

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Špela KOŠIR

**UPORABA ULTRAZVOKA ZA POSPEŠITEV
ASIMBIOTSKE KALITVE SEMEN ORHIDEJE
Bletilla striata (Thunb.)**

DIPLOMSKO DELO

Visokošolski strokovni študij - 1. stopnja

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Špela KOŠIR

**UPORABA ULTRAZVOKA ZA POSPEŠITEV ASIMBIOTSKE
KALITVE SEMEN ORHIDEJE *Bletilla striata* (Thunb.)**

DIPLOMSKO DELO
Visokošolski strokovni študij - 1. stopnja

**USE OF ULTRASOUND TO ACCELERATE THE ASYMBIOTIC
GERMINATION OF ORCHID SEEDS *Bletilla striata* (Thunb.)**

B. SC. THESIS
Professional Study Programmes

Ljubljana, 2012

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

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

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: akad. prof. dr. Ivan Kreft
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za agronomijo

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

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

Datum zagovora:

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

Špela Košir

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dv1
DK	UDK 582.59:631.547.1:631.53.01(043.2)
KG	terestična orhideja/ <i>Bletilla striata</i> /fiziološka starost/semce/ultrazvok/asimbiotska kalitev/morfološke faze
AV	KOŠIR, Špela
SA	LUTHAR, Zlata (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
LI	2012
IN	UPORABA ULTRAZVOKA ZA POSPEŠITEV ASIMBIOTSKE KALITVE SEMEN ORHIDEJE <i>Bletilla striata</i> (Thunb.)
TD	Diplomsko delo (Visokošolski strokovni študij - 1. stopnja)
OP	VIII, 33 str., 11 pregl., 19 sl., 27 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V poskus asimbiotske kalitve orhidej <i>Bletilla striata</i> so bila vključena nezrela in zrela semena. Nezrela semena so bila po pobiranju en mesec hranjenja pri sobni temperaturi in nato inokulirana na gojišče, medtem ko so bila zrela semena do poskusa hranjena pri 4 °C. Predvidevali smo, da nezrela semena še niso prešla v dormanco, zrela pa so se v obdobju hranjenja stratificirala. V postopku razkuževanja z 1,6% dikloroizocianurno kislino smo v fazi spiranja polovico nezrelih in zrelih semen za 8 minut izpostavili še hladnemu ultrazvoku, z namenom razrahljati celične stene teste in omogočiti vodi hitrejši dostop do kalčka. Po razkuževanju smo semena inokulirali na kalitveno gojišče A. V povprečju je bilo, ne glede na fiziološko zrelost, kar 35,2% semen brez kalčka. Največ semen s kalčki je nabrekli v 11 dneh na kalitvenem gojišču. V obdobju 54 dni so se najhitreje in najštevilčneje pojavile še morfološke faze: protokorm, rizoidi, list (i) in korenina (e) in to pri nezrelem semenu z ultrazvokom (ZS – UZ), sledilo je nezrelo seme brez ultrazvoka (ZS – 0). Rastline z vsaj dvema listoma in vsaj eno korenino smo po 96 dneh iz kalitvenega gojišča A subkultivirali na gojišče B. Na subkultivacijskem gojišču B so se v obdobju do 32. dne pojavile morfološke faze: 2 do 5 listov, več kot 5 listov, 1 do 2 korenini in 3 do 4 korenine. V obdobju od 32 do 54 dni sta se pojavili še morfološki fazi: rastline z bulbulusi in razraščanje. Ne glede na obravnavanje med enim in drugim obdobjem ni bilo bistvenih razlik v nastajanju listov, velika večina v povprečju 97% je imela 2 do 5 listov in v povprečju 3% rastlin je imelo več kot 5 listov. Med 32 in 54 dnem so zelo intenzivno nastajale korenine in bulbulusi. Pri nezrelem semenu z ultrazvokom (ZS – UZ) je bilo s 3 do 4 koreninami 59,5% rastlin, medtem ko pri zrelem semenu z ultrazvokom (SS – UZ) 41,2% rastlin. Največ 71,5% rastlin je imelo bulbuluse pri nezrelem semenu z ultrazvokom (ZS – UZ) in nekoliko manj 70% pri zrelem semenu brez ultrazvoka (SS – 0).

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dv1
DC UDC 582.59:631.547.1:631.53.01(043.2)
CX terrestrial orchid/*Bletilla striata*/physiological age of seeds/ultrasound/asymbiotic germination/ morphological stages
AU KOŠIR, Špela
AA LUTHAR, Zlata (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
PY 2012
TY USE OF ULTRASOUND TO ACCELERATE THE ASYMBIOTIC GERMINATION OF ORCHID SEEDS *Bletilla striata* (Thunb.)
DT B. Sc. Thesis (Professional Study Programmes)
NO VIII, 33 p., 11 tab., 19 fig., 27 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The immature and mature seeds of orchids *Bletilla striata* were included in the asymbiotic germination experiment. Immature seeds were stored for one month at room temperature and then inoculated on the medium, while the mature seeds were stored at 4 °C until the experiment. We assumed that immature seeds have not yet passed into dormancy, while mature were stratified for the retention period. In the process of disinfection with 1.6% dichloroisocyanuric acid, we exposed both seed types to 8 minutes of cold ultrasound. The reason for doing so was to break up the cell wall and enable faster process of the water to the embryo. After disinfection, seeds were inoculated in the germination medium A. On average, regardless of physiological maturity, 35.2% of seeds were without embryo. Most of the seeds with embryo have swollen in 11 days on germination medium. In a period that lasted for 54 days, the fastest and most numerous appearances in morphological stages were: protocorms, rhizoids, leaf, leaves and root or roots and that in the immature seed with ultrasound (ZS - UZ), followed by the immature seed without ultrasound (ZS - 0). Plants with at least two leaves and at least one root were subcultivated after 96 days from germination medium A, to growth medium B. After 32 days of subcultivating on medium B new morphological stages occurred: 2 to 5 leaves, more than 5 leaves, 1 to 2 roots and 3 to 4 roots. In the period that lasted from 32 to 54 days, two new morphological stages occurred: plants with bulbs and proliferation. Irrespective of treatment between one and other period there were no differences in the formation of leaves. A large majority, 97% had 2 to 5 leaves on average and 3% of plants had more than 3 leaves on average. We noticed an intense growth of roots and bulbs in the period between 32nd and 54th day. 59.5% of immature seeds on which we used ultrasound (ZS - UZ) had 3 to 4 roots, while in the mature seed that number reached only 41.2% with ultrasound (SS - UZ). Highest percentage of plants that had bulbs was 71.5% in immature seeds with ultrasound (ZS - UZ) and 70% of mature seeds without ultrasound (SS - 0).

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	II
KEY WORDS DOCUMENTATION	III
KAZALO VSEBINE	IV
KAZALO PREGLEDNIC	V
KAZALO SLIK	VI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN RAZISKAVE	1
1.2 DELOVNA HIPOTEZA	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 RAZŠIRJENOST IN TIP RASTI ORHIDEJ	2
2.1.1 Oblika rasti	3
2.1.2 Zgradba cveta	4
2.1.3 Oprašitev	5
2.1.4 Oploditev in razvoj semena	6
2.1.5 Stratifikacija	6
2.1.5 Dormanca	7
2.2 SISTEMATIKA IN OPIS ORHIDEJE <i>Bletilla striata</i>	8
2.3 UPORABNA VREDNOST ORHIDEJE <i>Bletilla striata</i>	9
3 MATERIAL IN METODE	10
3.1 RASTLINSKI MATERIAL	10
3.2 METODE DELA	10
3.2.1 Priprava gojišča	10
3.2.2 Sestava gojišča	11
3.2.3 Razkuževanje semen	12
3.2.4 Inokulacija semen na gojišče A	122
3.2.5 Subkultivacija rastlin na gojišče B	13
3.2.6 Gojenje	14
3.2.7 Bonitiranje	14
4 REZULTATI	15
4.1 ASIMBIOTSKA KALITEV NA GOJIŠČU A	15
4.2 SUBKULTIVACIJA NA GOJIŠČE B	19
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	26
5.1 RAZPRAVA	26
5.1.1 Prazna semena	26
5.1.2 Asimbiotska kalitev na gojišču A	26
5.1.3 Subkultivacija na gojišče B	27
5.2 SKLEPI	28
6 POVZETEK	30
7 VIRI	32
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Sestava gojišča za kalitev (A) in za subkultivacijo (B) orhidej <i>B. striata</i>	11
Preglednica 2: Število praznih in nabreklih semen ter protokormov v različnih morfoloških fazah 11 dni po inokulaciji semen <i>Bletilla striata</i> na gojišče A	15
Preglednica 3: Število nabreklih semen, protokormov in rastlin v različnih morfoloških fazah 30 dni po inokulaciji semen <i>Bletilla striata</i> na gojišče A	16
Preglednica 4: Število nabreklih semen, protokormov in rastlin v različnih morfoloških fazah 54 dni po inokulaciji semen <i>Bletilla striata</i> na gojišče A	18
Preglednica 5: Odstotki posameznih morfoloških faz v 11, 30 in 54 dneh po inokulaciji semen <i>Bletilla striata</i> na gojišče A	19
Preglednica 6: Število rastlin <i>Bletilla striata</i> z listi v različnih morfoloških fazah 32 dni po subkultivaciji na gojišče B	20
Preglednica 7: Število rastlin <i>Bletilla striata</i> s koreninami v različnih morfoloških fazah 32 dni po subkultivaciji na gojišče B	20
Preglednica 8: Število rastlin <i>Bletilla striata</i> z listi v različnih morfoloških fazah 54 dni po subkultivaciji na gojišče B	21
Preglednica 9: Število rastlin <i>Bletilla striata</i> s koreninami v različnih morfoloških fazah 54 dni po subkultivaciji na gojišče B	22
Preglednica 10: Število rastlin <i>Bletilla striata</i> brez in z bulbulusi ter razraščanje 54 dni po subkultivaciji na gojišče B	23
Preglednica 11: Odstotki posameznih morfoloških faz v 32 in 54 dneh po subkultivaciji rastlin <i>Bletilla striata</i> na gojišče B	25

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Tip rasti orhidej: A – epifitni (Top Creek..., 2009); B – terestični (Društvo ljubiteljev..., 2005)	3
Slika 2: Oblika rasti orhidej: A - monopodialna; B – simpodialna (Epifit, 2004)	4
Slika 3: Posamezni deli cveta orhidej (Rittershausen W. in Rittershausen B., 2001; Jevšnik, 2002)	5
Slika 4: Orhideja <i>Bletilla striata</i> : A - oblika cveta (<i>Bletilla striata</i> ..., 1998); B - oblika rasti (Blog of..., 2011)	8
Slika 5: Semena orhideje <i>Bletilla striata</i> : A – zelena semenska glavica; B – semena pred razkuževanjem; C – postopek razkuževanja	12
Slika 6: Inokulirana semena orhideje <i>Bletilla striata</i> na kalitveno gojišče A	13
Slika 7: Gojenje orhidej <i>Bletilla striata</i> : A – na kalitvenem gojišču A; B – na subkultivacijskem gojišču B	13
Slika 8: Odstotek nabreklih semen in nastalih protokormov v različnih morfoloških fazah 11 dni po inokulaciji semen <i>Bletilla striata</i> na gojišče A	15
Slika 9: Prazno seme in morfološke faze kalitve semen <i>Bletilla striata</i> 11 dni po inokulaciji na gojišče A, pri 20 kratni povečavi	16
Slika 10: Odstotek nabreklih semen, protokormov in rastlin v različnih morfoloških fazah 30 dni po inokulaciji semen <i>Bletilla striata</i> na gojišče A	17
Slika 11: Morfološke faze 30 dni po inokualciji semen <i>Bletilla striata</i> na gojišče A: A – protokorm z rizoidi in zametkom lista; B – protokorm z listom; C – listi in korenina	17
Slika 12: Odstotek nabreklih semen, protokormov in rastlin v različnih morfoloških fazah 54 dni po inokulaciji semen <i>Bletilla striata</i> na gojišče A	18
Slika 13: Rastlina <i>Bletilla striata</i> z več kot 2 listoma in korenino primerna za subkultivacijo na gojišče B	19
Slika 14: Odstotek rastlin <i>Bletilla striata</i> z listi v različnih morfoloških fazah 32 dni po subkultivaciji na gojišče B	20
Slika 15: Odstotek rastlin <i>Bletilla striata</i> s koreninami v različnih morfoloških fazah 32 dni po subkultivaciji na gojišče B	21

Slika 16: Odstotek rastlin <i>Bletilla striata</i> z listi v različnih morfoloških fazah 54 dni po subkultivaciji na gojišče B	22
Slika 17: Odstotek rastlin <i>Bletilla striata</i> s koreninami v različnih morfoloških fazah 54 dni po subkultivaciji na gojišče B	23
Slika 18: Odstotek rastlin <i>Bletilla striata</i> brez in z bulbulusi ter razraščanje 54 dni po subkultivaciji na gojišče B	24
Slika 19: Morfološke faze orhidej <i>Bletilla striata</i> 54 dni po subkultivaciji na gojišče B: A – rastlina s tremi listi in koreninami ter bulbulusom; B – razraščanje	24

SIMBOLI IN OKRAJŠAVE

ZS – UZ nezrelo oz. zeleno seme izpostavljeno ultrazvoku

SS – UZ zrelo oz. staro seme izpostavljeno ultrazvoku

ZS – 0 nezrelo oz. zeleno seme brez ultrazvoka

SS – 0 zrelo oz. staro seme brez ultrazvoka

1 UVOD

Orhideje so zaradi barvitih cvetov in različnih oblik tržno zelo priljubljene. Seme kali v naravi le ob prisotnosti mikoriznih gliv, zato je bila nadomestitev gliv oziroma njihovih proizvodov z dodanimi hranili v gojišča velika tržna pridobitev glede razmnoževanja orhidej s semeni. Knudson je leta 1922 je dokazal, da semena orhidej lahko kalijo tudi brez mikoriznih gliv, t.j. asimbiotsko, na sterilnem gojišču, ki vsebuje vsa potrebna hranila. Pozneje je bilo narejenih še mnogo poskusov z različnimi vrstami tropskih orhidej na različnih gojiščih. Nekateri poskusi so zahtevali večletna opazovanja in proučevanja preden so dokončno ugotovili, na katerem gojišču posamezne vrste boljše uspevajo (Georg, 1993).

