semena se nahaja embrijo (e), ki ga obdaja plast odmrlih celic imenovana testa (t). Na sliki A je fiziološko nedozorelo seme inokulirano 45 dni po oprašitvi in na sliki a fiziološko zrelo seme.	
Slika B začetek kalitve semena, v poskusu označeno s številko 1. Zmehčana ali pretrgana testa omogoči, da embrijo sprejme vodo in nabrekne.	

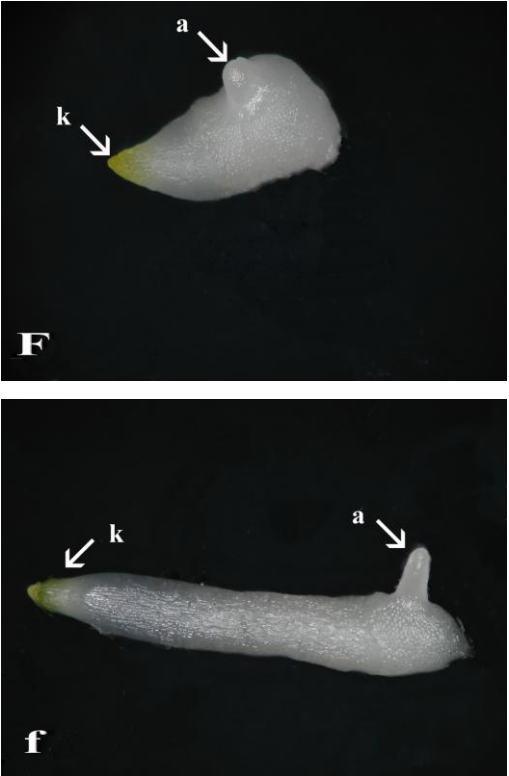
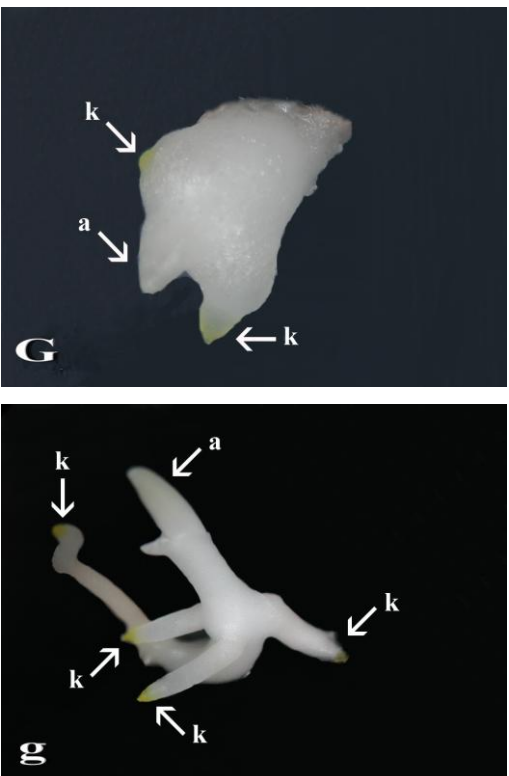
Se nadaljuje

Nadaljevanja

Opis morfoloških faz	Slika
Slika C seme v morfološki fazi, ko protokorm predre testo. V poskusu smo jo označili s številko 2.	 C
Slika D protokorm zapusti testo. To morfološko fazo smo označili s številko 3.	 D
Slika E morfološka faza protokorma z razvitim apikalnim poganjkom (a). V poskusu označeno s številko 4. Med morfološko fazo 3 in 4 se v naravi na površini protokormov ponavadi pojavijo rizoidi, ki jih v našem poskusu nismo opazili.	 E

Se nadaljuje

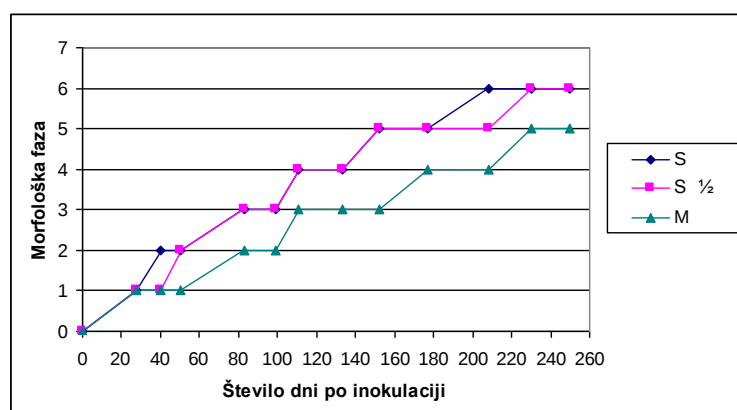
Nadaljevanje

Opis morfoloških faz	Slika
Sliki F in f prikazujeta morfološko fazo mikorizoma, ki se začne s podaljševanjem belega apikalnega poganjka (a) in razvojem prve korenine (k), ki ima rumeno zelen vrh. V poskusu označeno s številko 5.	
Morfološko fazo mikorizomov in sejančkov z dvema ali več koreninami smo v poskusu označili s številko 6. Slika G prikazuje mikorizom z apikalnim poganjkom in dvema koreninama. Na sliki g je sejanček z štirimi razvitimi koreninami.	

4.4 VPLIV GOJIŠČA NA RAZVOJ RAZLIČNO STARIH SEMEN IZ ZELENIH GLAVIC

Semenska glavica 1

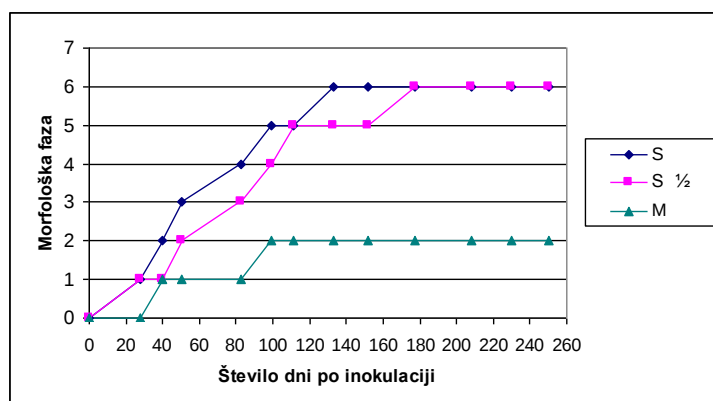
Semenska glavica 1 je bila pobrana z rastline 35. dan po oprašitvi. Začetek kalitve (morfološka faza 1) semen iz semenske glavice 1 smo na vseh gojiščih prvič opazili 28. dan po inokulaciji. Morfološko fazo 2 smo na gojišču S prvič opazili 40. dan, na gojišču S $\frac{1}{2}$ 50. dan in na gojišču M 83. dan po inokulaciji. Morfološko fazo 3, ko protokorm zapusti testo smo prvič opazili 83. dan po inokulaciji na gojišču S in S $\frac{1}{2}$ ter 111. dan na gojišču M. Pojav apikalnega poganjka (morfološka faza 4) smo na gojišču S in S $\frac{1}{2}$ opazili 111. dan po inokulaciji in 177. dan po inokulaciji na gojišču M. Razvoj prve korenine (morfološka faza 5) smo na gojišču S in S $\frac{1}{2}$ opazili 152. dan in na gojišču M 230. dan po inokulaciji. Pojav mikorizomov z dvema koreninama (morfološka faza 6) smo na gojišču S prvič opazili 208. dan in gojišču S $\frac{1}{2}$ 230. dan po inokulaciji. Na gojišču M morfološke faze 6 v obdobju poskusa nismo zasledili (slika 3).



