УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ

ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ

СТУДИЈСКИ ПРОГРАМ АГРОНОМИЈА

Биодиверзитет и оплемењивање терестричних орхидеја Фрушке горе

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментор:

Проф. др Мирјана Љубојевић

Кандидат:

маст. инж. Јована Дулић

Нови Сад, 2019. године

Од срца желим да се захвалим свима који су били уз мене и који су ми на директан или индиректан начин пружили подршку. Првенствено желим да се захвалим менторки ван. проф. др Мирјани Љубојевић која ме је водила кроз научно-истраживачки рад током израде ове дисертације. Хвала на указаном поверењу, разумевању, несебичној подршци, конструктивним стручним саветима и корисним сугестијама које су довеле до тога да ова дисертација добије свој коначан облик.

Посебну захвалност дугујем професору др Владиславу Огњанову који ме је увео у област оплемењивања биљака, упознао са техником културе ткива и обезбедио ми услове за израду дисертације. Хвала на пруженом знању, стручним и научним саветима које је несебично делио са мном током основних, мастер и докторских студија.

Захвалност дугујем и проф. др Симониди Ђурић уз чију помоћ је изведен део истраживања везан за изолацију и морфолошку карактеризацију микоризних гљива. Хвала на стрпљењу, подршци и указаном поверењу. Једнаку захвалност дугујем и осталим члановима комисије проф. др Љиљани Николић и проф. др Мирјани Оцокољић које су својим коментарима, драгоценим саветима и сугестијама изузетно допринеле квалитету током финалне израде ове дисертације.

Захвалност желим да искажем и др Јованки Атлагић у чијој је лабораторији спроведен део истраживања. Посебно се захваљујем колеги др Горану Бараћу на несебичном труду, стрпљењу и уложеном времену током извођења цитолошких истраживања.

Захваљујем се колегама др Драгиши Савићу из ЈП „Национални парк Фрушка гора“ и др Милици Рат са Департмана за биологију и екологију, Природно – математичког факултета у Новом Саду који су ми помогли приликом одређивања локалитета и детерминације врста.

Такође, захваљујем се свим колегама на Департману за воћарство, виноградарство, хортикултуру и пејзажну архитектуру, Пољопривредног факултета у Новом Саду, од којих пре свега желим да истакнем Мају Миловић, Јелену Калајџић, Тијану Наранџић и Гордану Попару, на колегијалности и указаној подршци.

Захвалност дугујем и мом момку Синиши Остојићу на стрпљењу, подршци, разумевању и инспиративним тренуцима који су ме мотивисали да изведем ову дисертацију до краја.

На крају највећу захвалност на бескрајној љубави, разумевању и подршци дугујем својој породици, оцу Ивану, мајци Миши и сестрама Тамари и Тијани којима посвећујем ову докторску дисертацију.

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број: РБР	
Идентификациони број: ИБР	
Тип документације: ТД	Монографска документација
Тип записа: ТЗ	Текстуални штампани материјал
Врста рада (дипл., маг., докт.): ВР	Докторска дисертација
Име и презиме аутора: АУ	маст. инж. Јована Дулић
Ментор (титула, име, презиме, звање): МН	Проф. др Мирјана Љубојевић, ванредни професор
Наслов рада: НР	Биодиверзитет терестричних орхидеја Фрушке горе
Језик публикације: ЈП	Српски
Језик извода: ЈИ	срп/енг.
Земља публиковања: ЗП	Србија
Уже географско подручје: УГП	АП Војводина
Година: ГО	2019.
Издавач: ИЗ	Ауторски репринт
Место и адреса: МА	Нови Сад, Пољопривредни факултет, Департман за воћарство, виноградарство, хортикултуру и пејзажну архитектуру