V poskus asimbiotske kalitve so bila vključena nezrela in zrela semena terestične orhideje *Bletilla striata* (Thunb.), ki raste na prostem. To je rastlina pokončne rasti, dekorativnih rožnatih do vijoličastih cvetov. Je terestična orhideja, kar pomeni, da raste v zemlji in ne kot epifitske orhideje, ki rastejo visoko na drevesih.

1.1 NAMEN RAZISKAVE

Pri večini rastlin zmernege pasu so se razvile zahteve, da mora seme določen čas pred začetkom kalitve preživeti v hladu. Za večino terestičnih orhidej je znano, da seme kali spomladi. Preko zime se testa omehča, razgradijo se kemične snovi, ki zavirajo rast in začnejo se fiziološki procesi kalitve v embriju. Prekinitev počitka z mehčanjem teste lahko dosežemo tudi z uporabo ultrazvoka, ki omogoči razrahljanje celičnih sten teste. Namen naloge je bil s hladnim ultrazvokom pospešiti razrahljanje teste in omogočiti hitrejši vstop vodi in hranilom v notranjost semena ter pospešiti kalitev.

1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Predvidevali smo, da s pomočjo ultrazvoka v kombinaciji z nizko temperaturo pospešimo fiziološke procese v semenu in asimbiotsko kalitev. Pričakovali smo tudi, da je zrelo seme, ki je bilo hranjeno pri 4 °C, stratificirano in da ni bistvenih razlik med asimbiotsko kalitvijo tega semena in nezrelega, ki še ni prešlo v fazo dormance.

2 PREGLED OBJAV

2.1 RAZŠIRJENOST IN TIP RASTI ORHIDEJ

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

Primerki te velike družine se nahajajo po vsem svetu, z izjemo Antarktike in nekaterih oddaljenih otokov. Uspevajo v vseh okoljih, razen v za večino rastlin ekstremnih razmerah, kot so na primer morja, suhe puščave, najhladnejši predeli. Večina komercialno zanimivih orhidej izvira iz gorskih predelov tropskega pasu, kjer so ponoči nizke temperature in zelo visoka relativna zračna vlaga. V Sloveniji rastejo le orhideje terestičnega tipa iz rodov *Cypripedium* (lepi čeveljc), *Nigritella* (murka), *Orchis* (kukavice), *Ophrys* (mačje uho), itd. (Martinčič in sod., 1999).

Kukavičevke so po obliki rasti zelo raznolike. Nekatere zrastejo do starosti komaj nekaj milimetrov, medtem ko druge zrastejo v prave več metrske orjake, katerih masa lahko presega tisoč kilogramov. Določene vrste rastejo v krošnjah dreves (slika 1A), druge na tleh (slika 1B). Imenujemo jih terestične orhideje. Slednje cvetijo le na prostem (Pridgeon, 1999).

Večina terestičnih orhidej je iz poddružine Cypripedioideae, medtem ko je največ orhidej epifitnih ali litofitnih uvrščenih v poddružino Orchidoideae. Večina epifitnih orhidej se nahaja v tropskem območju, nekaj jih uspeva tudi v subtropskem. Terestične orhideje rastejo v tleh in s pomočjo korenin črpajo vodo in hranilne snovi iz zemlje (slika 1A in B) (Pridgeon, 1999).

Epifitne orhideje rastejo predvsem na drevesnih vejah, na skalovju in tako dobivajo vse potrebne snovi skozi korenine, s katerimi se ukoreninijo. Vodo črpajo s posebnimi zračnimi koreninami, ki vsrkajo tudi zračno vlago. Večina epifitnih orhidej ima vodoravno podzemno steblo ali rizom, iz katerega izraščajo pogosto močno odebeljeni in olistani stebelni gomolji ali neprave čebulice (pseudobulbili oz. bulbulusi), ki so namenjeni predvsem shranjevanju vode (Pridgeon, 1999).



A



B

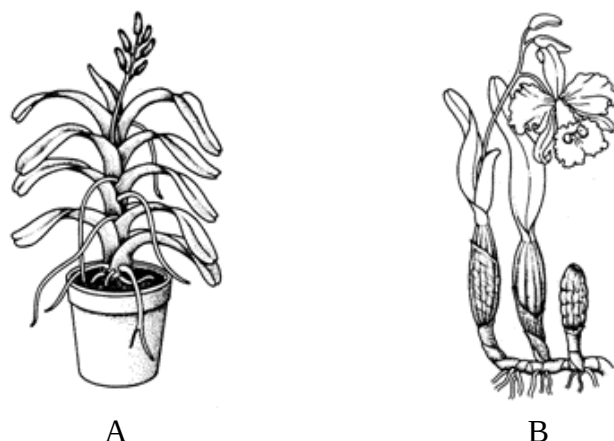
Slika 1: Tip rasti orhidej: A – epifitni (Top Creek..., 2009); B – terestični (Društvo ljubiteljev..., 2005)

2.1.1 Oblika rasti

Orhideje imajo dve osnovni obliki rasti, monopodialno in simpodialno.

Orhideje s monopodialno rastjo imajo le eno os rasti in sicer vertikalno oz. prevešujočo. Rast je nedeterminirana, saj se glavno steblo podaljšuje z vsakim novim listom (Pridgeon, 1999). Rast monopodialnih orhidej ni tako raznolika kot pri simpodialnih, so pa razlike opazne predvsem v velikosti stebela. Steblo je zelo kompaktno (*Phalaenopsis*), lahko pa je hitrorastoče kot vzpenjavka (*Vanilla*). Pri določenih rodovih rastejo stranski poganjki, ki rastejo iz glavnega stebela in tako odstopajo od pravila ene osi rasti. Prav tako tudi cvetno steblo in korenine izraščajo stransko iz stebela (slika 2A) (Kramer, 1997).

Orhideje s simpodialno rastjo poženejo vsako leto nov poganjek iz osnove lanskoletne rasti. Orhideje tega rastnega tipa tvorijo neprave čebulice. To so odebeljeni deli stebela, ki služijo kot skladišče vode in hrane. Rastlinam pomagajo preživeti obdobje pomanjkanja vlage. Velikost nepravih čebulic je različna, lahko so velike nekaj milimetrov do 20 cm, najpogostejše so jajčaste, sploščene ali podolgovate oblike. Pri simpodialnih orhidejah požene cvetno steblo iz vrha dozorele neprave čebulice ali iz njegovega vznožja (slika 2B) (Kramer, 1997).



Slika 2: Oblika rasti orhidej: A - monopodialna; B – simpodialna (Epifit, 2004)

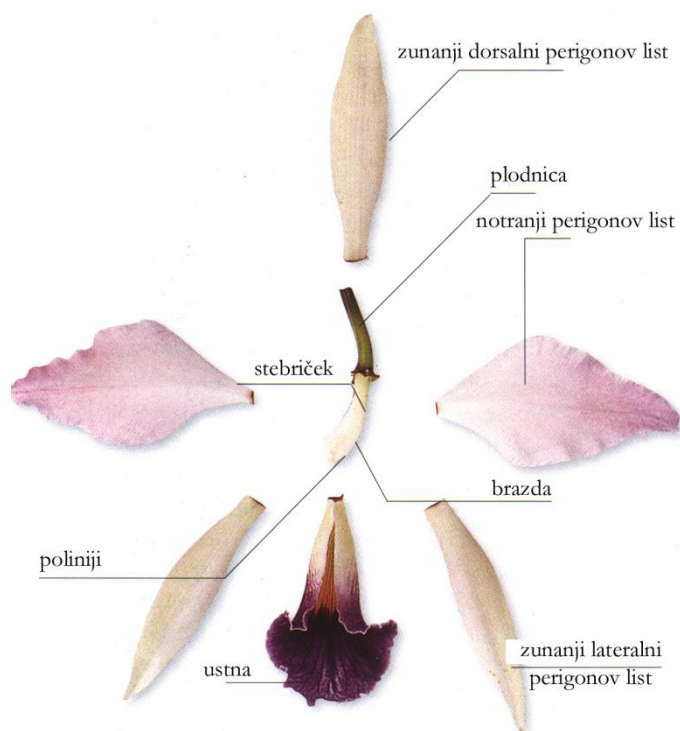
2.1.2 Zgradba cveta

Cvetovi orhidej so sestavljeni iz treh zunanjih časnih listov (sepala) in treh notranjih venčnih listov (petala). Časni in venčni listi so pri orhidejah obarvani, medtem ko so pri večini ostalih cvetočih rastlinah časni listi večinoma zeleni in so obarvani le venčni listi. Za vse orhideje velja, da so v vertikalni ravnini cvetovi razdeljeni na dve enaki polovici, so somerni. Večina orhidej ima tri ločene čašne liste s simetričnim razmikom na hrbtu cveta. Zgornji časni list je simetričen, medtem ko sta ostala čašna lista enaka po velikosti in obliki, le da sta zrcalno nameščena v cvetu in ločena ter omejena s kotom med venčnimi listi (Kramer, 1997).

Trije venčni listi predstavljajo notranji del obroča. Najnižji venčni list je ponavadi močno razširjen in najbolj obarvan. Imenuje se medena ustna (labellum) in ima nalogo privabljati žuželke. Pri nekaterih vrstah orhidej ima medena ustna obliko določene vrste žuželke, ki tisto orhidejo običajno oprašuje. Medena ustna se pri večini podaljša v ostrogo, v kateri so nektarne žleze. V cvetovih, ki nimajo ostroge, so nektarne žleze v zadnjem delu medene ustne ali pa jih sploh ni. Ostala venčna lista sta pri večini nameščena drug čez drugega na horizontalni osi in sta najbolj spremenljiva od vseh cvetnih delov. Pri nekaterih vrstah so venčni listi široki, pogosto nagubani in močno obarvani (Kramer, 1997). Pri večini orhidej so lahko vsi cvetni deli vrstno značilni.

Edini namen lepote orhidej, predvsem cvetov v naravi je, da privabijo ustreznega opraševalca, ki je lahko čebela, osa, netopir, večča ali ptica (Kramer, 1997). Cvetovi orhidej se ločijo od cvetov drugih cvetnic v zgradbi, številu prašnikov, pelodu in načinu opraševanja. *Cypripedium calceolus* ima dva prašnika, medtem ko jih ima večina le po enega. Prašnik sestavljata dva polinija. Prašnik z vratom pestiča, lepljiva žleza ali rostelum

nad zgornjim delom brazde in brazda sestavljajo stebriček ali ginostemij, ki predstavlja značilno tvorbo orhidej (Ravnik, 2002). Plodnica pri kukavičevkah je podrasla, ker leži pod točko izraščanja vseh ostalih delov cveta (Pridgeon, 1999).



Slika 3: Posamezni deli cveta orhidej (Rittershausen W. in Rittershausen B., 2001; Jevšnik, 2002)

2.1.3 Oprašitev

Oprašitev in oploditev sta uspešni, ko je cvet dozorel in odprt. Pri vrstah, ki cvetijo le kratek čas, se oprašitev zgodi v jutranjem času, ko se cvet popolnoma odpre. Vrste, ki dolgo cvetijo, imajo lahko cvetove odprte celo teden ali več, preden se cvet opraši. Najboljši čas za oprašitev je takrat, ko cvet najbolj diši. Starejši, odcveteli cvetovi niso primerni za oprašitev, ker imajo brazde pestiča izsušene (Hicks, 2000).