Slika 3: Morfološke faze semen lepega čoveljca iz semenske glavice 1 pobrane z rastline 35. dan po oprašitvi

Semenska glavica 2

Semenska glavica 2 je bila pobrana z rastline 40. dan po oprašitvi. Začetek kalitve (morfološka faza 1) semen iz semenske glavice 2 smo na gojišču S in S $\frac{1}{2}$ prvič opazili 28. dan ter na gojišču M 40. dan po inokulaciji. Morfološko fazo 2 smo na gojišču S prvič opazili 40. dan po inokulaciji, na gojišču S $\frac{1}{2}$ 50. dan in na gojišču M 99. dan po inokulaciji. Razvoj semen na gojišču M se je pri morfološki fazi 2 ustavil. Morfološko fazo 3, ko protokorm zapusti testo smo prvič opazili 50. dan po inokulaciji na gojišču S in 83. dan na gojišču S $\frac{1}{2}$. Pojav apikalnega poganjka (morfološka faza 4) smo opazili na gojišču S 83. dan po inokulaciji in 99. dan po inokulaciji na gojišču S $\frac{1}{2}$. Razvoj prve korenine (morfološka faza 5) smo na gojišču S opazili 99. dan po inokulaciji in 111. dan na gojišču S $\frac{1}{2}$. Pojav mikorizomov z dvema koreninama (morfološka faza 6) smo na gojišču S prvič opazili 133. dan in na gojišču S $\frac{1}{2}$ 177. dan po inokulaciji (slika 4).



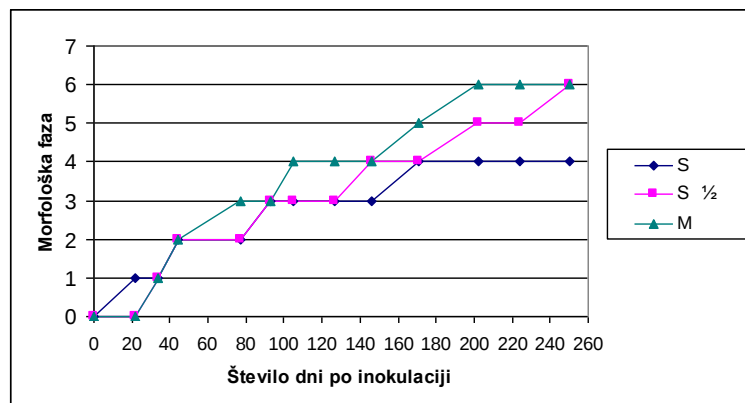
Slika 4: Morfološke faze semen lepega čoveljca iz semenske glavice 2 pobrane z rastline 40. dan po opraitvi

Semenska glavica 3

Semenska glavica 3 je bila pobrana z rastline 40. dan po opraitvi. Semena iz semenske glavice 3 so bila 28. dan po inokulaciji na vseh gojiščih in v obeh ponovitvah okužena z bakterijo, zato smo vse petrijevke z okuženimi semeni izločili iz poskusa.

Semenska glavica 4

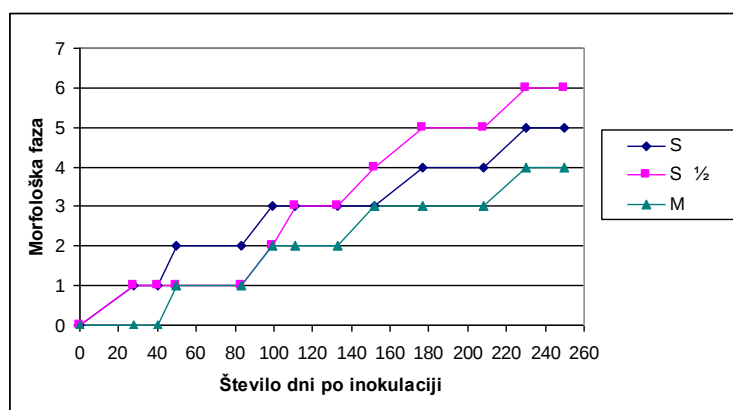
Semenska glavica 4 je bila pobrana z rastline 45. dan po opraitvi. Na semenih iz semenske glavice 4 smo morfološko fazo 1 prvič opazili 22. dan po inokulaciji na gojišču S ter 44. dan na gojiščih S 1/2 in M. Morfološko fazo 2, ko protokorm predre testo, smo prvič opazili 44. dan po inokulaciji semen na gojišču S in 77. dan na gojišču M ter 93. dan na gojišču S 1/2. Morfološko fazo 3 smo opazili 93. dan po inokulaciji na gojiščih S in M ter 146. dan na gojišču S 1/2. Pojav apikalnega poganjka (morfološka faza 4) smo opazili 105. dan na gojišču M in 171. dan na gojišču S ter 202. dan na gojišču S 1/2 po inokulaciji semen. Razvoj prve korenine (morfološka faza 5) smo opazili 171. dan po inokulaciji na gojišču M in 224. dan na gojišču S 1/2. Na gojišču S morfološke faze 6 v obdobju poskusa nismo opazili. Pojav mikorizomov z dvema koreninama (morfološka faza 6) smo prvič opazili na gojišču M 202. dan in gojišču S 1/2 244. dan po inokulaciji semen (slika 5).



Slika 5: Morfološke faze semen lepega čoveljca iz semenske glavice 4 pobrane z rastline 40. dan po opraitvi

Semenska glavica 5

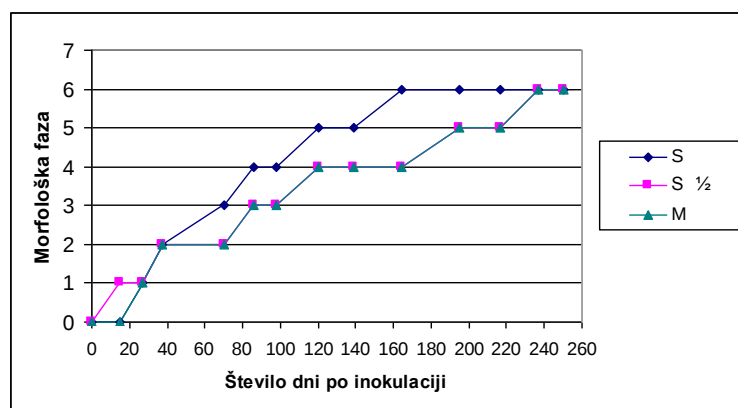
Semenska glavica 5 je bila pobrana z rastline 45. dan po oprašitvi. Na semenih iz semenske glavice 5 smo morfološko fazo 1 prvič opazili na gojišču S in S $\frac{1}{2}$ 28. dan in na gojišču M 50. dan po inokulaciji semen. Morfološka faza 2, ko protokorm predre testo, smo prvič opazili na gojišču S 50. dan, na drugih dveh gojiščih 99. dan po inokulaciji semen. Morfološko fazo 3 smo na gojišču S opazili 99. dan, na gojišču s polovično koncentracijo (S $\frac{1}{2}$) 111. dan in na gojišču M 152. dan po inokulaciji. Pojav apikalnega poganjka (morfološka faza 4) smo opazili na gojišču S $\frac{1}{2}$ 152. dan, na gojišču S 177. dan in na gojišču M 230. dan po inokulaciji semen. Razvoj prve korenine (morfološka faza 5) smo na gojišču S $\frac{1}{2}$ opazili 177. dan in na gojišču S 230. dan po inokulaciji. Na gojišču M morfološke faze 5 v obdobju 250 dni nismo opazili. Razvoj več kot ene korenine (morfološka faza 6) smo opazili le na gojišču S $\frac{1}{2}$ 250 dni po inokulaciji (slika 6).