Физички опис рада: ФО	(број поглавља 9/ страница 162 / табела 20 / слика 24/ графикона 26 / референци 271 / прилога 19/ биографија)
Научна област: НО	Биотехнологија
Научна дисциплина: НД	Хортикултура
Предметна одредница, кључне речи: ПО	Биодиверзитет, орхидеје, морфологија, цитогенетика, асимбиотско клијање семена.
УДК	635.924(043.3)
Чува се: ЧУ	Бибилиотека Пољопривредног факултета у Новом Саду
Важна напомена: ВН	Нема
Извод: ИЗ	Фрушка гора представља природно станиште великог броја терестричних орхидеја, међутим, диверзитет који стоји на располагању никада није био предмет оплемењивачког процеса који би их увео у масовнију производњу и употребу. Циљ овог истраживања био је очување и употреба диверзитета терестричних орхидеја са подручја Фрушке горе, као и развијање концепта њиховог оплемењивања за потребе хортикултуре и пејзажне архитектуре. Током трогодишњег истраживања евидентирано је 17 врста код којих је утврђена велика разноликост како у станишту које настањују тако и у морфолошким (квалитативним – орнаменталним и квантитативним – развојним) и цитолошким особинама. Резултати истраживања су указали да укупан генофонд представља јединствен материјал високог значаја за даљу конзервацију као и укључивање истих у порграме оплемењивања. Морфолошком карактеризацијом је утврђен велики диверзитет облика, величина и боја листова и цветова што представља добру основу за селекцију орнаменталних карактеристика високе комерцијалне вредности. Анализа едафских фактора је показала да већина пронађених врста (*Anacamptis pyramidalis*, *Gymnadenia conopsea*, *Gymnadeia odoratissima*, *Orchis militaris*, *Orchis purpurea*, *Neotinea tridentata*, *Ophrys*

	sphegodes, *Ophrys scolopax*, *Neotinea ustulata*, *Himantoglossum jankae* и *Epipactis microphylla*) расте на земљиштима богатим карбонатима, слабо алкалне реакције земљишта, док свега 5 врста расте на земљиштима слабо киселе реакције (*Epipactis helleborine*, *Platanthera bifolia*, *Cephalanthera longifolia*, *Limodorum abortivum* и *Orchis mascula)*. На основу добијених резултата може се закључити да геолошка и педолошка својства подлоге утичу на дистрибуцију терестричних орхидеја. Такође, код већине испитиваних врста је у кореновом систему утврђено присуство ендомикоризних гљива из групе *Rhizoctonia* што указује да испитиване врсте одржавају симбиозу током целог свог животног циклуса. Детаљно је испитан утицај различитих хранљивих подлога и осветљења на асимбиотско клијање семена у контролисаним *in vitro* условима, са циљем изналажења оптималног протокола за њихово масовно умножавање. Утврђено је да хранљива подлога ММ подстиче клијање семена *A. pyramidalis*, *G. conopsea*, *H. jankae*, *O. militaris* и *O. sphegodes*. Такође, инхибиторно деловање осветљења на клијање семена указује да ове врсте имају негативно фотобластично семе. Супротно њима, способност семена *S. spiralis* да клија и у условима мрака и у условима осветљења доводи до закључка да ова врста има неофотобластично семе. Додавање органских суплемената, од којих се највише истичу кокосова вода (CW) и пептон (PE), резултирало је скраћеним временским периодом неопходним за клијање семена као и знатно већим степеном клијавости. Спроведена анкета "Пет тачака успеха", у оквиру које је испитано рангирање пласмана терестричних орхидеја Фрушке горе, указује на њихов тржишни потенцијал. Добијени резултат посебно истиче врсте *S. spiralis*, *O. purpurea*, *O. militaris* и *H. jankae* као и *A. pyramidalis* и *N. tridentata* због веома атрактивног цвета и способности да расту на сиромашним земљиштима.
Датум прихватања теме од стране Сената: ДП	12. мај 2019. године