Opraševanje poteka na poseben način. Večina orhidej se navzkrižno oprašuje so alogamne ali tujeprašne. Poznamo tudi avtogamne orhideje, kar pomeni, da se oprašujejo znotraj ene rastline (samoprašnice). Obstajajo tudi orhideje, ki so kleistogamne, kjer pride do samooprašitve, še preden se cvet odpre (Ravnik, 2002). Alogamne orhideje oprašujejo žuželke. Ko žuželka prileti na medeno ustno in hoče priti do nektarja v ostogi, se dotakne z glavo lepljive ploščice - polinarija. Ta ostane prilepljena vse dokler žuželka ne prileti na

drugi cvet, kjer z glavo zadene ob lepljivo brazdo in kavdikula se upogne in polinarij se prilepi na brazdo.

2.1.4 Oploditev in razvoj semena

Ko pade polinij, ki je masa zlepljenih pelodnih zrn na brazdo pestiča, pride do oprasitve in prične se proces oploditve. Ko pelodna cev s spermalnima celicama doseže plodnico se spolni celici združita in tvorita zigoto, ki je prva celica sporofitne generacije (Moore in sod., 1998). Zrelo seme je sestavljeno le iz embrija in teste (Pridgeon, 1999).

Oploditev se začne 50 do 80 dni po oprasitvi, delitev zigote pa 2 do 30 dni za tem. Prva delitev celic je ponavadi transverzalna, kjer nastaneta bazalna in terminalna celica. Ta delitev polarizira embrijo na zgornji del, iz katerega se bo razvil poganjek in spodnji del, iz katerega se bo razvila korenina (Arditti, 1992).

Pri večini orhidej je embrionalno tkivo na začetku razvoja nediferencirano, do zrelosti pa se tkiva specializirajo. Zrel embrij ima primarni endosperm, protoderm (bodoča povrhnjica), prokambij (bodoči prevajalni sistem), bazalni meristem, apikalni meristem in klične liste. Vse celice vsebujejo zaloge hrane v obliki lipidov in beljakovinskih telesc. Škrobnih telesc je malo ali pa jih sploh ni (Arditti, 1992).

Ob razvoju ploda oz. semenske glavice ni nujno, da je seme tudi že dozorelo, kajti pri posameznih vrstah je seme popolnoma dozorelo šele ko semenska glavica počí. Semena orhidej so zelo majhna, lahka in vsebujejo običajno še nedozorel embrij znotraj perikarpa (Georg, 1993).

V semenski glavici se razvije od 20 - 50 lahko tudi do 4 milijone semen (Arditti, 1992). Dolga so od 0,05 do 6,0 mm in široka od 0,01 do 0,9 mm. Teža semen se giblje od 0,31 do 24 µg. Testa ali semenska ovojnica je pri večini transparentna in ima veliko večji volumen kot embrij, ki ga varuje pred poškodbami. Zaradi majhne specifične mase lahko semena lebdiyo v zraku in prepotujejo ogromne razdalje. Zunanja plast teste je relativno vodoodporna, kar omogoča dolgotrajno plavanje na vodi (Arditti in Ghani, 2000).

Dozorevanje semena je vrstno pogojeno, lahko traja od 7 tednov pa do enega leta.

2.1.5 Stratifikacija

Semena mnogih rastlinskih vrst niso takoj kaljiva, čeprav bi razmere v okolju kot so zadostna količina vode, primerna temperatura, sicer kalitev dovoljevale. Vzroki za tak pojav, ki ga imenujemo počitek ali dormanca so lahko različni. V nekaterih primerih lahko

počitek semen preneha, potem ko so določen čas izpostavljena nizkim temperaturam (0 – 10 °C). Taki izpostavitvi kaljivosti rečemo stratifikacija (Vodnik, 2012).

2.1.6 Dormanca

V večini ekosistemov so rastline med letom v določenem obdobju izpostavljene razmeram, ki so do te mere neugodne, da ne omogočajo rasti in razvoja. Ključno je, da tisti deli rastline, ki imajo regeneracijsko sposobnost, tako obdobje uspešno preživijo. Za uspešen razvoj naslednje generacije je pomembno preživetje semen. Semena mnogih rastlinskih vrst so velikokrat kaliva šele, potem ko preteče nekaj časa od konca njihovega razvoja na materinski rastlini. Počitek ali dormanca semenom omogoča preživetje neugodnih razmer, poleg tega pa podaljša tudi čas za njihovo razširjanje. Dormanca izvira iz različnih mehanizmov, ki jih lahko povezujemo ali s kalčkom ali pa s strukturami, ki ga obdajajo, endospermom, perikarpom in semensko lupino - testo (Vodnik, 2012).

Semenska lupina lahko zaradi voščene kutikule, predstavlja oviro za vstop vode do kalčka. Podobno je lahko omejen tudi dostop kisika, kar zavira dihanje kalčka. Za nežno korenčico lahko semenska lupina predstavlja tudi mehansko oviro, ki preprečuje njen prodor. V nasprotni smeri semenska lupina zadržuje v semenu nastale kemijske snovi, ki inhibirajo razvoj kalčka. V njej in v perikarpu je moč najti visoke koncentracije takih inhibitorjev (Vodnik, 2012).

Dormanco, ki izvira iz samega kalčka, povezujemo s prisotnostjo inhibitorjev kalitve, npr. abscizinske kisline in odsotnostjo promotorjev kalitve, npr. giberlinov. Za vzdrževanje dormance je pri semenih potrebna sinteza abscizinske kisline. Prekinitev dormance je največkrat povezana s padcem razmerja med abscizinsko kislino in giberlini. Do spremembe količine teh dveh hormonov pride zaradi delovanja anaboličnih in kataboličnih encimov, ki sodelujejo v njuni presnovi, odzivajo pa se na razvojne in okoljske dejavnike. Med zadnjimi lahko izpostavimo temperaturo in svetlobo. Pri nekaterih vrstah rastlin, ki za kalitev potrebujejo izpostavitve mrazu (stratifikacija), se ob tem količina abscizinske kisline glede na količino giberlinov zmanjša. Dormanco takih semen prekinemo tudi z namakanjem v raztopini giberlina, ne da bi bilo potrebno tretiranje z mrazom. Pri drugih vrstah rastlin, ki imajo drobna semena z malo hranili, poznamo fotodormanco. Njihov počitek prekinja svetloba, in sicer ustrezno veliko razmerje med kratkovalovno in dolgovalovno rdečo svetlobo, ki aktivira fitokrom. Aktivacija fitokroma vodi v sintezo giberlinov (Vodnik, 2012).

2.2 SISTEMATIKA IN OPIS ORHIDEJE *Bletilla striata*

DEBLO: Spermatophyta - semenke

PODDEBLO: Magnoliophytina (Angiospermae) - kritosemenke

RAZRED: Liliopsida (Monocotyledoneae) - enokaličnice

PODRAZRED: Liliidae

NADRED: Orchidanae

RED: Orchidales - kukavičevci

DRUŽINA: Orchidaceae - kukavičevke

PODDRUŽINA: Orchidoideae

ROD: *Bletilla*

VRSTA: *striata*

Bletilla striata (Thunb.) Rchb. f.

Temnejše cvetoče (roza do temno vijolične) vrste *Bletilla striata* izvirajo iz Kitajske in Japonske, svetlejše cvetoče (bele, rumene) iz Tajvana in Vietnama. Je simpodialna, terestična oz. na tleh rastoča orhideja, s pokončno rastjo in suličastimi listi. Na poganjek požene štiri do šest listov dolgih manj kot 15 cm. Večina rastlin zraste v višino približno 30 cm. Vsak list ima cevasto listno steblo. Prvi list ne oblikuje listnega stebila, drugi list pa oblikuje majhno elipsasto steblo. Pravi list je podolgovato suličast in na koncu priostren. List lahko zraste 20 – 30 cm v dolžino in 5,5 cm v širino. Listi so nameščeni izmenično v dveh vertikalnih nizih. Na vrhu poganjka izrašča klasasto socvetje s 6 – 10 cvetovi, ki se odpirajo postopoma, od tistega, ki leži najnižje do tistega cveta, ki leži najvišje. Cvetovi se odpirajo zaporedoma, istočasno so odprti 3 – 4 cvetovi, ki cvetijo približno en mesec. Cvetijo blede rožnate do temno vijolično, belo, rumeno, oranžno s podobnimi cvetnimi in venčnimi listi. Medena ustna ima nekaj nagubanih brazd, ki so lahko v isti ali drugi barvi kot preostali cvet (Orchid .., 2004, cit. po Zupan, 2004).



A



B

Slika 4: Orhideja *Bletilla striata*: A - oblika cveta (Bletilla striata..., 1998); B - oblika rasti (Blog .., 2011)

2.3 UPORABNA VREDNOST ORHIDEJE *Bletilla striata*

Bletilla striata vse bolj pridobiva na pomenu tudi v Evropi, kot okrasna rastlina in kot vir farmakoloških učinkovin. Je nezahtevna za gojenje, dobro prezimi tudi pri nas in je zato zelo primerna za zasaditev na zelenicah v vrtovih in parkih. Pozno jeseni spusti liste oz. posušeni listi pokrijejo bulbuluse pred poškodbami živali (Brickell, 1996; Strong, 2000).

Farmakološke učinkovine, med katerimi so predvsem astrigentne snovi, ki jih pridobivajo iz votlih stebel (Yeung, 1985) se že več tisočletij uporabljajo v kitajskem zdravilstvu. Pridobivajo pa vse večjo vlogo v sodobnem zdravljenju tudi v Evropi. Njene učinkovine delujejo protibakterijsko, protivnetno, kot pomirjevalo, pospešujejo regeneracijo tkiva in celjenje ran, zmanjšujejo otekline, vplivajo na strjevanje krvi in na zaustavitve krvavitev (Singh in Duggal, 2009). Pomembno vlogo imajo pri zdravljenju jetrnih tumorjev (Qian in sod., 2003). Raziskave Diaoa in sod. (2008) navajajo, da polisaharidi krepijo mehanizem celjenja ran, ker vplivajo na makrofage.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 RASTLINSKI MATERIAL

V poskus asimbiotske kalitve smo vključili nezrela semena orhideje *Bletilla striata*, ki raste na prostem v Ljubljani. Zelene semenske glavice smo pobrali v začetku septembra 2010. Poleg nezrelih semen, smo v poskusu uporabili tudi zrela semena iste rastline, ki so bila pobrana konec septembra 2008 ter so bila do uporabe 12.11.2010 hranjena v hladilniku pri 4 °C.

3.2 METODE DELA

Semena smo pred inokulacijo na gojišče površinsko razkužili z 1,66% dikloroizocianurno kislino (Sigma-Aldrich). Razkuževanje je potekalo pri sobni temperaturi 8 minut in nadaljevali 2 minuti z ultrazvokom pri 4 °C v ultrazvočni kopeli Somis4, proizvajalca Iskra. Trikratno spiranje po 2 minuti smo prav tako opravili z ultrazvokom pri 4 °C. Seme, ki je bilo uporabljeno kot kontrola smo razkuževali 10 minut in nadaljevali s trikratnim spiranjem po 2 minuti pri sobni temperaturi brez ultrazvoka. Zrelo oziroma staro seme iz leta 2008, hranjeno do inokulacije v hladilniku pri 4 °C smo označili SS. Nezrelo oziroma zeleno seme iz leta 2010, pa smo označili ZS. Semena, ki so bila izpostavljena ultrazvoku smo označili z UZ ter tista brez ultrazvoka z 0.

Oznake obravnavanj:

- ZS – UZ (nezrelo oz. zeleno seme izpostavljeno ultrazvoku),
- SS – UZ (zrelo oz. staro seme izpostavljeno ultrazvoku),
- ZS – 0 (nezrelo oz. zeleno seme brez ultrazvoka),
- SS – 0 (zrelo oz. staro seme brez ultrazvoka).

3.2.1 Priprava gojišča

Kalitveno gojišče oz. gojišče A, ki smo ga uporabili je gojišče proizvajalca Sigma-Aldrich z oznako P1056. Stehtali smo 57.2 g/l kompleksnega gojišča in ga pretresli v litrsko čašo ter prelili z bidestilirano vodo in stopili z mešanjem s teflonskim magnetom na električnem mešalniku. Z bučko smo določili volumen gojišča. Željen pH 5,4, smo uravnali z dodajanjem KOH oziroma HCl. Gojišče smo nato prelili v 1 l Schott-ovo steklenico, v katero smo predhodno stehtali 2,6 g/l strjevalca Phytigel (preglednica 1). Vse skupaj smo nato 20 minut avtoklavirali pri 121 °C in tlaku 1,1 bar (110 kPa). Tekoče gojišče smo nato v komori za aseptično delo, v kateri so potekala tudi vsa ostala dela, prelili v petrijevke premera 90 x 15 mm.

Rastno (subkultivacijsko) gojišče oz. gojišče B je bilo sestavljeno iz mikroelementov gojišča MS (Murashige in Skoog, 1962) in makroelementov gojišča B5 (Gamborg in sod., 1968). Ostale sestavine, razen banane v prahu in oglja, so bile povzete po Hinnen in sod. (1989). Pretresli smo jih v čašo ter dodali bidestilirano vodo in nekatere mikroelemente iz

založne raztopine, da smo ohranili natančnost (preglednica 1). Postopek priprave in avtoklaviranja je bil enak kot pri kalitvenem gojišču A le, da smo ga prelili v petrijevke premera 90mm x 20 mm.