Slika 6: Morfološke faze semen lepega čoveljca iz semenske glavice 5 pobrane z rastline 45. dan po oprašitvi

Semenska glavica 6

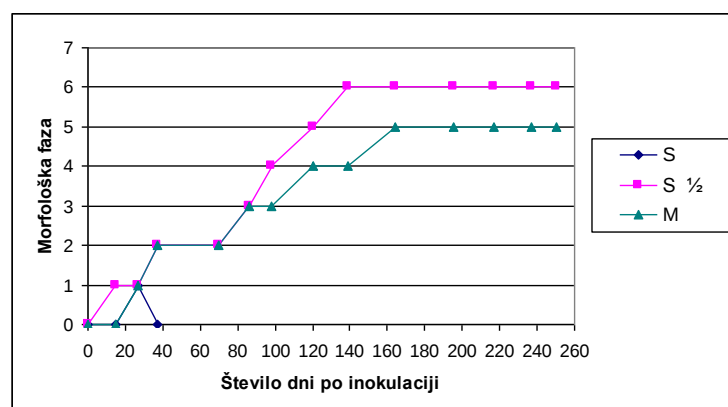
Semenska glavica 6 je bila pobrana z rastline 50. dan po oprašitvi. Začetek kalitve (morfološka faza 1) na semenih iz semenske glavice 6 smo na gojišču S $\frac{1}{2}$ prvič opazili 15. dan ter na gojišču S in M 27. dan po inokulaciji. Morfološko fazo 2 smo na vseh gojiščih prvič opazili 37. dan po inokulaciji. Morfološko fazo 3, ko protokorm zapusti testo smo prvič opazili 70. dan po inokulaciji na gojišču S ter 86. dan na gojišču S $\frac{1}{2}$ in M. Morfološko fazo 4 smo na gojišču S opazili 86. dan ter na gojišču S $\frac{1}{2}$ in M 120. dan po inokulaciji semen. Razvoj prve korenine (morfološka faza 5) smo prvič opazili 120. dan na gojišču S ter 195. dan po inokulaciji na gojišču S $\frac{1}{2}$ in M. Razvoj več kot ene korenine (morfološka faza 6) smo opazili na gojišču S 164. dan ter na gojišču S $\frac{1}{2}$ in M 237. dan po inokulaciji (slika 7).



Slika 7: Morfološke faze semen lepega čoveljca iz semenske glavice 6 pobrane z rastline 50. dan po opraitvi

Semenska glavica 7

Semenska glavica 7 je bila pobrana z rastline 54. dan po opraitvi. Na semenih iz semenske glavice 7 smo morfološko fazo 1 prvič opazili na gojišču S in S 1/2 15. dan ter na gojišču M 27. dan po inokulaciji semen. Morfološka faza 2, ko protokorm predre testo, smo prvič opazili na gojišču S 1/2 in M 37. dan po inokulaciji. Semena na gojišču S smo 37. dan po inokulaciji zaradi okužbe s plesnijo izločili. Morfološko fazo 3 smo na preostalih dveh gojiščih, S 1/2 in M, opazili 86. dan po inokulaciji. Pojav apikalnega poganjka (morfološka faza 4) smo prvič opazili na gojišču S 1/2 98. dan in na gojišču M 120. dan po inokulaciji. Razvoj prve korenine (morfološka faza 5) smo na gojišču S 1/2 opazili 120. dan in na gojišču M 164. dan po inokulaciji. Razvoj več kot ene korenine (morfološka faza 6) smo opazili le na gojišču S 1/2 139 dni po inokulaciji. Na gojišču M morfološke faze 6 nismo opazili (slika 8).

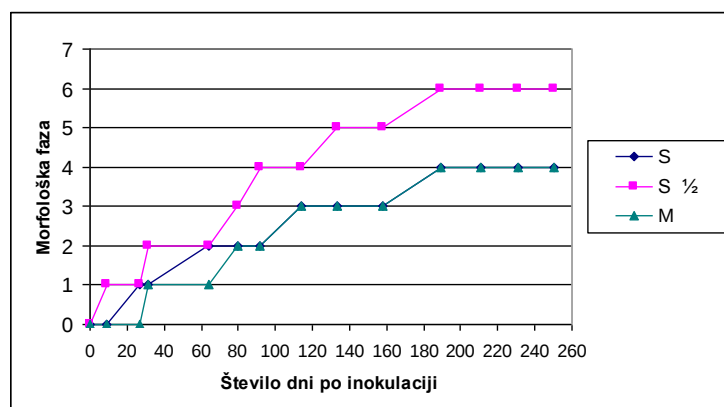


Slika 8: Morfološke faze semen lepega čoveljca iz semenske glavice 7 pobrane z rastline 54. dan po opraitvi

Semenska glavica 8

Semenska glavica 8 je bila pobrana z rastline 60. dan po opraitvi. Začetek kalitve (morfološka faza 1) na semenih iz semenske glavice 8 smo prvič opazili 9. dan na gojišču S 1/2 in na gojišču S ter M 27. dan po inokulaciji. Morfološko fazo 2 smo na gojišču S 1/2

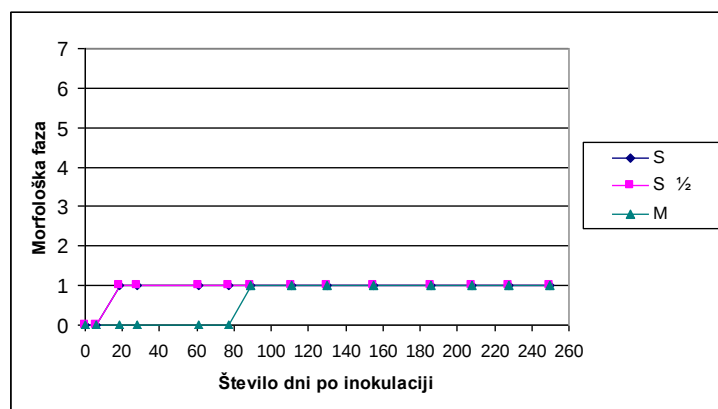
opazili 31. dan, na gojišču S 64. dan in na gojišču M 80. dan po inokulaciji. Morfološko fazo 3, ko protokorm zapusti testo smo prvič opazili 80. dan po inokulaciji na gojišču S $\frac{1}{2}$ ter 114. dan na gojišču S in M. Pojav apikalnega poganjka (morfološka faza 4) smo na gojišču S $\frac{1}{2}$ opazili 92. dan in 189. dan po inokulaciji na gojišču S in M. Razvoj prve korenine (morfološka faza 5) smo na gojišču S $\frac{1}{2}$ opazili 133. dan po inokulaciji. V času opazovanja na gojišču S in M morfološke faze 5 nismo opazili. Pojav mikorizomov z dvema koreninama (morfološka faza 6) smo na gojišču S $\frac{1}{2}$ opazili 189. dan po inokulaciji (slika 9).