Датум одбране: ДО	
Чланови комисије: (име и презиме / титула / звање / назив организације / статус) КО	Ментор: др Мирјана Љубојевић, ванредни професор, област Хотрикултура, Пољопривредни факултет, Нови Сад _____ Председник: др Владислав Огњанов, редовни професор, област Воћарство, Пољопривредни факултет, Нови Сад _____ Члан: др Симонида Ђурић, редовни професор, област Микробиологија, Пољопривредни факултет, Нови Сад _____ Члан: др Љиљана Николић, редовни професор, област Ботаника, Пољопривредни факултет, Нови Сад _____ Члан: др Мирјана Оцокољић, редовни професор, област Пејзажна архитектура и хортикултура, Шумарски факултет, Универзитет у Београду _____

University of Novi Sad
Faculty
Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	MSc Jovana Dulić
Mentor: MN	Prof. dr Mirjana Ljubojević associate professor
Title: TI	Biodiversity and breeding of terrestrial orchids from Fruška gora mountain
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	eng. / srp.
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Province of Vojvodina
Publication year: PY	2019.
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	University of Novi Sad, Faculty of Agriculture, Department of fruit science, viticulture, horticulture and landscape architecture, Dositej Obradović Sq. 8, 21000 Novi Sad

Physical description: PD	9 chapters/ 162 pages/ 24 photos/ 26 graphs/ 20 tables/ 271 references/ 19 attachments/ biography
Scientific field SF	Biotechnical science
Scientific discipline SD	Horticulture
Subject, Key words SKW	Biodiversity, orchid, morphology, cytogenetics, asimbiotic seed germination.
UC	635.924(043.3)
Holding data: HD	Library of the Faculty of Agriculture, University of Novi Sad
Note: N	None
Abstract: AB	Fruška Gora mountain is a natural habitat for a high number of terrestrial orchids. However, the given diversity has never been a subject of breeding processes that would bring them into mass production and use. This research aimed to preserve and use the diversity of terrestrial orchids from the Fruška Gora area, as well as to develop the concept of their breeding for the needs of horticulture and landscape architecture. During the three-year study, 17 species were recorded, which showed high diversity in the preferred habitat as well as in the morphological (qualitative - ornamental and quantitative - developmental) and cytological features. The results of the research indicated that the total gene pool is a unique material of high importance for further conservation as well as its inclusion in breeding programs. Morphological characterization has determined the great diversity of shapes, sizes, and colors of leaves and flowers, which represent a good starting material for the selection of ornamental features of high commercial value. The analysis of edaphic factors showed that most of the species found – *Anacamptis pyramidalis*, *Gymnadenia conopsea*, *Gymnadeia odoratissima*, *Orchis militaris*, *Orchis purpurea*, *Neotinea tridentata*, *Ophrys sphegodes*, *Ophrys scolopax*, *Neotinea ustulata*, *Himantoglossum jankae* and *Epipactis microphylla*, grow on carbonate-rich soils, with poor alkaline soil reactions, while only 5 species grow on soils with weak acidic reactions

	(*Epipactis helleborine*, *Platanthera bifolia*, *Cephalanthera longifolia*, *Limodorum abortivum*, and *Orchis mascula*). Based on the obtained results, it can be concluded that the geological and pedological properties of the substrate influence the distribution of terrestrial orchids. Also, in the majority of the tested species, the presence of endomycorrhizal fungi from the *Rhizoctonia* group was found in the root system, indicating that the tested species maintained symbiosis throughout their life cycle. The effect of different nutrient media and illumination on asymbiotic seed germination under controlled *in vitro* conditions was examined in detail, to find the optimal protocol for their mass propagation. The MM nutrient medium was found to promote seed germination of *A. pyramidalis*, *G. conopsea*, *H. jankae*, *O. militaris*, and *O. sphegodes*. Also, the inhibitory effect of illumination on seed germination indicates that these species have negative photoblastic seeds. In contrast, the ability of *S. spiralis* seeds to germinate in both dark and light conditions leads to the conclusion that this species has neo-photoblastic seeds. The addition of organic supplements, most notably coconut water (CW) and peptone (PE), resulted in the shortened time required for germination of seeds as well as a much higher degree of germination. The "Five Points of Success" survey, which examined the placement ranking of Fruška Gora terrestrial orchids, indicates their market potential. The result obtained highlight the species *S. spiralis*, *O. purpurea*, *O. militaris*, and *H. jankae* as well as *A. pyramidalis* and *N. tridentata* due to their attractive flower and ability to grow on poor soils.
Accepted on Senate on: AS	12th May 2016.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	Menthor: Mirjana Ljubojević, PhD, associate professor Faculty of Agriculture, University of Novi Sad, Scientific discipline: Horticulture _____