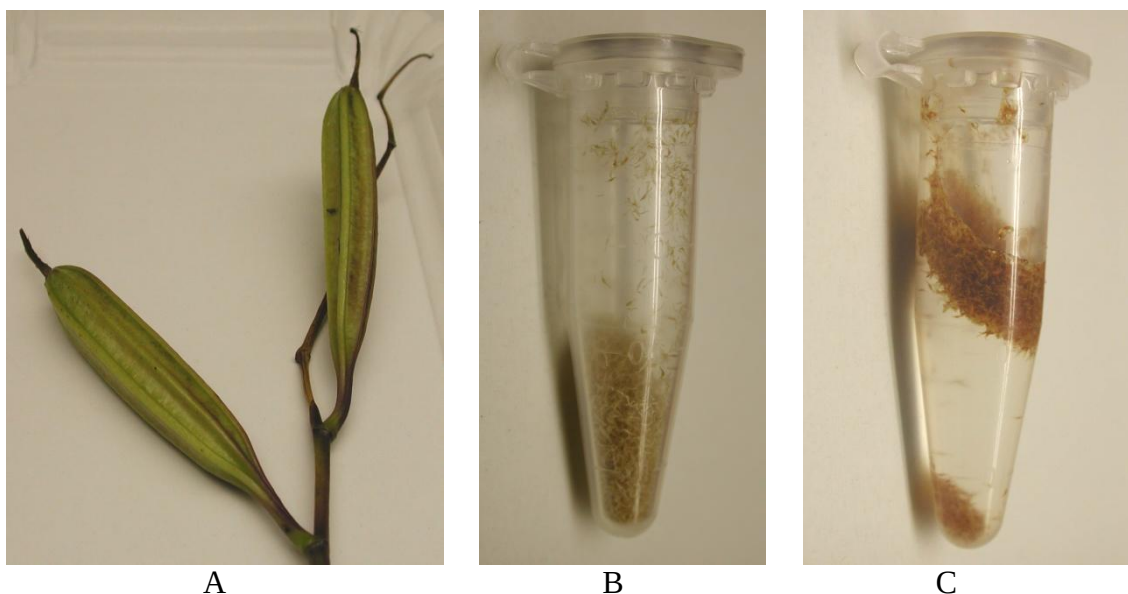
3.2.2 Sestava gojišča

Preglednica 1: Sestava gojišča za kalitev (A) in za subkultivacijo (B) orhidej *B. Striata*

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

3.2.3 Razkuževanje semen

Zeleno semensko glavico (slika 5A) smo prerezali in seme razdelili v dve mikrocentrifugirki ter dodali 0,8 ml 1,66% dikloroizocianurne kisline, ki je vsebovala 2 – 3 kapljice močila Tween 20 (Sigma-Aldric) (slika 5B) (Jevšnik, 2002). Semena ene mikrocentrifugirke smo po 8 minutah razkuževanja pri sobni temperaturi in nekajkratnem mešanju s pretresanjem izpostavili ultrazvoku za 2 minuti pri 4 °C. Semena druge mikrocentrifuge pa smo 10 minut razkuževali z nekajkratnem pretresanju pri sobni temperaturi brez ultrazvoka. Po končanem razkuževanju smo odpipetirali razkuževalno raztopino in dodali 0,8 ml sterilne destilirane vode in nekajkrat pretresli ter za 2 minuti izpostavili ultrazvoku pri 4 °C oz. pustili 2 minuti pri sobni temperaturi. Postopek smo še dvakrat ponovili, da smo razkužilo čim bolj razredčili oz. ga odstranili. Semena so bila skupno izpostavljena ultrazvoku 8 minut.



Slika 5: Semena orhideje *Bletilla striata*: A – zelena semenska glavica; B – semena pred razkuževanjem; C – postopek razkuževanja

3.2.4 Inokulacija semen na gojišče A

Seme smo z mililitrsko mikropipeto inokulirali na gojišče A (preglednica 1). Za vsako obravnavanje smo semena inokulirali in razporedili po gojišču z ukrivljeno stekleno palčko v štirih ponovitvah (slika 6). Skupno je bilo 16 petrijevk. Po končani inokulaciji smo petrijevke oblepili s parafilmom, da smo preprečili izhlapevanje in morebitne sekundarne okužbe. Na pokrov vsake petrijevke smo s črnim flomastrom naključno narisali štiri

kvadratke, velikosti 1 x 1 cm. Znotraj teh kvadratkov smo opisovali oz. bonitirali rastline (slika 7A).



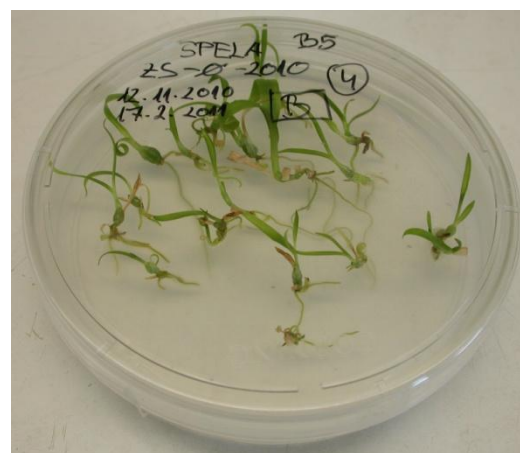
Slika 6: Semena orhideje *Bletilla striata* inokulirana na kalitveno gojišče A

3.2.5 Subkultivacija rastlin na gojišče B

Subkultivacijo smo opravili 96 dni po inokulaciji na gojišče A. Rastline smo iz gojišča A subkultivirali na gojišče B (preglednica 1) v petrijevke premera 90 x 20 mm. Znotraj vsakega obravnavanja, smo naključno izmed 4 ponovitev izbrali 1 petrijevko in rastline znotraj kvadratkov subkultivirali v petrijevke z gojiščem B. V gojišče A smo s skalpelom zarezali 4 kvadratke, velikosti 1 x 1 cm (slika 7A) in rastline skupaj z gojiščem prestavili na sterilni pladenj. Nato smo s pomočjo pincete in skalpela rastline med seboj ločili in jih vsako posebej inokulirali na gojišče B (slika 7B).



A



B

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

3.2.6 Gojenje

Seme in rastline smo gojili v rastnih komorah LO 650 proizvajalca Inštitut Zoran Rant pri temperaturi 24 ± 1 °C in fotoperiodi 16/8 ur (svetloba/tema) ter intenziteti svetlobe $34 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

3.2.7 Bonitiranje

Poskus je bil sestavljen iz 4 obravnavanj, ki smo jih označili: ZS – UZ, SS – UZ, ZS – 0 in SS – 0. V vsako obravnavanje so bile vključene štiri petrijevke oz. ponovitve. Skupno je bilo 16 petrijevk. Znotraj označenih kvadratkov, smo s stereomikroskopom pri 20 kratni povečavi prešteli semena in vizualno rastline razvrstili v različne morfološke faze. Prvo bonitiranje na gojišču A, smo opravili 11 dni po inokulaciji, drugo 30 dni in tretje 54 dni po inokulaciji semen na gojišče A.

Morfološke faze semen in rastlin na kalitvenem gojišču A:

- prazno seme
- nabreklo seme
- protokorm*
- protokorm z rizoidi**
- protokorm z zametki lista
- listi
- listi in korenine

* - protokorm je okroglasta struktura brez korenin, ki nastane po nabrekanju kalčka oz. ko kalček zapusti testo. Na začetku je bel, nato pa postane zelen (Kramer, 1977).

** - rizoid je podaljšek epidermalne celice protokorma. Na začetku je enocelični in nato večcelični s preprosto zgradbo. Tako se poveča površina za mikorizno glivo (Kramer, 1977).

Prvo bonitiranje na gojišču B je bilo opravljeno 32 in drugo 54 dni po subkultivaciji na gojišče B.

Morfološke faze rastlin na subkultivacijskem gojišču B:

- 2 do 5 listov
- več kot 5 listov
- 1 do 2 korenini
- 3 do 4 korenine
- rastline brez bulbulusov
- rastline z bulbulusi
- razraščanje

4 REZULTATI

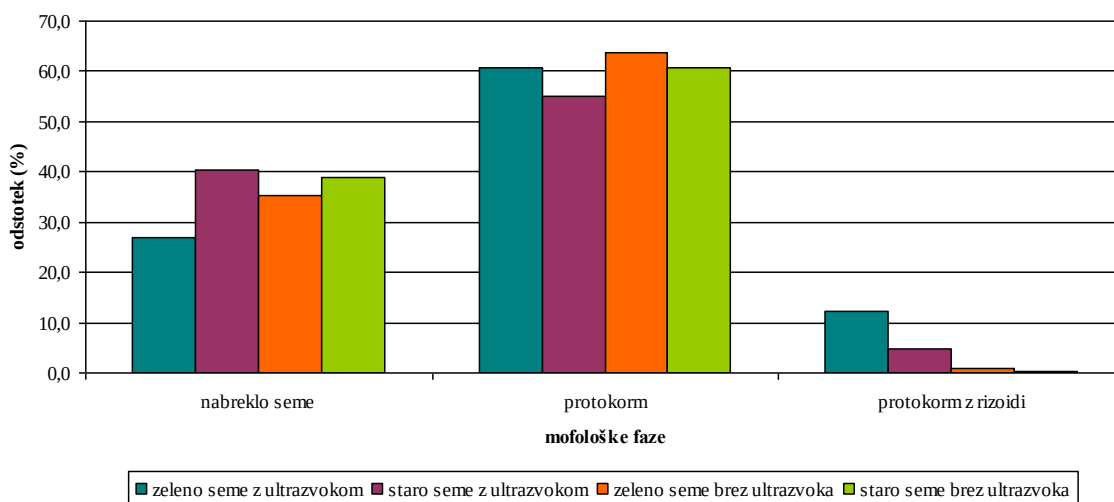
4.1 ASIMBIOTSKA KALITEV NA GOJIŠČU A

Takoj po razkuževanju smo semena *Bletilla striata* inokulirali na kalitveno gojišče A (preglednica 1) in spremljali kalitev ter rast in razvoj.

Preglednica 2: Število praznih in nabreklih semen ter protokormov v različnih morfoloških fazah 11 dni po inokulaciji semen *Bletilla striata* na gojišče A

Morfološke faze	Število semen			
	ZS - UZ	SS - UZ	ZS - 0	SS - 0
Prazno seme	94	108	140	131
Nabreklo seme	52	102	68	93
Protokorm	118	139	123	145
Protokorm z rizoidi	24	12	2	1

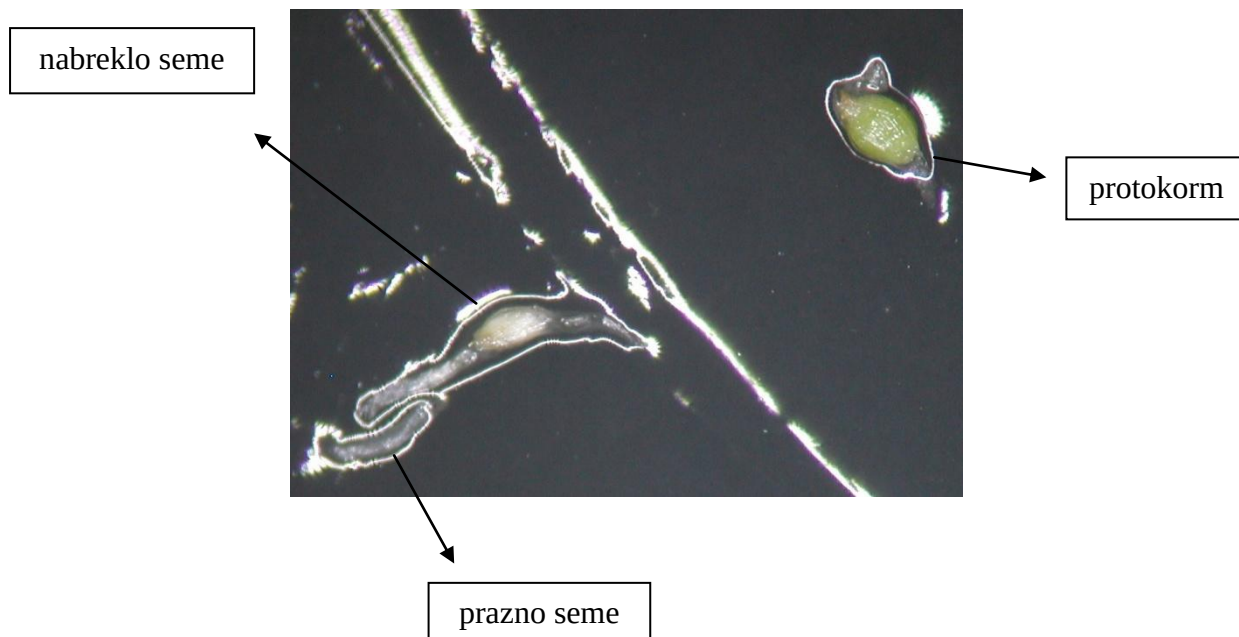
Praznih semen brez kalčka je bilo 32,7% pri zrelem semenu (SS) iz leta 2008, medtem ko je bilo 37,7% semen brez kalčka pri nezrelem semenu (ZS) iz leta 2010. V povprečju je bilo, ne glede na leto pridelka, brez kalčka oz. praznih 35,2% semen (preglednica 2). Praznih semen brez kalčka, pri izračunu deleža morfoloških faz nismo upoštevali.