Slika 9: Morfološke faze semen lepega čveljca iz semenske glavice 8 pobrane z rastline 60. dan po opraitvi

Semenska glavica 9

Semenska glavica 9 je bila pobrana z rastline 64. dan po opraitvi. Na semenih iz semenske glavice 9 smo v poskusu opazili le morfološko fazo 1, ki smo jo prvič zasledili 18. dan na gojišču S in S $\frac{1}{2}$ ter 89. dan po inokulaciji na gojišču M. Nato se je razvoj semena ustavil na vseh gojiščih (slika 10).

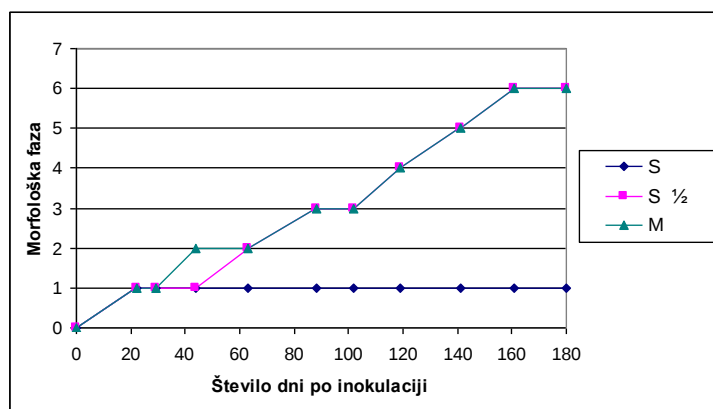


Slika 10: Morfološke faze semen lepega čveljca iz semenske glavice 9 pobrane z rastline 64. dan po opraitvi

4.5 VPLIV GOJIŠČA NA RAZVOJ FIZIOLOŠKO ZRELEGA SEMENA

Semena nabrana med leti 2000 in 2007 na nobenem od uporabljenih gojišč niso kalila. V nekaj primerih je prišlo le do manjšega nabrekanja embrija, kar smo morfološko opredelili kot stopnjo razvoja med morfološko fazo 0 in morfološko fazo 1 (preglednica 6A in B).

Razvojne faze smo opazili le pri semenu nabranem v tekočem letu 2008. Začetek kalitve semen (morfološka faza 1) smo na vseh gojiščih prvič opazili 22. dan po inokulaciji. Morfološko fazo 2, ko protokorm predre testo, smo prvič opazili na gojišču M 44. dan ter na gojišču S $\frac{1}{2}$ 63. dan po inokulaciji. Razvoj semen na gojišču S se je pri morfološki fazi 1 ustavil. Nadaljnji razvoj semena se je na preostalih dveh gojiščih S $\frac{1}{2}$ in M nadaljeval usklajeno. Morfološko fazo 3, ko protokorm zapusti testo smo prvič opazili 88. dan po inokulaciji, pojav apikalnega poganjka (morfološka faza 4) 119. dan po inokulaciji, razvoj prve korenine (morfološka faza 5) 141. dan po inokulaciji in pojav mikorizomov z dvema koreninama (morfološka faza 6) 161. dan po inokulaciji (slika 11).



Slika 11: Morfološke faze fiziološko zrelega semena lepega čoveljca na gojiščih iz leta 2008

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V poskus asimbiotske kalitve smo vključili fiziološko zelena in fiziološko zrela semena lepega čeveljca (*Cypripedium calceolus* L.). Vrsta sodi v skupino rastlin, pri kateri je znano, da seme težje kali. Poskus smo razdelili na dva dela, glede na zrelost semen in rezultate obravnavali ločeno. V prvem delu smo postopno sejali oz. inokulirali semena na gojišča nabrana v različnih obdobjih 35, 40, 45, 50, 54, 60 in 64 dni po ročni oprasitvi, z metodo zelene semenske glavice, ki je znana tudi pod imenom kultura embrija. V drugem delu pa smo sejali suha, fiziološko dozorela semena, nabrana med letom 2000 in 2004 in med letom 2005 do 2008. V obeh primerih smo semena inokulirali na tri različna gojišča in kot strjevalec smo uporabili agar in Gellan gum®.

V poskusu smo ugotovili, da vrsta strjevalca in ostale sestavine gojišč, na kalitev semen niso imeli vpliva oz. med njimi ni bilo statistično značilnih razlik, izračunano tveganje $p = 0,86$. Zato rezultatov nismo obravnavali ločeno.

5.1.1 Navzkrižna oprasitev

Za ročno oprasovanje lepega čeveljca v naravi smo se odločili, ker eno leto prej na lokaciji Ljubelj nismo našli nobene semenske glavice. Obdobje ročne oprasitve 5 do 7 dni po odprtju cvetov se je izkazalo kot zelo primeren čas za oprasovanje, saj so se vsi cvetovi tako na lokaciji Ljubljana, izbrani 4 cvetovi kot Ljubelj, izbranih 20 cvetov oplodili oz. tvorili semenske glavice (priloga B2 do B5) (Cribb, 1997). Camiel (2002) navaja, da je ugoden čas za umetno oprasitev rodu *Cypripedium* štiri dni po odprtju cveta. Taka oprasitev ima nekaj prednosti, saj je količina peloda, ki ga naneseemo na brazdo veliko večja v primerjavi z naravno oprasitvijo (Camiel, 2002). Ker sami nismo imeli težav z oploditvijo cvetov, lahko vzroke za slabo oploditev v naravi pripišemo odsotnosti oz. pomanjkanju ustreznih oprasovalcev. Če bi dodatne raziskave potrdile to domnevo bi lahko s sistematičnim ročnim oprasovanjem v naravi povečali možnost obstoja in širitve vrste. Na število kvalitetnih semen vpliva tudi starost cveta v času oprasitve (Ballard, 1987).

5.1.2 Dosežena aseptičnost kulture po razkuževanju semen

V prvem delu poskusa - zelena semenska glavica smo dosegli 69,5 % aseptično kulturo in v drugem delu - dozorelo seme 76,9 %. Skupno smo v poskusu zaradi okužb izločili 27,4 % petrijevk s semeni oz. smo dosegli 72,6 % aseptičnost semen, kar je za rastline oz. semena gojena na prostem zelo uspešno (preglednica 5 in priloga A). Postopek 10 minutnega razkuževanja zelenih glavic z 2 % dikloroizocianurno kislino in 8 minutno razkuževanje semen z enako koncentracijo razkužila pri sobni temperaturi in nadaljevanje 2 minuti s centrifugiranjem pri 4 °C ter hladno spiranje so bili zelo uspešni pri pridobitvi aseptične kulture.

5.1.3 Fiziološko nezrelo seme - zelena semenska glavica

V prvem delu poskusa smo uporabili različno stara semena (semenske zasnove) tekočega leta 2008 pobrana med 35. in 64. dnevom po ročni opravitvi. Zanimalo nas je, kako na kalitev vpliva njihova dozorelost in ali obstajajo razlike med posameznimi gojišči.

Na podlagi dosedanjih raziskav je najprimernejši čas odstranitve semenske glavice pri rodu *Cypripedium*, preden se testa popolnoma razvije, to je med 42. in 60. dnem po opravitvi (Rasmussen, 1995). V tem času so svetle oz. bele celične stene teste (preglednica 6A) in embrijo je še vedno povezan s plodnico in vsebuje 9 do 12 celic (Cribb, 1997), inhibitorji kalitve pa še niso prisotni.