	President: Vladislav Ognjanov, PhD, Full time professor Faculty of Agriculture, University of Novi Sad, Scientific discipline: Fruit Science _____ member: Simonida Đurić, PhD, Full time professor Faculty of Agriculture, University of Novi Sad, Scientific discipline: Microbiology _____ member: Ljiljana Nikolić, PhD, Full time professor Faculty of Agriculture, University of Novi Sad, Scientific discipline: Botany _____ Member: Mirjana Ocokoljić, PhD, Full time professor Faculty of Forestry, University of Belgrade, Scientific discipline: Landscape architecture and Horticulture _____

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
НОВИ САД
СРБИЈА
УДК: 635.924(043.3)
ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА
Поднета 2019.

БИОДИВЕРЗИТЕТ ТЕРЕСТРИЧНИХ ОРХИДЕЈА ФРУШКЕ ГОРЕ

Сажетак

Фрушка гора представља природно станиште великог броја терестричних орхидеја, међутим, диверзитет који стоји на располагању никада није био предмет оплемењивачког процеса који би их увео у масовнију производњу и употребу. Циљ овог истраживања био је очување и употреба диверзитета терестричних орхидеја са подручја Фрушке горе, као и развијање концепта њиховог оплемењивања за потребе хортикултуре и пејзажне архитектуре. Током трогодишњег истраживања евидентирано је 17 врста код којих је утврђена велика разноликост како у станишту које настањују тако и у морфолошким (квалитативним – орнаменталним и квантитативним – развојним) и цитолошким особинама. Резултати истраживања су указали да укупан генофонд представља јединствен материјал високог значаја за даљу конзервацију као и укључивање истих у порграме оплемењивања. Морфолошком карактеризацијом је утврђен велики диверзитет облика, величина и боја листова и цветова што представља добру основу за селекцију орнаменталних карактеристика високе комерцијалне вредности. Анализа едафских фактора је показала да већина пронађених врста (*Anacamptis pyramidalis*, *Gymnadenia conopsea*, *Gymnadeia odoratissima*, *Orchis militaris*, *Orchis purpurea*, *Neotinea tridentata*, *Ophrys sphegodes*, *Ophrys scolopax*, *Neotinea ustulata*, *Himantoglossum jankae* и *Epipactis microphylla*) расте на земљиштима богатим карбонатима, слабо алкалне реакције земљишта, док свега 5 врста расте на земљиштима слабо киселе реакције (*Epipactis helleborine*, *Platanthera bifolia*, *Cephalanthera longifolia*, *Limodorum abortivum* и *Orchis mascula)*. На основу добијених резултата може се закључити да геолошка и педолошка својства подлоге утичу на дистрибуцију терестричних орхидеја. Такође, код већине испитиваних врста је у

кореновом систему утврђено присуство ендомикоризних гљива из групе *Rhizoctonia* што указује да испитиване врсте одржавају симбиозу током целог свог животног циклуса. Детаљно је испитан утицај различитих хранљивих подлога и осветљења на асимбиотско клијање семена у контролисаним *in vitro* условима, са циљем изналажења оптималног протокола за њихово масовно умножавање. Утврђено је да хранљива подлога ММ подстиче клијање семена *A. pyramidalis*, *G. conopsea*, *H. jankae*, *O. militaris* и *O. sphegodes*. Такође, инхибиторно деловање осветљења на клијање семена указује да ове врсте имају негативно фотобластично семе. Супротно њима, способност семена *S. spiralis* да клија и у условима мрака и у условима осветљења доводи до закључка да ова врста има неофотобластично семе. Додавање органских суплемената, од којих се највише истичу кокосова вода (CW) и пептон (PE), резултирало је скраћеним временским периодом неопходним за клијање семена као и знатно већим степеном клијавости. Спроведена анкета "Пет тачака успеха", у оквиру које је испитано рангирање пласмана терестричних орхидеја Фрушке горе, указује на њихов тржишни потенцијал. Добијени резултат посебно истиче врсте *S. spiralis*, *O. purpurea*, *O. militaris* и *H. jankae* као и *A. pyramidalis* и *N. tridentata* због веома атрактивног цвета и способности да расту на сиромашним земљиштима.