Slika 8: Odstotek nabreklih semen in nastalih protokormov v različnih morfoloških fazah 11 dni po inokulaciji semen *Bletilla striata* na gojišče A

V 11 dneh na kalitvenem gojišču A so vsa semena s kalčki nabrekli in večina jih je že oblikovala protokorme oz. prešla v naslednjo morfološko fazo protokormi z rizoidi. Največ 63,7% protokormov in samo 1% protokormov z rizoidi je nastalo pri nezrelem semenu v

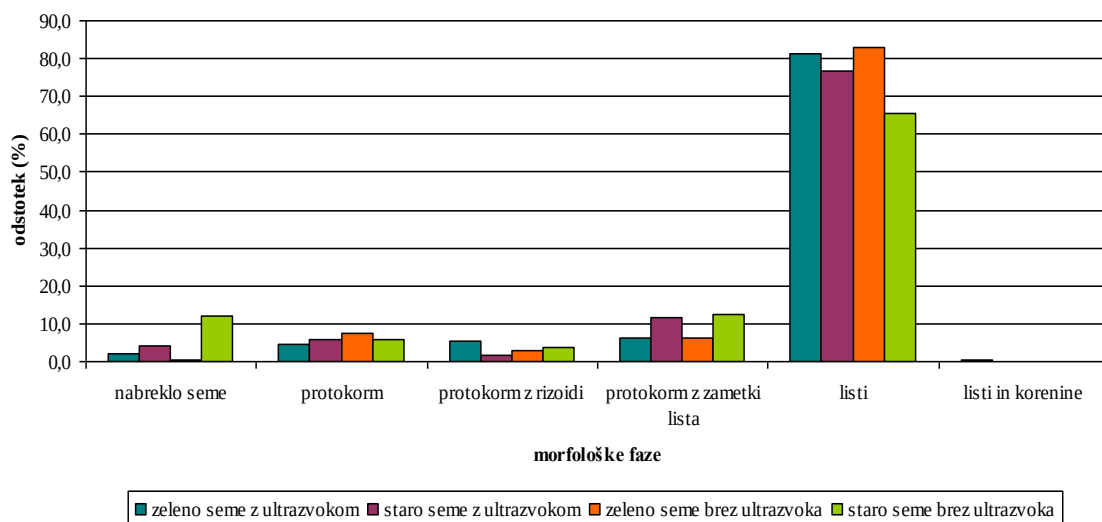
postopku razkuževanja brez ultrazvoka (ZS – 0). Nekoliko manj 60,8% oz. 60,7% protokormov in največ 12,4% oz. najmanj 0,4% protokormov z rizoidi je nastalo pri nezrelem semenu v postopku razkuževanja izpostavljeno 8 minut ultrazvoku (ZS – UZ) oz. pri zrelem semenu v postopku razkuževanja brez ultrazvoka (SS – 0). Najmanj 54,9% protokormov in 4,7% protokormov z rizoidi je nastalo pri zrelem semenu v postopku razkuževanja izpostavljeno 8 minut ultrazvoku (SS – UZ) (preglednica 2, 5 slika 8 in 9).



Slika 9: Prazno seme in morfološke faze kalitve semen *Bletilla striata*, 11 dni po inokulaciji na gojišče A, pri 20 kratni povečavi

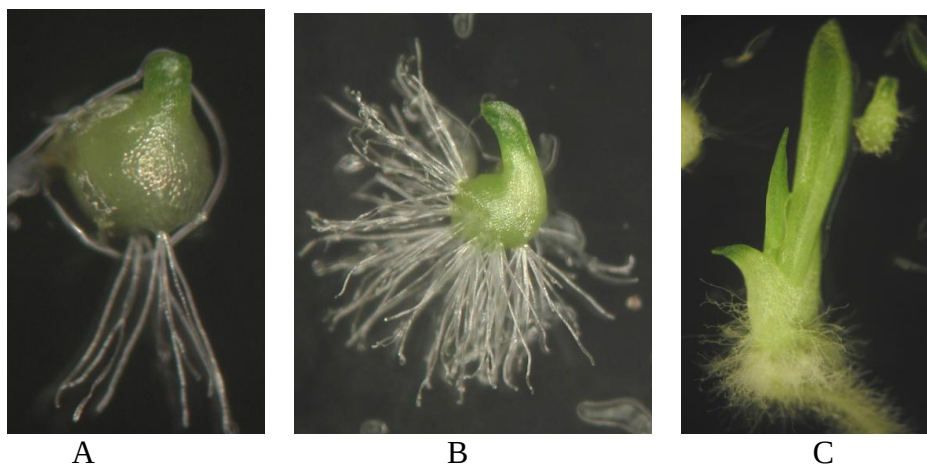
Preglednica 3: Število nabreklih semen, protokormov in rastlin v različnih morfoloških fazah 30 dni po inokulaciji semen *Bletilla striata* na gojišče A.

Morfološke faze	Število semen in rastlin			
	ZS - UZ	SS - UZ	ZS - 0	SS - 0
Nabreklo seme	4	11	1	29
Protokorm	9	15	14	14
Protokorm z rizoidi	10	4	6	9
Protokorm z zametki lista	12	29	12	30
Listi	158	194	160	157
Listi in korenine	1	0	0	0



Slika 10: Odstotek nabreklih semen, protokormov in rastlin v različnih morfoloških fazah 30 dni po inokulaciji semen *Bletilla striata* na gojišče A

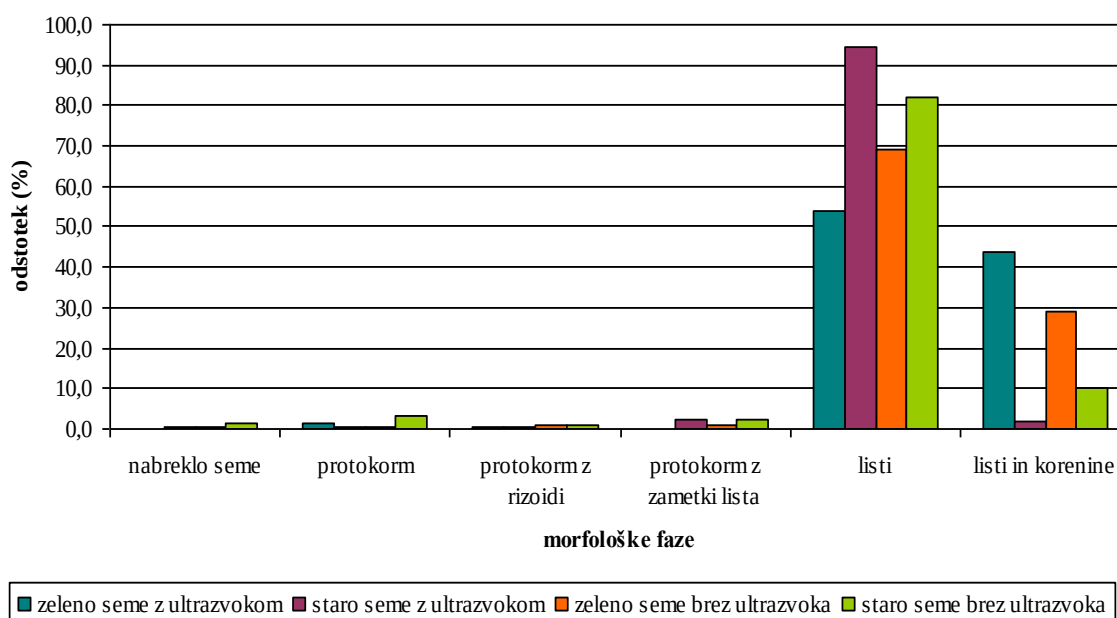
V obdobju 30 dni po inokulaciji semen na kalitveno gojišče A je bila najbolj zastopana morfološka faza protokormov z listi pri nezrelem semenu brez ultrazvoka (ZS – 0) in 81,4% pri nezrelem semenu z ultrazvokom (ZS – UZ). Pri tem obravnavanju se je začela pojavljati naslednja morfološka faza, in sicer 0,5% rastlin je bilo s kombinacijo listi in korenine (slika 11B). Nekoliko manj 76,7% protokormov z listi je nastalo pri zrelem semenu v postopku razkuževanja izpostavljeno ultrazvoku (SS – UZ) in najmanj 65,7% pri zrelem semenu brez ultrazvoka (SS – 0). V obdobju 30 dni po inokulaciji je odstotek predhodnih oz. nižjih morfoloških faz zelo padel. Ne glede na obravnavanje je bilo samo še 12,1% oz. manj nabreklih semen, 7,3% oz. manj protokormov, 5,2% oz. manj protokormov z rizoidi in 12,6% oz. manj protokormov z zametki lista (preglednici 3, 5 in slika 10, 11).



Slika 11: Morfološke faze 30 dni po inokulaciji semen *Bletilla striata* na gojišče A: A – protokorm z rizoidi in zametkom lista; B – protokorm z listom; C – listi in korenina

Preglednica 4: Število nabreklih semen, protokormov in rastlin v različnih morfoloških fazah 54 dni po inokulaciji semen *Bletilla striata* na gojišče A

Morfološke faze	Število semen in rastlin			
	ZS - UZ	SS - UZ	ZS - 0	SS - 0
Nabreklo seme	0	1	1	3
Protokorm	3	1	1	8
Protokorm z rizoidi	1	1	2	2
Protokorm z zametki lista	0	6	0	6
Listi	105	239	133	196
Listi in korenine	85	5	56	24



Slika 12: Odstotek nabreklih semen, protokormov in rastlin v različnih morfoloških fazah 54 dni po inokulaciji semen *Bletilla striata* na gojišče A

V obdobju 54 dni po inokulaciji semen na gojišče A je bila še vedno najbolj zastopana morfološka faza listi ter za njo listi in korenine. Največ 94,5% protokormov z listi in najmanj 2% rastlin z listi in koreninami je nastalo pri zrelem semenu z ultrazvokom (SS – UZ). Iz zrelih semen brez ultrazvoka (SS – 0) se je v tem obdobju razvilo 82% protokormov z listi ter 10% rastlin z listi in koreninami. Pri nezrelem semenu brez ultrazvoka (ZS – 0) je nastalo 68,9% protokormov z listi in 29% kombinacija listi in korenine. Najmanj 54,1% listov ter največ 43,8% rastlin z listi in koreninami je nastalo pri nezrelem semenu z ultrazvokom (ZS – UZ). Vse ostale morfološke faze: nabreklo seme, protokorm, protokorm z rizoidi, protokorm z zametki lista so bile zastopane v sledovih z manj kot 3,3% oz. jih ni bilo (preglednica 4, 5 in slika 11 in 12).