Na čas dozorevanja semena vpliva stanje oz. vitalnost rastline in okoljski dejavniki. Sprememba povprečne temperature za 2 °C v obdobju formiranja semen lahko zamakne optimalni čas dozorelosti za teden (Cribb, 1997).

V povprečju je največ 245 semen inokuliranih na gojišče M kalilo iz semenske glavice 7 odstranjene 54. dan po opravitvi na Ljubelju. Približno polovico manj 114 semen iz semenske glavice 4, ki je bila pobrana 45. dan po opravitvi na Ljubelju, je kalilo na gojišču S. Nekoliko manj v povprečju 92 semen iz semenske glavice 8 je kalilo na gojišču M, ki je bila pobrana 60. dan po opravitvi na Ljubelju. 89 semen iz semenske glavice 7 je kalilo na gojišču S ½, ki je bila pobrana na Ljubelju 54. dan po opravitvi. 83 semen iz semenske glavice 2, ki je bila pobrana 40. dan po opravitvi v Ljubljani je kalilo na gojišču S. Pri ostalih obravnavanjih je kalilo v povprečju manj kot 61 semen. V povprečju najmanj 6 semen iz semenske glavice 5 pobrane 45. dan po opravitvi na Ljubelju je kalilo na gojiščih M in S (preglednica 5). Iz dobljenih rezultatov po metodi zelene semenske glavice lahko sklepamo, da je najprimernejši čas za odstranitev semenske glavice med 40. in 54. dnevom po opravitvi. Pri tem je potrebno upoštevati, da na čas dozorevanja vplivajo okoljski dejavniki in variabilnost znotraj same vrste.

Pri semenski glavici 9, ki smo jo pobrali z rastline 64. dan po opravitvi, ni kalilo nobeno seme, kar lahko pripišemo fiziološko zrelemu semenu. Ta semena so bila najstarejša glede na pretečeni čas po opravitvi. Pri inokulaciji semena na gojišče smo opazili značilno temno rjavo testo, ki je pokazatelj fiziološko zrelega semena (preglednica 6a). V tej fazi se tvori karapak, ki je hidrofoben in ščiti embrijo pred sprejetjem vode (Rasmussen, 1995).

Pri metodi zelene semenske glavice smo spremljali tudi razvoj semena in ga morfološko opredelili. V poskusu asimbiotske kalitve protokormi niso razvili rizoidov, ki se v naravi pojavijo po tem ko embrijo sprejme vodo, nabrekne in zapusti testo (preglednica 6D in E). Hitrost razvoja semen in pojav posameznih morfoloških faz znotraj posamezne petrijevke je bila zelo neenakomerna, kar lahko pripišemo neenakomernemu razvoju semen znotraj semenske glavice.

Začetek kalitve semen (morfološka faza 1) smo na gojiščih opazili med 9. in 50. dnem po inokulaciji. Najprej na semenih iz semenske glavice 8 in najkasneje na semenih iz semenske glavice 1 (preglednica 6B). Morfološko fazo 2, ko protokorm predre testo smo na gojiščih prvič opazili 31. dan po inokulaciji semen iz semenske glavice 8 in najkasneje 99. dan na semenih iz semenske glavice 1 in 3 (preglednica 6C). Morfološko fazo 3, ko protokorm zapusti testo, smo prvič opazili 50. dan po inokulaciji semen iz semenske glavice 3 in najkasneje 152. dan pri semenih iz semenske glavice 1 (preglednica 6D). Pojav apikalnega poganjka (morfološka faza 4) smo prvič opazili med 83. in 202. dnem po inokulaciji. Najhitreje 83. dan po inokulaciji semen iz semenske glavice 3 in najkasneje 202. dan na semenih iz semenske glavice 2 (preglednica 6E). Razvoj prve korenine (morfološka faza 5) smo na gojiščih prvič opazili med 99. in 230. dnem po inokulaciji. 99. dan po inokulaciji semen iz semenske glavice 3 smo opazili pojav prve korenine in najkasneje 230. dan na semenih iz semenskih glavic 1 in 4 (preglednica 6F in f). Morfološko fazo 6, kjer mikorizom razvije več kot eno korenino, smo prvič opazili 133. dan po inokulaciji semen iz semenske glavice 3 in najkasneje 250. dan na semenih iz semenske glavice 1 (preglednica 6G in g).

Na gojišču S 1/2 in S smo opazili več vitalnih oz. lepo razvitih in večjih mikorizomov kot na gojišču M, kjer so se mikorizomi iz semen z večine semenskih glavic razvili le do morfološke faze 5 (priloga D3 in D4). Boljši razvoj mikorizomov lahko pripišemo kompleksnejši sestavi gojišča S in S 1/2 v primerjavi z gojiščem M. Vpliv gojišč na kalitev semen morfološka faza 1 iz rezultatov našega poskusa nismo mogli opredeliti, saj je analiza variance za bločno zasnovu pokazala, da pri izračunanem tveganju $p = 0,86$ ne obstajajo statistično značilne razlike med povprečnim številom kalivih semen in različnimi gojišči (preglednica 5).

Med poskusom smo 105 dni po inokulaciji fiziološko nezrelega semen prvič opazili rjavenje in kasneje propad mikorizomov v različnih stadijih razvoja, če jih nismo pravočasno subkultivirali (priloga D7). Več je bilo nekrotičnih mikorizomov na gojiščih S in S 1/2, kjer je bila gostota mikorizomov največja. Na gojišču M rjavenje mikorizomov ni bilo tako izrazito. Tako lahko potrdimo pozitiven vpliv organskih komponent, na razvoj mikorizomov, ki smo jih v gojišče dodali v obliki različnih aminokislin (Vaminolac) in ogljikovih hidratov iz krompirja. Prav tako lahko sklepamo, da organska oblika dušika v gojišču omeji rjavenje mikorizomov. Mikorizomi, ki niso bili močno prizadeti so se po subkultivaciji na sveže gojišče opomogli in normalno nadaljevali z rastjo in razvojem.

Vzrok za rjavenje je lahko neprimerna sestava gojišča, posledično višek ali pomanjkanje določenega elementa. Znano je, da mnoge vrste orhidej lahko dobro kalijo na manj kompleksnih gojiščih oz. na skromnejših gojiščih, ki pa niso primerna za nadaljnji razvoj (Van Waes, 1984, cit. po Rasmussen, 1995).

Pri semenih iz večine semenskih glavic smo opazili večja odstopanja v kalivosti med prvo in drugo ponovitvijo, kar lahko pripišemo neenakomernemu razvoju semen znotraj

semenske glavice. Opazili smo, da semena na hrbtni strani semenske glavice dozorijo hitreje kot semena na trebušni strani (priloga B4 in B5), katera smo morali odstraniti s pomočjo skalpela. Posledica tega je manjše število kalivih semen na gojiščih, na katere smo semena inokulirali nazadnje.

5.1.4 Fiziološko zrelo seme

V drugem delu poskusa, kjer smo uporabili fiziološko zrela semena, nabrana v obdobju od leta 2000 do 2003 in 2005 do 2008 nas je zanimalo, kako na kalivost vpliva starost in pogoji hranjenja fiziološko zrelega semena, vrsta gojišča in ali lahko s postopkom centrifugiranja zmehčamo semensko testo ali obstajajo v zrelem semenu inhibitorji, ki zavirajo kalitev. Za začetek kalitve fiziološko zrelega semena je potrebno omehčati in pretrgati testo, da embrijo lahko sprejme vodo.