Кључне речи: Биодиверзитет, орхидеје, морфологија, цитогенетика, асимбиотско клијање семена.

UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF AGRICULTURE
NOVI SAD
SERBIA
UC: 635.924(043.3)
DOCTORAL DISSERTATION
Submitted in 2019.

BIODIVERSITY AND BREEDING OF TERRESTRIAL ORCHIDS FROM FRUŠKA GORA MOUNTAIN

Summary

Fruška Gora mountain is a natural habitat for a high number of terrestrial orchids. However, the given diversity has never been a subject of breeding processes that would bring them into mass production and use. This research aimed to preserve and use the diversity of terrestrial orchids from the Fruška Gora area, as well as to develop the concept of their breeding for the needs of horticulture and landscape architecture. During the three-year study, 17 species were recorded, which showed high diversity in the preferred habitat as well as in the morphological (qualitative - ornamental and quantitative - developmental) and cytological features. The results of the research indicated that the total gene pool is a unique material of high importance for further conservation as well as its inclusion in breeding programs. Morphological characterization has determined the great diversity of shapes, sizes, and colors of leaves and flowers, which represent a good starting material for the selection of ornamental features of high commercial value. The analysis of edaphic factors showed that most of the species found – *Anacamptis pyramidalis*, *Gymnadenia conopsea*, *Gymnadeia odoratissima*, *Orchis militaris*, *Orchis purpurea*, *Neotinea tridentata*, *Ophrys sphegodes*, *Ophrys scolopax*, *Neotinea ustulata*, *Himantoglossum jankae* and *Epipactis microphylla*, grow on carbonate-rich soils, with poor alkaline soil reactions, while only 5 species grow on soils with weak acidic reactions (*Epipactis helleborine*, *Platanthera bifolia*, *Cephalanthera longifolia*, *Limodorum abortivum*, and *Orchis mascula*). Based on the obtained results, it can be concluded that the geological and pedological properties of the substrate influence the distribution of terrestrial orchids. Also, in the majority of the tested species, the presence of endomycorrhizal fungi from the *Rhizoctonia* group was found in the root system, indicating that the tested species maintained symbiosis throughout their life cycle. The effect of different

nutrient media and illumination on asymbiotic seed germination under controlled *in vitro* conditions was examined in detail, to find the optimal protocol for their mass propagation. The MM nutrient medium was found to promote seed germination of *A. pyramidalis*, *G. conopsea*, *H. jankae*, *O. militaris*, and *O. sphegodes*. Also, the inhibitory effect of illumination on seed germination indicates that these species have negative photoblastic seeds. In contrast, the ability of *S. spiralis* seeds to germinate in both dark and light conditions leads to the conclusion that this species has neo-phoboblastic seeds. The addition of organic supplements, most notably coconut water (CW) and peptone (PE), resulted in the shortened time required for germination of seeds as well as a much higher degree of germination. The "Five Points of Success" survey, which examined the placement ranking of Fruška Gora terrestrial orchids, indicates their market potential. The result obtained highlight the species *S. spiralis*, *O. purpurea*, *O. militaris*, and *H. jankae* as well as *A. pyramidalis* and *N. tridentata* due to their attractive flower and ability to grow on poor soils.

Key words: Biodiversity, orchid, morphology, cytogenetics, asimbiotic seed germination.

ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА

LC – мала забринутост (енг. **L**ast **c**oncern)

NT – скоро угрожена (енг. **N**ear **t**hreatened)

IUCN – **I**nternational **U**nion for **C**onservation **N**ature

CITES – **C**onvention on **I**nternational **T**rade in **E**ndangered **S**pecies

SWOT - **S**trengths, **W**eaknesses, **O**pportunities, and **T**hreats

UPOV – (енг. The International **U**nion for the **P**rotection **o**f New **V**arieties of Plants) – Интернационална комсија за биљне генетичке ресурсе

DAPI – 4,6 – diamidino – 2 denilindola

СП – Ситан песак

КП - Крупан песак

КС – Knudson C хранљива подлога

ММ – Malmgren хранљива подлога

CW - Кокосова вода (енг. Coconut water)

PJ - Сок од ананаса (енг. Pinapple jouce)

PE - Пептон

CA - Казеин (енг. Casein hydrolysate)

А – адитиви (L – глутамин и фолна киселина)

PDA – **P**otato **d**extrose **a**gar хранљива подлога

С / М - Светло / Мрак

ОЛ – Облик листа

БЛ – Боја листа

ПЦД – Положај цветне дршке

ГЛ:О – Горњи листић спољашњег круга цветног омотача: Облик

БЛ:О – Бочни листићи спољашњег круга цветног омотача: Облик

БЛ:ВМ – Бочни листићи спољашњег круга цветног омотача: Валовитост маргина

СКЦО: ББ – Спољашњи круг цветног омотача: Број боја

УК(Б): О – Унутрашњи круг цветног омотача (бочни листићи): Облик

УК(Б): ВМ – Унутрашњи круг цветног омотача (бочни листићи): Валовитост маргина

УК(Б): ББ – Унутрашњи круг цветног омотача (бочни листићи): Број боја

Л:ББ – Лабелум: Број боја

Л:ВМ – Лабелум: Валовитост маргина

МДА – **М**ултивариациона **д**искриминантна **а**нализа (**M**ultivariate **d**iscriminant **a**nalysis)

ГК – Главне компоненте

PL -Ниво плоидности

САДРЖАЈ

1. УВОД 1
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ 3
2.1. Систематика и распрострањеност 3
2.2. Основне морфолошке карактеристике анализираних врста 5
2.3. Цитологија терестричних орхидеја 11
2.4. Угроженост биодиверзитета терестричних орхидеја 13
2.5. Оплемењивање орхидеја 14
2.6. Генеративно размножавање терестричних орхидеја 16
2.7. Микориза терестричних орхидеја 17
2.8. Примена *in vitro* културе биљних ткива у сврху наклијавања семена терестричних орхидеја 19
2.8.1. Асимбиотско клијање семена орхидеја *in vitro* 20
2.9. Примена терестричних орхидеја 24
3. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА 25
4. РАДНА ХИПОТЕЗА 26
5. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА 27
5.1. Материјал 27
5.2. Методе 27
5.2.1. Евидентирање и мапирање биљног материјала 27
5.2.2. Морфолошка карактеризација испитиваних врста 29
5.2.3. Цитолошка карактеризација испитиваних врста 30
5.2.3.1. Испитивање бројности хромозома 31
5.2.3.2. Одређивање величине генома методом проточне цитометрије 32
5.2.4. Испитивање едафских карактеристика станишта 33
5.2.4.1. Геолошка анализа станишта 33
5.2.4.2. Педолошка анализа станишта 33
5.2.5. Асимбиотско клијање семена у *in vitro* условима 35
5.2.5.1. Култура недозрелих семена 36
5.2.5.2. Култура зрелих семена – колекционисање, складиштење и испитивање виабилности семена 36
5.2.6. Изолација и идентификација гљива из кореновог система 39
5.2.6.1. Стерилизација биљног материјала и изолација гљива 40