Preglednica 5: Odstotki posameznih morfoloških faz v 11, 30 in 54 dneh po inokulaciji semen *Bletilla striata* na gojišče A

Morfološke faze	% morfoloških faz v 11, 30 in 54 dneh po inokulaciji semen											
	ZS - UZ			SS - UZ			ZS - 0			SS - 0		
	11	30	54	11	30	54	11	30	54	11	30	54
Nabreklo seme	26,8	2,1	0,0	40,3	4,3	0,4	35,2	0,5	0,5	38,9	12,1	1,3
Protokorm	60,8	4,6	1,5	54,9	5,9	0,4	63,7	7,3	0,5	60,7	5,9	3,3
Protokorm z rizoidi	12,4	5,2	0,5	4,7	1,6	0,4	1,0	3,1	1,0	0,4	3,7	0,8
Protokorm z zametki lista	0,0	6,2	0,0	0,0	11,5	2,4	0,0	6,2	0,0	0,0	12,1	2,5
Listi	0,0	81,4	54,1	0,0	76,7	94,5	0,0	82,9	68,9	0,0	65,7	82,0
Listi in korenine	0,0	0,5	43,8	0,0	0,0	2,0	0,0	0,0	29,0	0,0	0,0	10,0

4.2 SUBKULTIVACIJA NA GOJIŠČE B

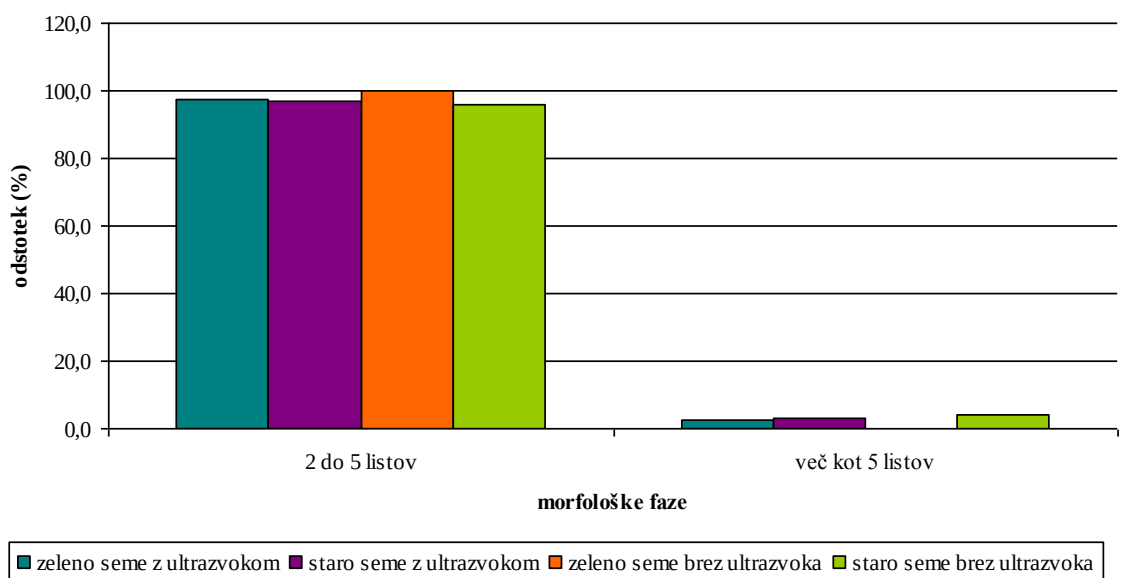
Rastline z vsaj dvema listoma in vsaj eno korenino (slika 13), smo po 96 dneh iz kalitvenega gojišča A subkultivirali na gojišče B (preglednica 1).



Slika 13: Rastlina *Bletilla striata* z več kot 2 listoma in korenino primerna za subkultivacijo na gojišče B

Preglednica 6: Število rastlin *Bletilla striata* z listi v različnih morfoloških fazah 32 dni po subkultivaciji na gojišče B

Morfološke faze	Število rastlin z listi			
	ZS - UZ	SS - UZ	ZS - 0	SS - 0
2 do 5 listov	41	66	48	48
Več kot 5 listov	1	2	0	2

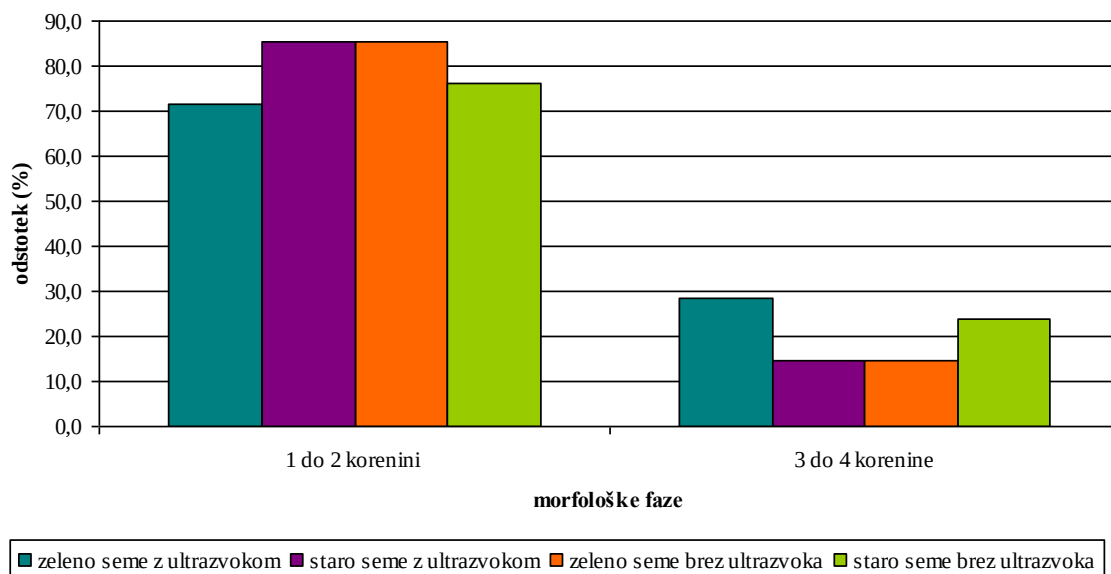


Slika 14: Odstotek rastlin *Bletilla striata* z listi v različnih morfoloških fazah 32 dni po subkultivaciji na gojišče B

V 32 dneh na subkultivacijskem gojišču B so skoraj vse oz. vse rastline 96 do 100% imele ne glede na obravnavanje 2 do 5 listov. V tem obdobju je imelo 4% rastlin več kot 5 listov pri zrelem semenu brez ultrazvoka (SS – 0) in manj kot 3% rastlin je imelo več kot 5 listov pri zrelem in nezrelem semenu z ultrazvokom (SS – UZ, ZS – UZ) in zrelem semenu brez ultrazvoka (SS – 0) (preglednica 6, 11 in slika 14).

Preglednica 7: Število rastlin *Bletilla striata* s koreninami v različnih morfoloških fazah 32 dni po subkultivaciji na gojišče B

Morfološke faze	Število rastlin s koreninami			
	ZS - UZ	SS - UZ	ZS - 0	SS - 0
1 do 2 korenini	30	58	41	38
3 do 4 korenine	12	10	7	12

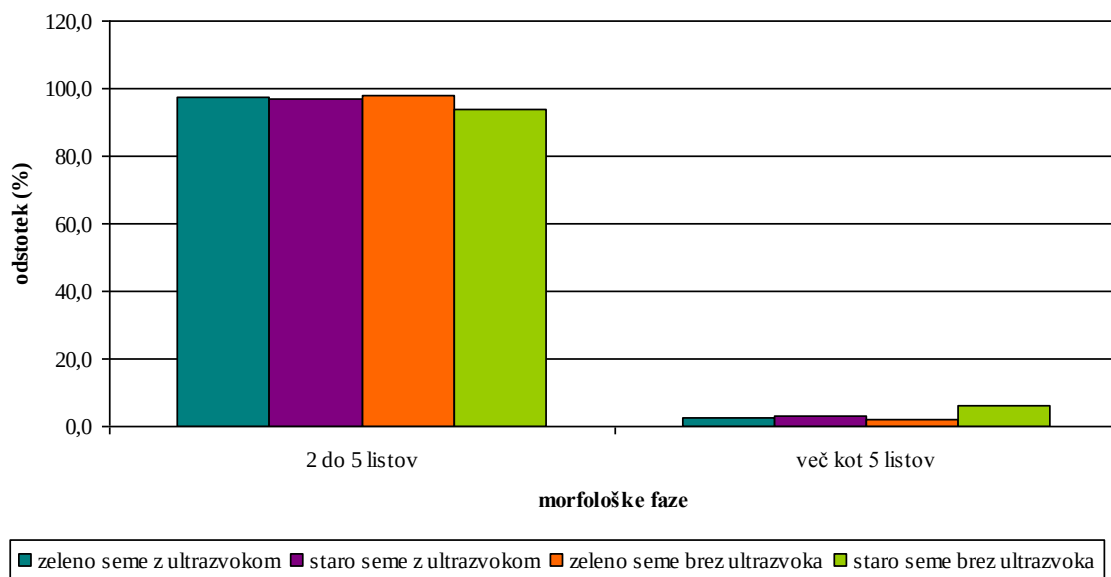


Slika 15: Odstotek rastlin *Bletilla striata* s koreninami v različnih morfoloških fazah 32 dni po subkultivaciji na gojišče B

V obdobju 32 dni na subkultivacijskem gojišču B so zelo intenzivno nastajale korenine in večina rastlin je v tem obdobju imela do 2 korenini. Največ 85,4% oz. 85,3% rastlin je imelo do 2 korenini nastali iz nezrelih semen brez ultrazvoka (ZS – 0) oz. nastali iz zrelega semena z ultrazvokom (SS – UZ), nekoliko manj 76% oz. 71,4% je imelo do 2 korenini pri zrelem semenu brez ultrazvoka (SS – 0) oz. pri nezrelem semenu z ultrazvokom (ZS – UZ). V tem obdobju je največ 28,6% rastlin iz nezrelega semena z ultrazvokom (ZS – UZ) oblikovalo 3 do 4 korenine, nekaj manj 24% rastlin je imelo 3 do 4 korenine nastale iz zrelega semena brez ultrazvoka (SS – 0) in najmanj 14,7% rastlin je imelo 3 do 4 korenine pri zrelem semenu z ultrazvokom (SS – UZ) ter nezrelem semenu brez ultrazvoka (ZS – 0) (preglednica 7, 11 in slika 15).

Preglednica 8: Število rastlin *Bletilla striata* z listi v različnih morfoloških fazah 54 dni po subkultivaciji na gojišče B

Morfološke faze	Število rastlin z listi			
	ZS - UZ	SS - UZ	ZS - 0	SS - 0
2 do 5 listov	41	66	47	47
Več kot 5 listov	1	2	1	3

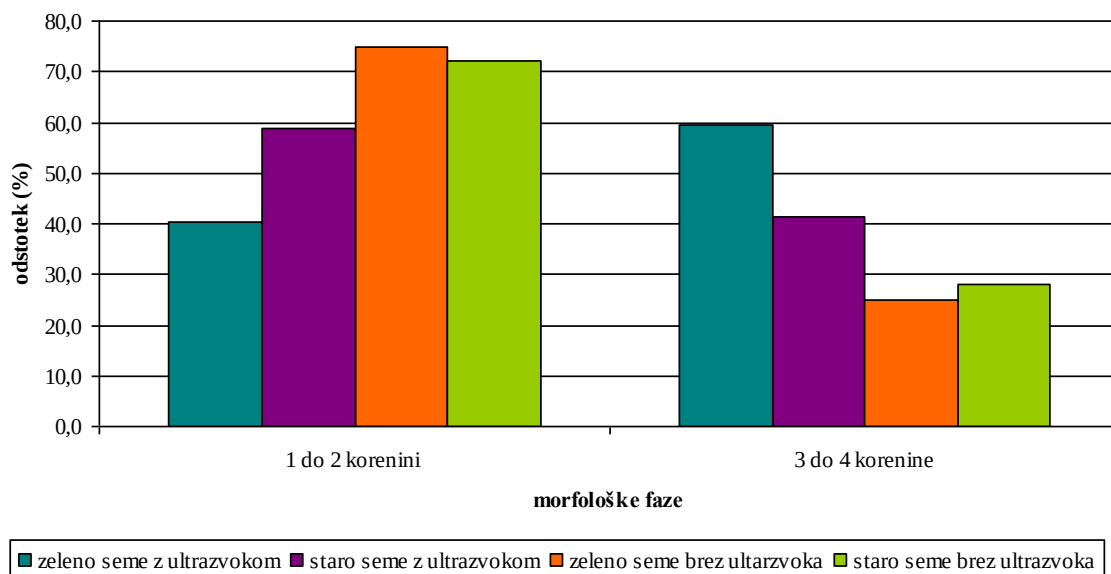


Slika 16: Odstotek rastlin *Bletilla striata* z listi v različnih morfoloških fazah 54 dni po subkultivaciji na gojišče B

Med 32 in 54 dnem se stanje na subkultivacijskem gojišču B, glede števila novo nastalih listov ni bistveno razlikovalo. Še vedno je 94 do 97,6% rastlin ne glede na obravnavanje imelo 2 do 5 listov, ostale so imele že več kot 5 listov (preglednica 6, 8,11 in slika 14, 16).