Število kalivih semen v petrijevkah iz drugega dela poskusa, kjer smo sejali fiziološko zrelo seme, smo prešteli 180 dni po inokulaciji semen na gojišče. Pri semenih nabranih v obdobju od leta 2000 do 2003 in 2005 do 2007 smo ugotovili, da seme na nobenem od uporabljenih gojišč ni kalilo. V nekaj primerih smo opazili le manjše nabrekanje embija. Na podlagi tega lahko sklepamo, da nam je s centrifugiranjem uspelo omehčati testo in tako omogočiti dostop vode do embrija. Slab nadaljnji razvoj lahko pripišemo starosti semena in neprimernemu skladiščenju, saj so bila hranjena pri sobni temperaturi, ali prisotnim inhibitorjem kalivosti, ki so prisotni v zrelem semenu (Rasmussen, 1995).

Pri fiziološko zrelem semenu tekočega leta 2008 je skupno kalilo 13 semen. Začetek kalitve (morfološka faza 1) smo prvič opazili 22. dan po inokulaciji semen na vseh uporabljenih gojiščih. Nadaljnji razvoj smo opazili le na gojiščih S 1/2 in M. Morfološko fazo 6, kjer mikorizom razvijejo več kot eno korenino smo prvič opazili med 161. in 180. dnem po inokulaciji semen (slika 11).

Majhno število kalivih semen lahko pripišemo endogeni dormanci semena, ki je pri fiziološko zrelem semenu ena od glavnih ovir pri asimbiotski kalitvi. V primeru gojišča S, kjer so semena začela kaliti, nato pa se je razvoj ustavil, lahko povežemo s previsoko koncentracijo anorganskih soli. Dokazano je, da so gojišča za gojenje tropskih orhidej preveč koncentrirana za gojenje terestričnih orhidej (Cribb, 1997). V dosedanjih raziskavah je bilo ugotovljeno, da orhidejam na začetku rasti primanjkuje encimi povezani z metabolizmom dušika, kar preprečuje izrabo nitrata. Zato se priporoča uporaba gojišč kjer je uporabljena kombinacija organskega in anorganskega dušika oz. je v gojišču prisotna samo organska oblika dušika (Rasmussen, 1995). Zaradi majhnega števila semen, vpliv gojišča na kalitev in razvoj nismo mogli opredeliti. Ugotovili smo, da starost in zrelost semen negativno vplivata na kalitev in to veliko bolj kot pri večini drugih rastlinskih vrstah, saj je zrelo seme tekočega leta 2008 komaj kalilo oz. zelo slabo. Starejša semena pa sploh niso kalila, lahko je vzrok tudi v neprimernem skladiščenju pri sobni temperaturi. Ker pa je zrelo seme tekočega leta, ki ni bilo skaladiščeno slabo oz. komaj kalilo so vzroki

verjetno drugje, prisotnost inhibitorjev in karapaka, ki je hidrofoben in ščiti embrijo pred zunanjimi vplivi (Rasmussen, 1995). V nekaterih primerih za odpravo inhibitorjev zadostuje le nekaj minutno tretiranje semena z 2 do 4 % žvepleno kislino (H_2SO_4) oz. pred sterilizacijo z raztopino hipoklorida (Cribb, 1997).

5.2 SKLEPI

Iz dobljenih rezultatov po metodi zelene semenske glavice lahko sklepamo, da je najprimernejši čas za odstranitev semenske glavice med 40. in 54. dnem po opraitvi. Pri tem je potrebno upoštevati, da na čas dozorevanja vplivajo okoljski dejavniki, ki povečujejo razlike med lokacijami in raznolikost znotraj same vrste, ki povečujejo razlike med posameznimi rastlinami.

Pri kalitvi fiziološko različno zrelega semena (semenskih zasnov) med gojišči nismo opazili večjih razlik oz. statistično značilnih razlik, izračunano tveganje $p = 0,86$. Največje razlike se kažejo pri morfološki razvitosti, kje so se mikorizomi na gojiščih S in S $\frac{1}{2}$ razvijali bolje kot na gojišču M. Ti rezultati nakazujejo na to, da se mikorizomi najboljše razvijajo na kompleksnejših gojiščih.

Vrsta strjevalca in ostale sestavine gojišč niso vplivali na kalitev fiziološko različno starega semena, medtem ko so se različne morfološke faze pojavljale različno hitro glede na gojišča.

Rezultati dobljeni pri fiziološko zrelem semenu kažejo, da je s centrifugiranjem možno zmehčati oz. poškodovati testo in posledično omogočiti kalitev. Vendar pri večini semen ostajajo prisotni drugi dejavniki, ki preprečujejo kalitev, tudi primeren način hranjenja in inhibitorji kalivosti.

Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da starost in zrelost semena negativno vplivata na kalitev. V poskusu so komaj oz. zelo slabo kalila zrela semena nabrana v letu 2008, ki so bila takoj inokulirana na gojišče. Starejša semena sploh niso kalila.

Fiziološko zrela semena nabrana leta 2008 so kalila na vseh uporabljenih gojiščih. Nadaljnji razvoj pa se je nadaljeval le na gojiščih S $\frac{1}{2}$ in M. Ti rezultati kažejo, da je nadaljnji razvoj pri fiziološko zrelem semenu, boljši na skromnejših gojiščih z manjšo koncentracijo in sestavo hranil.

2% dikloroizocianurna kislina z dodatkom močila Tween 20 in čas razkuževanja ter postopek hladnega centrifugiranja so bili uspešni pri razkuževanju, saj smo dosegli 72,6 % aseptično kulturo z materialom, ki je bil več let gojen na prostem.

6 POVZETEK

Talne orhideje zmerne pasu, predvsem rod *Cypripedium*, v zadnjih nekaj letih ponovno pridobivajo na pomenu. Velika pozornost se posveča asimbiotskemu razmnoževanju iz semena, ki se kaže kot cenovno in časovno ustrezna metoda. Rezultati tovrstnih raziskav so pripeljali do novih spoznanj o teh pogosto redkih rastlinah. Ugotovljeno je bilo, da lahko delež kalivih semen, pri asimbiotskemu razmnoževanju, povečamo tako, da uporabimo nezrelo seme. Glede na različne rezultate in mnenja smo v okviru diplomske naloge izvedli poskus, kjer smo želeli optimizirati asimbiotsko razmnoževanje zaščitene talne orhideje lepi čevljca (*Cypripedium calceolus* L.).

Semena smo inokulirali na različna gojišča. Uporabili smo komercialno gojišče Sigma P6668 (Phytamaxtm Orchids Maintenance Madium) v polni 27,3 g/L (S) in polovični 13,65 g/L koncentraciji (S ½). Ter gojišče na osnovi aminokislin (M), ki ga je leta 1996 zasnoval Svante Malmgren. Kot strjevalec gojišča smo uporabili agar 8 g/L ali Gellan gum[®] 2,6 g/L.

Poskus smo razdelili na dva dela. V prvem delu smo uporabili različno razvita in zrela semena (semenske zasnove) tekočega leta pobrana med 35. in 64. dnem po ročni oprasitvi, kjer nas je zanimalo kako na kalitev vpliva njihova zrelost in ali obstajajo razlike med posameznimi gojišči in strjevalcema.