5.2.6.2. Морфолошка карактеризација гљива 40
5.2.7. Анкета „Рангирање потенцијалног пласмана врста на тржшту“ 41
5.2.8. Статистичке методе обраде података 42
6. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА 43
6.1. Генетички диверзитет испитиваног материјала 43
6.1.1. Евидентирање и мапирање терестричних орхидеја *in situ* 43
6.1.2. Диверзитет терестричних орхидеја утврђен на основу мофолошке и цитолошке карактеризације 47
6.1.2.1. Морфолошка карактеризација терестричних орхидеја заснована на квантитативним и квалитативним особинама 47
6.1.2.1.1. Анализа главних компонената испитиваних квалитативних и квантитативних података 53
6.1.2.1.2. Мултивариациона дискриминантна анализа квантитативних морфолошких карактеристика 56
6.1.2.2. Цитолошка карактеризација испитиваних врста 58
6.1.2.2.1. Мултивариациона кластер анализа цитолошких особина 61
6.2. Анализа едафских особина станишта 63
6.2.1. Геолошке карактеристике обрађених локалитета 63
6.2.2. Педолошка анализа станишта 66
6.2.2.1.Физичке особине земљишта 66
6.2.2.2. Хемијска својства земљишта 67
6.3. Асимбиотско клијање семена у *in vitro* условима 71
6.3.1. Укупна клијавост семена *in vitro* 71
6.3.2. Клијање семена праћено кроз фазе развоја сејанца 73
6.3.3. Морфометријске особина ембриона и протокорма 84
6.4. Изолација и морфолошка идентификација гљива 94
6.4.1. Гљиве изоловане из врсте *Gymnadenia conopsea* 94
6.4.2. Гљиве изоловане из кореновог система врсте *Gymnadenia odoratissima* 97
6.4.3. Гљиве изоловане из кореновог система врста *Anacamptis pyramidalis*, *Ophrys sphegodes*, *Epipactis microphylla* 101
6.5. Оцењивање пронађених врста према декоративности 105
7. ДИСКУСИЈА 107
7.1. Биодиверзитет терестричних орхидеја Фрушке горе, морфологија и цитологија испитиваних врста 107
7.2. Едафске особине станишта испитиваних врста 110

7.3. Изолација и морфолошка карактеризација микоризних гљива 111
7.4. Асимбиотско клијање семена 113
7.5. Потребе тржишта за терестричним орхидејама 119
7.6. SWOT анализа генетичког диверзитета терестричних орхидеја са вишеструком потенцијалном употребом у хортикултури 121
7.7. Изградња модела сорте 122
8. ЗАКЉУЧАК 124
9. ЛИТЕРАТУРА 127
ПРИЛОЗИ 149
БИОГРАФИЈА 162

1. УВОД

Људска егзистенција се заснива на искоришћавању природних ресурса који представљају важан извор сировина за стабилну економију и одржив друштвени развој (Aina et al., 1992). Иако је њихова употреба до недавно била искључиво локалног/регионалног и културног карактера, глобализација доводи до проширења тржишних граница, а самим тим и до увећане и разноврснije потражње. Повећана потражња за новим декоративним биљним врстама и сортама се ослања на увођење и селекцију егзотичних примерака из природних популација. Међутим, неконтролисано коришћење природног богатства може узроковати озбиљна и неповратна оштећења биљних популација, а самим тим и нарушити функционисање екосистема.

Још од давнина, биљке цветнице су налазиле своју примену у хортикултури, фармацеутској, козметичкој и прехрамбеној индустрији. Најбројнија фамилија цветница, која припада овој групи биљака јесте фамилија Orchidaceae Juss. која броји 850 родова и 25 000 врста и као таква чини 10% од укупног броја ангиосперми (Chase et al., 2003; Roberts and Dixon, 2008). Фамилију Orchidaceae поред многобројности карактерише и висок степен распростирања (широка распрострањеност) што је чини космополитском фамилијом.

Терестричне орхидеје - група орхидеја чији се развојни циклус одвија на и у земљишту, има око 4000 врста (Dressler, 1981). Због изразито велике декоративности, дугог животног века и периода цветања, као и велике адаптибилне способности на различите услове средине, терестричне орхидеје могу имати велики значај у хортикултури и пејзажној архитектури. Међутим, за разлику од комерцијалних орхидеја (*Phalaenopsis* spp.), које представљају најпродаванију цветницу у Европи са око 1,2 милиона продатих јединки на годишњем нивоу, терестричне орхидеје нису толико заступљене на тржишту. Као један од основних разлога истиче се сложена процедура размножавања из семена (генеративног умножавања).