Preglednica 9: Število rastlin *Bletilla striata* s koreninami v različnih morfoloških fazah 54 dni po subkultivaciji na gojišče B

Morfološke faze	Število rastlin s koreninami			
	ZS - UZ	SS - UZ	ZS - 0	SS - 0
1 do 2 korenini	17	40	36	36
3 do 4 korenine	25	28	12	14

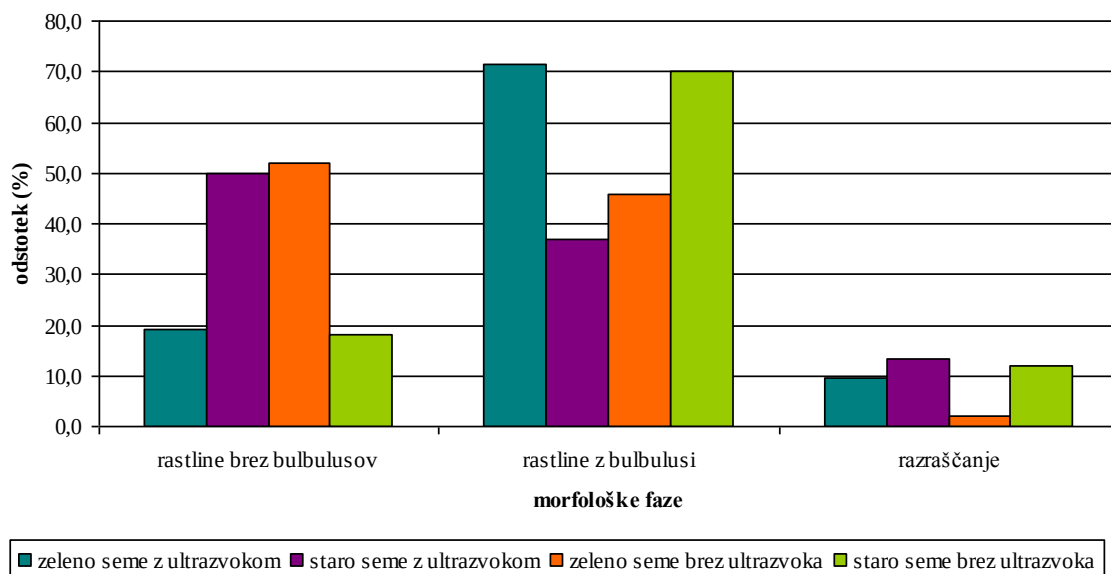


Slika 17: Odstotek rastlin *Bletilla striata* s koreninami v različnih morfoloških fazah 54 dni po subkultivaciji na gojišče B

V 54 dneh na subkultivacijskem gojišču B je imelo največ 59,5% rastlin 3 do 4 korenine pri nezrelem semenu z ultrazvokom (ZS – UZ), medtem ko je 41,2% rastlin imelo enako število korenin pri zrelem semenu z ultrazvokom (SS – UZ). Pri zrelem semenu brez ultrazvoka (SS – 0) je imelo 28% rastlin 3 do 4 korenine in pri nezrelem semenu brez ultrazvoka (ZS – 0) je bilo samo 25% rastlin s 3 do 4 koreninami. Če primerjamo z obdobjem, ko so bile rastline na subkultivacijskem gojišču B 32 dni, je bil v nadaljnjih 22 dneh večji odstotek rastlin ne glede na obravnavanje s 3 do 4 koreninami (preglednica 7, 9, 11 in slika 15, 17).

Preglednica 10: Število rastlin *Bletilla striata* brez in z bulbulusi ter razraščanje 54 dni po subkultivaciji na gojišče B

Morfološke faze	Število rastlin z oz. brez bulbulusov			
	ZS - UZ	SS - UZ	ZS - 0	SS - 0
Rastline brez bulbulusov	8	34	25	9
Rastline z bulbulusi	30	25	22	35
Razraščanje	4	9	1	6



Slika 18: Odstotek rastlin *Bletilla striata* brez in z bulbulusi ter razraščanje 54 dni po subkultivaciji na gojišče B

V 54 dneh na subkultivacijskem gojišču B so rastline začele oblikovati bulbuluse (slika 19A) in se razraščati (slika 19B). Največ 71,5% oz. 70% rastlin z bulbulusi je bilo pri nezrelem semenu z ultrazvokom (ZS – UZ) oz. pri zrelem semenu brez ultrazvoka (SS – 0), medtem ko je bilo samo 45,8% oz. 36,8% rastlin z bulbulusi pri nezrelem semenu brez ultrazvoka (ZS – 0) oz. zrelem semenu z ultrazvokom (SS – UZ). Naslednja morfološka faza razraščanje je bila najbolj zastopana s 13,2% pri zrelem semenu z ultrazvokom (SS – UZ) in z 12% pri zrelem semenu brez ultrazvoka (SS – 0). Pri nezrelem semenu z ultrazvokom (ZS – UZ) je bilo razraslih 9,5% rastlin in samo 2,1% razraslih rastlin je bilo pri nezrelem semenu brez ultrazvoka (ZS – 0) (preglednica 10, 11 in slika 18 in 19).



A



B

Slika 19: Morfološke faze orhidej *Bletilla striata* 54 dni po subkultivaciji na gojišče B: A – rastlina s tremi listi in koreninami ter bulbulusom; B – razraščanje

Preglednica 11: Odstotki posameznih morfoloških faz v 32 in 54 dneh po subkultivaciji rastlin *Bletilla striata* na gojišče B

Morfološke faze	% morfoloških faz v 32 in 54 dneh po subkultivaciji na gojišče B							
	ZS - UZ		SS - UZ		ZS - 0		SS - 0	
	32	54	32	54	32	54	32	54
2 do 5 listov	97,6	97,6	97,1	97,1	100,0	97,9	96,0	94,0
Več kot 5 listov	2,4	2,4	2,9	2,9	0,0	2,1	4,0	6,0
1 do 2 korenini	71,4	40,5	85,3	58,8	85,4	75,0	76,0	72,0
3 do 4 korenine	28,6	59,5	14,7	41,2	14,7	25,0	24,0	28,0
Rastline brez bulbulusov	0,0	19,0	0,0	50,0	0,0	52,1	0,0	18,0
Rastline z bulbulusi	0,0	71,5	0,0	36,8	0,0	45,8	0,0	70,0
Razraščanje	0,0	9,5	0,0	13,2	0,0	2,1	0,0	12,0

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V asimbiotsko kalitev so bila vključena zrela semena in nezrela semena orhideje *Bletilla striata*. Zrela semena smo hranili pri 4 °C, za katere smo predvidevali, ko so bila vključena v poskus, da so imela že prekinjeno dormanco oz. so bila stratificirana. Za nezrela semena smo predvidevali, da še niso prešla v dormanco in da stratifikacija ni potrebna. Pri semenih orhidej je zunanja plast zrele teste neprepustna za vodo (Arditti, 1992), zato smo jo poskušali razrahljati z ultrazvokom. Neprepustnost za vodo je lahko eden od razlogov, zakaj zrelo seme terestičnih orhidej na gojiščih slabo kali. V obdobju nizkih temperatur se testa omehča, razgradijo se kemične snovi oz. inhibitorji in nadaljujejo se fiziološki procesi kalitve, ki so se začeli že pred nizkimi temperaturami.

5.1.1 Prazna semena

Seme orhidej vsebuje samo kalček in testo, med njima pa je veliko praznega prostora (Pridgeon, 1999). Zrel kalček ima nediferencirano tkivo, sestavljajo ga različno velike celice, kar je odvisno od njihove lokacije. Meristemski del je sestavljen iz manjših celic, premera 8 – 10 µm, ostale pa so večje. Vse celice vsebujejo zaloge hrane v obliki lipidnih in beljakovinskih telesc. Škrobnatih telesc je malo ali pa jih sploh ni (Arditti, 1992). Ugotovili smo, da se je proces nabrekanja in povečevanja kalčka pri večini semen začel zelo hitro in to v nekaj dneh. Nekatera semena se po nekaj dneh na kalitvenem gojišču niso spremenila. Po temeljitem pregledu s stereomikroskopom pri 20 kratni povečavi smo ugotovili, da so brez kalčka oz. da razen teste, ki je transparentna v notranjosti semen nismo opazili nič.

Pri zrelem semenu iz leta 2008 smo ugotovili, da je bilo 32,7% semen brez kalčka, medtem ko je bilo pri nezrelem semenu iz leta 2010 praznih 37,7% semen. Pri teh semenih ni prišlo do oploditve oz. je kalček po oploditvi propadel. V povprečju je bilo v našem poskusu brez kalčka 35,2% semen, kar je veliko, ampak na dejstvo, da v semenski glavici lahko nastane odvisno od vrste 20 in tudi več kot štiri milijone semen (Arditti in Ghani, 2000), je ugotovljen odstotek zanemarljiv. *Bletilla striata* je orhideja z zelo veliko semeni v semenski glavici in na enem cvetnem stebelu, kjer oblikuje socvetje lahko nastane več semenskih glavic (slika 5A).

5.1.2 Asimbiotska kalitev na gojišču A

Na kalitvenem gojišču smo kalitev in nadaljnjo rast ter razvoj spremljali trikrat in to 11, 30 in 54 dni po inokulaciji semen. V tem obdobju smo poleg nabrekanja in povečevanja

kalčka zasledili še morfološke faze: protokorm, rizoidi, list (i) in korenina (e) (slika 9, 11, 13).

V prvem obdobju spremljanja, to je 11 dni po inokulaciji semen na gojišče A je bila najbolj v povprečju s 60% ne glede na obravnavanje, zastopana morfološka faza protokorm. V tem obdobju je bilo v povprečju samo še 35% nabreklih semen. Najmanj 26,8% nabreklih semen je bilo pri nezrelem semenu z ultrazvokom (ZS – UZ). Pri tem obravnavanju je bila najbolj z 12,4 % zastopana že naslednja morfološka faza protokorm z rizoidi pri nezrelem semenu z ultrazvokom (ZS – UZ). Pri zrelem semenu z ultrazvokom (SS – UZ) je bilo protokormov z rizoidi 4,7%, medtem ko pri nezrelem semenu in starem semenu brez ultrazvoka je bilo protokormov z rizoidi 1,0% oz. 0,4% (preglednica 2, 5 in slika 8, 9).

V drugem obdobju spremljanja, to je 30 dni po inokulaciji semen na kalitveno gojišče je bila najbolj zastopana morfološka faza protokorm z rizoidi in list (i). Največ 82,9% protokormov z rizoidi in listi je bilo pri nezrelem semenu brez ultrazvoka (ZS – 0) in 81,4% pri nezrelem semenu z ultrazvokom (ZS – UZ). Pri zrelem semenu z ultrazvokom (SS – UZ) je bilo 76,7% protokormov z listi in pri zrelem semenu brez ultrazvoka (SS – 0) je bilo najmanj 65,7% protokormov z listi. V tem obdobju se je z 0,5% pojavila morfološka faza listi in korenine pri nezrelem semenu z ultrazvokom (ZS – UZ). Pri ostalih obravnavanjih nismo zasledili te faze (preglednica 3, 5 in slika 10, 11).

V tretjem obdobju opazovanja, to je 54 dni po inokulaciji semen na gojišče A je bila najbolj zastopana s 43,8% morfološka faza listi in korenine pri nezrelem semenu z ultrazvokom (ZS – UZ) in 29% pri nezrelem semenu brez ultrazvoka (ZS – 0). Pri zrelem semenu brez ultrazvoka (SS – 0) je bilo 10% v morfološki fazi listi in korenine in samo 2% pri zrelem semenu z ultrazvokom (SS – UZ) (preglednica 4, 5 in slika 12).

Glede nato, kako hitro so se pojavljale morfološke faze in zastopanost je bilo v povprečju nezrelo seme z ultrazvokom (ZS – UZ) tisto, ki je najhitreje prehajalo v višje morfološke faze. Sledilo je nezrelo seme brez ultrazvoka (ZS – 0), nato zrelo seme z ultrazvokom (SS – UZ) in zrelo seme brez ultrazvoka (SS – 0).

5.1.3 Subkultivacija na gojišče B

Rastline z vsaj dvema listoma in vsaj eno korenino (slika 13), smo po 96 dneh iz kalitvenega gojišča A subkultivirali na gojišče B (preglednica 1). Nadaljnjo rast in razvoj smo spremljali dvakrat in to 32 in 54 dni po subkultivaciji na gojišče B. V obdobju 32 dni na subkultivacijskem gojišču B so se pojavile morfološke faze: 2 do 5 listov, več kot 5 listov, 1 do 2 korenini in 3 do 4 korenine.

Ne glede na obravnavanje med enim in drugim obdobjem ni bilo bistvenih razlik v oblikovanju listov, velika večina v povprečju 97% je imela 2 do 5 listov in v povprečju 3% rastlin je imelo več kot 5 listov (preglednica 6, 8, 11 in slika 14, 16).

V obdobju 32 dni na gojišču B so intenzivno začele nastajati korenine in večina rastlin je v tem obdobju imela do 2 korenini. Pojavljala se je že naslednja morfološka faza 3 do 4 korenine, ki je bila najbolj zastopana z 28,6% pri nezrelem semenu z ultrazvokom (ZS – UZ) (preglednica 7, 11 in slika 15).

Proces nastajanja korenin se je nadaljeval v naslednje obdobje. Tako je imelo med 32 in 54 dnem na gojišču B največ 59,5% rastlin 3 do 4 korenine pri nezrelem semenu z ultrazvokom (ZS – UZ) in 41,2% rastlin je imelo enako število korenin pri zrelem semenu z ultrazvokom (SS – UZ). Sledili sta obravnavanji brez ultrazvoka, in sicer pri zrelem semenu (SS – 0) je imelo 28% rastlin 3 do 4 korenine in najmanj 25% rastlin je imelo enako število korenine pri nezrelem semenu (ZS – 0) (preglednica 7, 9, 11 in slika 15, 17).