Med poskusom smo spremljali razvoj semena in morfološko opredelili različne morfološke faze (preglednica 6). Začetek kalitve (morfološka faza 1) smo na gojiščih opazili med 9. in 50. dnem po inokulaciji. Morfološko fazo 2, ko protokorm predre testo, smo na gojiščih prvič opazili 31. dan. Morfološko fazo 3, ko protokorm zapusti testo, smo prvič opazili 50. dan. Pojav apikalnega poganjka (morfološka faza 4), smo prvič opazili med 83. in 202. dnem. Razvoj prve korenine (morfološka faza 5) smo na gojiščih prvič opazili med 99. in 230. dnem po inokulaciji. Morfološko fazo 6, kjer mikorizom razvije več kot eno korenino smo prvič opazili 133. dan.

V kalitvi semenskih zasnov med gojišči ni bilo statistično značilnih razlik, izračunano tveganje $p = 0,86$. Največje razlike so se kazale pri morfološki razvitosti, kje so se mikorizomi na gojiščih S in S ½ razvijali bolje kot na gojišču M. Vendar je med razvojem na gojiščih S in S ½ prihajalo do rjavenja mikorizomov, ki je bilo na gojišču M veliko manj izrazito. Tako lahko sklepamo, da organska oblika dušika v gojišču omeji rjavenje mikorizomov.

Število kalivih semen smo prešteli pred prvo subkultivacijo, 174 dni po inokulaciji prvih semenskih zasnov. V povprečju je največ 245 semen inokuliranih na gojišče M kalilo iz semenske glavice 7 odstranjene 54. dan po oprasitvi na Ljubelju. Približno polovico manj 114 semen iz semenske glavice 4, ki je bila pobrana 45. dan po oprasitvi na Ljubelju, je kalilo na gojišču S (preglednica 5).

Iz dobljenih rezultatov po metodi zelene semenske glavice lahko sklepamo, da je najprimernejši čas za odstranitev semenske glavice med 40. in 54. dnem po opraitvi. Pri tem je potrebno upoštevati, da na čas dozorevanja vplivajo okoljski dejavniki in variabilnost znotraj same vrste.

V drugem delu poskusa, kjer smo uporabili fiziološko zrela semena, nabrana v obdobju od leta 2000 do 2003 in 2005 do 2008 nas je zanimalo, kako na kalivost vpliva starost semena, vrsta gojišča in ali lahko s postopkom centrifugiranja zmehčamo semensko testo.

Število kalivih semen, fiziološko zrelega semena, smo prešteli 180 dni po inokulaciji na gojišče. Pri semenih nabranih v obdobju od leta 2000 do 2003 in 2005 do 2007 smo ugotovili, da seme ni kalilo na nobenem od uporabljenih gojišč. V nekaj primerih smo opazili le manjše nabrekanje embrija. Da semena niso kalila lahko pripišemo njihovi starosti in neprimernem skladiščenju, saj so bila hranjena pri sobni temperaturi.

Pri fiziološko zrelem semenu tekočega leta 2008 je skupno kalilo 13 semen. Začetek kalitve (morfološka faza 1) smo prvič opazili 22. dan po inokulaciji semena na vseh uporabljenih gojiščih. Nadaljnji razvoj smo opazili le na gojišču S1/2 in M. Morfološko fazo 6, kjer mikorizom razvije več kot eno korenino smo prvič opazili med 161. in 180. dnem po inokulaciji semena.

Nabrekanje embrijev kaže, da s centrifugiranjem lahko zmehčamo oz. poškodujemo testo. Vendar so v semenu prisotni še drugi mehanizmi, ki preprečujejo kalitev in jih s centrifugiranjem ni možno odpraviti.

Med poskusom nismo imeli večjih težav z okužbami. V prvem delu se je okužilo 30,5 % in v drugem zgolj 23,1 % semen v petrijevkah.

7 VIRI

- Arditti J. 1992. Fundamentals of Orchid Biology. New York, John Wiley & Sons: 712 str.
- Ballard W.W. 1987. Sterile propagation of *Cypripedium reginae* from seed. American Orchid Society Bulletin, 50: 935-946
- Bohanec B. 1992. Tehnike rastlinskih tkivnih kultur. Ljubljana, BF, Oddelek za agronomijo, Center za rastlinsko biotehnologijo in žlahtnjenje: 168 str.
- Camiel F.J. 2002. Artificial pollination of *Cypripedium* species.
<http://www.cypripedium.de/forum/pollination.pdf> (5.3.2009)
- 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 Press: 1262 str.
- Čušin B. 2003. Strokovna izhodišča za vzpostavljanje omrežja Natura 2000. Ljubljana, Biološki inštitut Jovana Hadžija: 234 str.
- Deacon J.W. 1997. Modern mycology. Oxford, Blackwell Science Ltd: 304 str.
- De Wit H.C.D. 1978. Rastlinski svet 2. Jugoslavija. Ljubljana, Mladinska knjiga: 252 str.
- Dressler R. L. 1981. The Orchids: Natural history and classification. Cambridge, Massachusetts, Harvard University Press: 332 str.
- George E.F. 1993. The propagation of orchids. V: Training manual for short course in orchids culture Lubag A.M. Los Banos, University of the Philippines, Ornamental Crops Division: 917-922
- Hegi G., Merxmüller H., Reisch H. 1980. Alpska flora. Ljubljana, Državna založba Slovenije: 65 str.
- Hicks A.J. 2000. Asymbiotic technique of Orchids seed germination. Chandler, The Seedbank Project: 134 str.
- Jevšnik T. 2006. Orhideje: Gojenje tropskih orhidej. Dobrovnik, Ocean Orchids: 149 str.
- Johanson T.R., Stewart S.T., Dutra D., Kene M.E., Richardson L. 2007. Asymbiotic and symbiotic seed germination of *Eulophia alta* – preliminary evidence for the symbiotic culture advantage. Plant cell tissue organ culture, 90: 313-323.

- Kauth P. 2005. In vitro seed germination and seedling development of *Calopogon tuberosus* and *Sacola lanceolata* var. *lanceolata*. Graduate school of the University of Florida: 91 str.
- Kačar N. 2000. Uporaba tehnik tkivnih kultur za in vitro razmnoževanje lepega čveljca (*Cypripedium calceolus* L.): diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 50 str.
- Košmelj K. 2001. Uporabna statistika. Ljubljana, Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani: 249 str.
- Lucke E. 1882. Samenstruktur und Samenkeimung europäischer Orchideen nach Veyret sowie weitere Untersuchungen. *Die Orchidee*: 33, 8-16.
- 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.
- Mukerji K.G., Manoharachary C., Chamola B.P. 2002. Techniques in mycorrhizal studies. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 551 str.
- Nilsson L.A. 1979. Anthecological studies on the lady's slipper *Cypripedium calceolus*. *Botanish Notiser*, 132: 329-347
- Pridgeon A. 1999. The illustrated encyclopedia of orchids. The Rocks, Landsowne Publishing Pty Ltd: 304 str.
- Ramsay M.M., Stewart J. 1998. Re-establishment of lady's slipper orchid (*Cypripedium calceolus* L.) in Britain. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 126: 173-181
- 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.
- Richardson K.A., Peterson R.L., Currah R.S. 1992. Seed reserves and early symbiotic protocorm development of *Platanthera hyperborea*. *Canadian Journal of Botany*, 70: 291-300
- 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.
- Smole J., Črnko J. 2000. Razmnoževanje sadnih rastlin. Ljubljana, Kmečki glas: 141 str.

- Stergaršek J. 2008. Navadna splavka (*Limodorum Abortivum*). Interno glasilo Instituta 'Jožef Stefan', 128: 15-16
- Stewart S.L., Kene M.E. 2006. Asymbiotic germination and in vitro seedling development of *Hebenaria macroceratitis*. *Plant cell tissue organ culture*, 86: 147-158
- Zettler L.W. 1997. Terrestrial orchids conservation by symbiotic seed germination: techniques and perspectives. *Selbyana*, 18: 40-45
- Valletta A., Brumo F., Attorre F., Pasqua G. 2008. Asymbiotic germination of some terrestrial European orchids from the Natural Regional Park of Simbruini Mountains (central Italy). *Caesiana*, 30: 25-30
- Werner D. 1992 *Symbiosis of plants and microbes*. London, Chapman & Hall: 389 str.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici izr. prof. dr. Zlati Luthar, za mentorstvo, koristne nasvete in strokovno pomoč pri diplomski nalogi.

Zahvalil bi se tudi Botaničnemu vrtu v Ljubljana in g. Guusu Smidu za podarjeno seme ter g. Sventeu Malmgrenu za nasvete in pomoč pri sestavi gojišča.

Hvala domačim, dekletu Špeli in vsem ostalim, ki ste mi na tak ali drugačen način pomagali v času študija.

Priloga A

Število kalivih in okuženih semen lepega čveljca na šestih gojiščih

Oznaka semena	Oznaka ponovitve	Oznaka gojišča					
		SP	SA	S 1/2 A	S 1/2 P	MP	MA
S.G. 1	1	103	76	37	93	x	0
	2	96	55	x	77	7	0
S.G. 2	1	x	5	32	6	10	2
	2	x	6	12	x	x	x
S.G. 3	1	13	11	15	13	21	7
	2	19	21	14	5	19	12
S.G. 4	1	x	x	x	x	x	x
	2	x	x	x	x	x	x
S.G. 5	1	220	8	50	x	40	54
	2	x	x	16	x	30	x
S.G. 6	1	16	27	18	11	74	54
	2	21	14	56	16	24	12
S.G. 7	1	x	x	167	14	6	0
	2	x	x	21	154	0	485
S.G. 8	1	x	x	0	x	x	x
	2	9	4	8	32	149	34
S.G. 9	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
2000	1	0	x	0	0	0	x
	2	0	0	x	0	0	0
2001	1	0	0	x	0	0	0
	2	x	0	0	0	x	0
2002	1	0	x	0	x	0	0
	2	-	-	-	-	-	-
2003	1	0	0	0	0	0	0
	2	-	-	-	-	-	-
2005	1	0	x	0	0	0	0
	2	x	0	0	x	0	x
2006	1	0	0	0	0	x	0
	2	0	x	0	0	0	0
2007	1	0	x	x	0	0	x
	2	-	-	-	-	-	-
2008	1	0	x	0	4	6	3
	2	0	0	0	2	0	0

Legenda: S.G. semenska glavica
x okužena petrijevka
- seme ni bilo sejano v ponovitvah

Priloga B

Izbor rastlin in peloda (prašne vrečke) za ročno opraševanje lepega čveljca v naravi in oblikovanje ter zori tev semenskih glavic po oploditvi



B1 - Rastlina lepega čveljca v naravi



B2 - Zbran pelod (lepljiv cvetni prah s prostimi pelodnimi zrni) pred ročnim opraševanjem



B3 - Ročno opraševanje



B4 - Zelena semenska glavica



B5 - Zrela semenska glavica tik pred odprtjem, viden počen šiv

Priloga C

Razkuževanje semenskih glavic in semen lepega čveljca ter inokulacija fiziološko različno zrelega semena na gojišče



C1 - Prerezana semenska glavica 5 s fiziološko nedozorelim semenom, odstranjena 40 dni po oprašitvi



C2 - Prerezana semenska glavica 9 z dozorelim semenom, temno rjave barve, odstranjena 64 dni po oprašitvi



C3 - Fiziološko nedozorelo seme inokulirano na gojišče v skupkih, 40 dni po oprašitvi



C4 - Semena inokulirana na gojišče, 65 dni po oprašitvi



C5 - Fiziološko zrelo seme v mikrocentrifugirki pred razkuževanjem



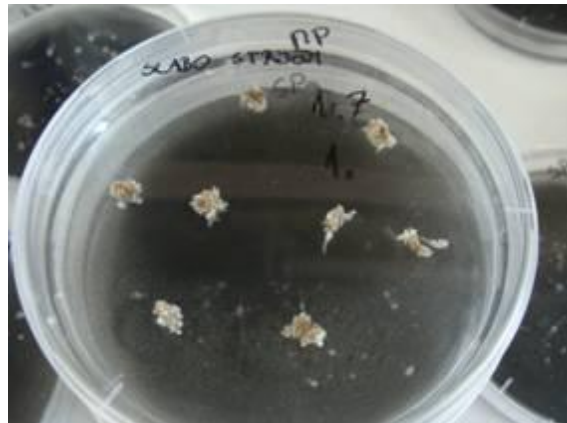
C6 - Fiziološko zrelo seme inokulirano na gojišče v kapljici vode

Priloga D

Razvoj semena in subkultivacija sejancikov



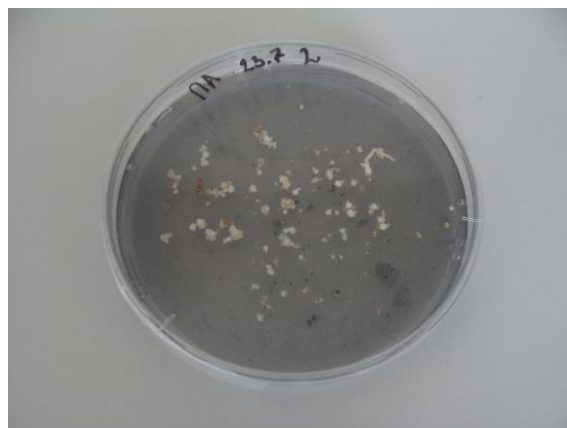
D1 - Zaradi velikega števila drobnih semenih smo 174 dni po inokulaciji prešteli samo semena, ki so kalila in so bila vidna s prostim očesom



D2 - Tesni skupki kalečih semen oz. protokormov pri semenski glavici 5



D3 - Razvitost mikorizomov na gojišču S $\frac{1}{2}$ A pri semenski glavici 7, 220 dni po inokualaciji



D4 - Razvitost mikorizomov na gojišču MA pri semenski glavici 7, 220 dni po inokulaciji



D5 - Sejančki z vsaj dvema koreninama (morfološka faza 6) po prvi subkultivaciji na sveže gojišče



D6 - Sejančki po drugi subkultivaciji v 600 ml gojilni posodi s filtrom

Se nadaljuje

Nadaljevanje



D7 - Porjaveli mikorizomi v različnih morfoloških fazah



D8 - Sejančki pripravljeni na periodo nizkih temperatur



D9 - Sejanček lepega čoveljca z enim poganjkom



D10 - Sejanček lepega čoveljca z dvema poganjkoma