Na gojišču B so med 32 in 54 dnem rastline oblikovale bulbuluse in se začele razraščati. Največ 71,5% in 70% rastlin je imelo bulbuluse pri nezrelem semenu z ultrazvokom (ZS – UZ) in pri zrelem semenu brez ultrazvoka (SS – 0), medtem ko je bilo 45,8% rastlin z bulbulusi pri nezrelem semenu brez ultrazvoka (ZS – 0) in 36,8% pri zrelem semenu z ultrazvokom (SS – UZ). Največ 13,2% in 12% rastlin se je razraščalo pri starem semenu z in brez ultrazvoka (SS – UZ in SS – 0) (preglednica 10, 11 in slika 18, 19).

5.2 SKLEPI

Razkuževanje semen z 1,6% dikloroizocianurno kislino v kombinaciji z močilon Tween in čas razkuževanja se je izkazalo za zelo uspešno.

V celotnem poskusu ni bilo okužb rastlinskega materiala.

V povprečju je bilo, ne glede na fiziološko zrelost, kar 35,2% semen brez kalčka oz. praznih.

Na kalitvenem gojišču A, v obdobju 54 dni, smo poleg nabrekanja semen opazili še morfološke faze: protokorm, rizoidi, list (i) in korenina (e).

V povprečju so se na kalitvenem gojišču najhitreje in najštevilčnejše pojavljale morfološke faze pri nezrelem semenu z ultrazvokom (ZS – UZ), sledilo je nezrelo seme brez ultrazvoka (ZS – 0), nato zrelo seme z ultrazvokom (SS – UZ) in zrelo seme brez ultrazvoka (SS – 0).

Na subkultivacijskem gojišču B so se v obdobju do 32 dni pojavile morfološke faze: 2 do 5 listov, več kot 5 listov, 1 do 2 korenini in 3 do 4 korenine.

Ne glede na obravnavanje med enim in drugim obdobjem ni bilo bistvenih razlik v oblikovanju listov, velika večina v povprečju 97% je imela 2 do 5 listov in v povprečju 3% rastlin je imelo več kot 5 listov.

V obdobju med 32 in 54 dnem so na gojišču B intenzivno nastajale korenine. Največ 59,5% rastlin je imelo 3 do 4 korenine pri nezrelem semenu z ultrazvokom (ZS – UZ) in najmanj 25% rastlin je imelo enako število korenin pri nezrelem semenu brez ultrazvoka (ZS – 0).

Na gojišču B sta se, v obdobju med 32 in 54 dnem, množično pojavljali naslednji morfološki fazi: rastline z bulbulusi in razraščanje.

Največ 71,5% in 70% rastlin je imelo bulbuluse pri nezrelem semenu z ultrazvokom (ZS – UZ) in pri zrelem semenu brez ultrazvoka (SS – 0), medtem ko se je največ 13,2% in 12% rastlin razraščalo pri starem semenu z in brez ultrazvoka (SS – UZ, SS – 0).

6 POVZETEK

V poskus asimbiotske kalitve smo vključili nezrela in zrela semena orhideje *Bletilla striata*, ki raste na prostem v Ljubljani. Zelene semenske glavice smo pobrali v začetku septembra 2010 in jih en mesec do poskusa hranili pri sobni temperaturi. Zrela semena iste rastline smo pobrali konec septembra 2008 ter jih do uporabe 12.11.2010 hranili pri 4 °C.

Semena smo pred inokulacijo na gojišče površinsko razkužili z 1,66% dikloroizocianurno kislino (proizvajalca Sigma-Aldrich). Polovico nezrelh in zrelih semen smo po 8 minutnem razkuževanju pri sobni temperaturi izpostavili še 2 minuti hladnemu ultrazvoku pri 4 °C in še 3 krat po dve minuti spirali pri enakih razmerah. Z namenom razrahljati celične stene teste in omogočiti hitrejši dostop vodi do kalčka. Drugo polovico semen, ki smo jo uporabili kot kontrolo, smo razkuževali 10 minut pri sobni temperaturi brez ultrazvoka in 3 krat po dve minuti spirali s sterilno destilirano vodo pri enakih razmerah.

Po razkuževanju smo semena z mililitrsko mikropipeto inokulirali na kalitveno gojišče A (proizvajalca Sigma-Aldrich z oznako P1056) v štirih ponovitvah. Rastline z vsaj dvema listoma in eno korenino (slika 13) smo po 96 dneh iz gojišča A znotraj 4 kvadratkov, velikosti 1 x 1 cm (slika 7A) ene petrijevke subkultivirali na gojišče B (preglednica 1 in slika 7B). Gojišče B je vsebovalo mikroelemente gojišča MS (Murashige in Skoog, 1962) in makroelemente gojišča B5 (Gamborg in sod., 1968) ter ostale sestavine, razen banane v prahu in oglja, so bile povzete po Hinnen in sod. (1989).

Seme in rastline smo gojili v rastnih komorah LO 650 proizvajalca Inštitut Zoran Rant pri temperaturi 24 ± 1 °C in fotoperiodi 16/8 ur (svetloba/tema) ter intenziteti svetlobe $34 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Znotraj označenih kvadratkov, smo s stereomikroskopom pri 20 kratni povečavi prešteli semena in vizualno rastline razvrstili v različne morfološke faze. Prvo bonitiranje na gojišču A, smo opravili 11 dni po inokulaciji, drugo 30 dni in tretje 54 dni po inokulaciji semen na gojišče A.

V povprečju je bilo v poskusu brez kalčka 35,2% semen. Ostala so na kalitvenem gojišču A, odvisno od obravnavanja, kalila in prehajala v naslednje morfološke faze rasti in razvoja. V tem obdobju smo poleg nabrekanja in povečevanja kalčka zasledili še morfološke faze: protokorm, rizoidi, list (i) in korenina (e) (slika 9, 11, 13).

V prvem obdobju spremljanja, to je 11 dni po inokulaciji semen na gojišče A je bila najbolj v povprečju s 60% ne glede na obravnavanje, zastopana morfološka faza protokorm pri nezrelem semenu z ultrazvokom (ZS – UZ). Pri tem obravnavanju je bila z 12,4 % vidna že naslednja morfološka faza protokorm z rizoidi (preglednica 2, 5 in slika 8, 9). V drugem

obdobju spremljanja, to je 30 dni po inokulaciji semen na kalitveno gojišče je bila najbolj zastopana morfološka faza protokorm z rizoidi in list (i). Največ 82,9% protokormov z rizoidi in listi je bilo pri nezrelem semenu brez ultrazvoka (ZS – 0) in 81,4% pri nezrelem semenu z ultrazvokom (ZS – UZ). V tem obdobju se je z 0,5% pojavila morfološka faza listi in korenine pri nezrelem semenu z ultrazvokom (ZS – UZ). Pri ostalih obravnavanjih nismo zasledili te faze (preglednica 3, 5 in slika 10, 11). V tretjem obdobju opazovanja, to je 54 dni po inokulaciji semen na gojišče A je bila najbolj zastopana s 43,8% morfološka faza listi in korenine pri nezrelem semenu z ultrazvokom (ZS – UZ) in 29% pri nezrelem semenu brez ultrazvoka (ZS – 0) (preglednica 4, 5 in slika 12).

Kako hitro so se pojavljale morfološke faze in zastopanost je bilo v povprečju najboljše nezrelo seme z ultrazvokom (ZS – UZ), sledilo je nezrelo seme brez ultrazvoka (ZS – 0), nato zrelo seme z ultrazvokom (SS – UZ) in zrelo seme brez ultrazvoka (SS – 0)

Prvo bonitiranje na gojišču B je bilo opravljeno 32 in drugo 54 dni po subkultivaciji na gojišče B. V obdobju 32 dni na subkultivacijskem gojišču B so se pojavile morfološke faze: 2 do 5 listov, več kot 5 listov, 1 do 2 korenini in 3 do 4 korenine.

Ne glede na obravnavanje med enim in drugim obdobjem ni bilo bistvenih razlik v oblikovanju listov, velika večina v povprečju 97% je imela 2 do 5 listov in v povprečju 3% rastlin je imelo več kot 5 listov (preglednica 6, 8, 11 in slika 14, 16). Večje razlike med obravnavanji so nastajale v morfološki fazi: 3 do 4 korenine in to v obdobju 54 dni po inokulaciji na gojišče B. Največ 59,5% in 41,2% rastlin je bilo v fazi 3 do 4 korenine pri nezrelem semenu z ultrazvokom (ZS – UZ) in pri zrelem semenu z ultrazvokom (SS – UZ) (preglednica 11).

Na gojišču B so med 32 in 54 dnem rastline oblikovale bulbuluse in se začele razraščati. Največ 71,5% in 70% rastlin je imelo bulbuluse pri nezrelem semenu z ultrazvokom (ZS – UZ) in pri zrelem semenu brez ultrazvoka (SS – 0), medtem ko je bilo 45,8% rastlin z bulbulusi pri nezrelem semenu brez ultrazvoka (ZS – 0) in 36,8% pri zrelem semenu z ultrazvokom (SS – UZ). Največ 13,2% in 12% rastlin se je razraščalo pri starem semenu z in brez ultrazvoka (SS – UZ in SS – 0) (preglednica 10, 11 in slika 18, 19).

7 VIRI

- Arditti J. 1992. Fundamentals of orchid biology, New York, John Wiley & Sons: 712 str.
- Arditti, J., Ghani, A.K.A. 2000. Numerical and physical properties of orchid seed and their biological implications. Tansley Review, 145: 367-421
- Bletilla Striata – Flower. 1998
<http://inetgardens.com/bletilla-striata-flower.htm> (21.4.2012)
- Blog of an Ancient Gardener. 2011
http://ancientgardenerblog.blogspot.com/2011_02_01_archive.htm (21.4.2012)
- Brickell C. 1996. The RHS A-Z Encyclopedia of Garden Plants. London, Dorling Kindersley: 1136 str.
- Diao H., Lia X., Chena J., Luo Y., Chena X., Donga L., Wanga C., Zhanga C., Zhanga J. 2008. *Bletilla striata* polysaccharide stimulates inducible nitric oxide synthase and proinflammatory cytokine expression in macrophages. Journal of Bioscience and Bioengineering, 105: 85-89
- Društvo ljubiteljev orhidej Slovenije. 2005.
<http://www.orhideje.org/modules/articles/article.php?id=19> (21.4.2012)
- Epifit. 2004.
<http://www.orhideje.org/modules/articles/print.php?id=13> (21.4.2012)
- Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research, 50: 151-158
- Georg E. F. 1993. The propagation of orchids. V: Training manual for short course in orchid culture Lubag A. M. (ur.). Los Banos, University of the Philippines, Ornamental Crops Division: 917-922
- Hicks A. J. 2000. Asymbiotic technique of orchid seed germination. Chandler, the Orchid Seedbank Project: 134 str.
- Hinnen M.G.J., Pierik R.L.M., Bronsema F.B.F. 1989. The influence of macronutrients and some other factors on growth of *Phalaenopsis* hybrid seedlings *in vitro*. Scientia Horticulturae, 41: 105-116

- Jevšnik T. 2002. Asimbiotsko razmnoževanje tropskih orhidej. Diplomsko delo, Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 64 str.
- Kramer J. 1997. Orchid for everyone. New York, Smithmark Publisher: 208 str.
- Martinčič A., Wraber T., Jogan N., Ravnik V., Podobnik A., Turk B., Vreš B. 1999. Mala flora Slovenije. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 845 str.
- Moore R., Clark W. D., Vodopich D. S. 1998. Botany. Boston, The McGraw-Hill Companies: 920 str.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497
- Pridgeon A. 1999. The Illustrated encyclopedia of orchids. The Rocks, Landsowne Publishing Pty Ltd: 304 str.
- Qian J., Vossoughi D., Woitaschek, D., Oppermann E., Bechstein W.O., Li W.Y., Feng G.S., Vogl T. 2003. Combined transarterial chemoembolization and arterial administration of *Bletilla striata* in treatment of liver tumor in rats. *World Journal of Gastroenterology*, 9: 2676-2680
- Ravnik V. 2002. Orhideje Slovenije. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 192 str.
- Rittershausen, W., Rittershausen, B. 2001. Gardner's guide to growing Orchids-a complete guide to cultivation and care. London, Annes Publishing Ltd: 128 str.
- Singh A., Duggal S. 2009. Medicinal Orchids - An Overview. *Ethnobotanical Leaflets*, 13: 399-412
- Strong G. 2000. A Gardener's Guide to Orchids and Bromeliads. London, Murdoch books: 96 str.
- Top Creek: Epiphytic orchid. 2009.
<http://las.new-england.net.au/2009/10/18/top-creek-epiphytic-orchid/> (21.4.2012)
- Yeung H.C. 1985. Handbook of Chinese Herbs. Institute of Chinese Medicine: 673 str.
- Vodnik D. 2012. Osnove fiziologije rastlin. Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Tiskarna Januš: 141 str.
- Zupan S. 2004. Vpliv različnih priprav semen orhidej *Bletilla striata* (Thunb.) in *Vanda cristata* (Lindl.) na kalitev. Diplomsko delo. Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 49 str