Популације терестричних орхидеја налазе се у *in situ* условима, изложене константном утицају антропогених фактора. Са друге стране, формирање *ex situ* банке гена је веома тешко јер је за терестричне орхидеје карактеристично веома ситно семе, једноставне структуре, са недовољно диференцираним ембрионом, без хранљивог ткива. Ова ограничења представљају разлоге због којих је размножавање терестричних орхидеја отежано и због чега се нису нашле масовније у употреби као орнаменталне

биљке. Семена многих врста терестричних орхидеја умереног подручја остају дормантна у земљишту током зиме и клијају у пролеће. Међутим, њихово клијање је условљено успостављањем симбиозе са микоризним гљивама. Инокулација се може успоставити и у *in vitro* условима, али није сигурно да ће она бити успешна као у природи. Иако је могуће успоставити симбиотску герминацију семена у *in vitro* условима, у последње време све више пажње се посвећује асимбиотској герминацији која је знатно поједноставила процедуру и представља идеални систем за праћење клијања семена и развоја сејанаца. Изналажењем одговарајућег протокола за њихово брзо и лако умножавање превазишле би се баријере које стоје на путу масовној продукцији и употреби терестричних орхидеја као цветних таксона различитих намена. Масовнија продукција уједно би обезбедила довољно почетног материјала за избор родитељских комбинација за планска укрштања и креирање генотипова погодних за широку употребу у хортикултури и пејзажној архитектури.

На територији републике Србије су евидентиране 72 врсте и подврсте терестричних орхидеја (Diklić, 1976; Karadžić et al., 2000; Đorđević et al., 2010) од којих 32 расту на територији Фрушке горе (Savić, 1998). Иако терестричне орхидеје Фрушке горе заокупљују пажњу биолога и еколога већ више деценија (Savić, 1998), диверзитет који стоји на располагању никада није био предмет оплемењивачког процеса који би их увео у масовнију производњу и употребу. Постојећи генофонд као и потенцијални хибриди настали рекомбинацијом својстава могу представљати јединствен почетни материјал за потребе оплемењивања ове групе цветница, са циљем примене на урбаним и руралним јавним зеленим просторима (или различитим категоријама јавног и приватног зеленила), као и аматерским цветњацима и окућницама. Такође, слаба репродуктивна баријера, осносно могућност међуврсне хибридизације, чини орхидеје једном од најинтересантних биљних група за стварање пожељних хибрида (Hossain et al., 2013).

На основу свега наведеног, неопходно је утврдити биодиверзитет, услове окружења и недостатке у *in situ* популацијама и *ex situ* колекцијама, који даље могу бити од значаја за њихову конзервацију, масовнију примену у хортикултури и пејзажној архитектури, као и њихово укључивање у програме оплемењивања.

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.1. Систематика и распрострањеност

Иако је њихово присуство забележено на сваком контитенту изузев Антарктика, већина орхидеја расте у тропском и суптропском појасу док је флора орхидеја у умереном појасу знатно сиромашнија (Dressler, 1993). Слично запажање објавили су Myers et al. (2000) истичући да су дистрибуција и бројност орхидеја претежно оријентисане ка тропима и варирају међу континентима и у оквиру региона, пратећи места са великим бројем врста и ендемичних ангиосперми. Тако су, према наводима Cribb et al. (2003), колумбијски и еквадорски Анди предео са највећим регистрованим биодиверзитетом орхидеја, где је евидентирана готово четвртина од укупног броја врста.

Врсте које припадају фамилији Orchidaceae се разликују према подлози коју настањују и као такве се могу поделити у четири групе: епифите, терестричне, литофите и сапрофите. Најбројније су епифите, којима припада око 70% (Gravandeell et al., 2004), док терестричне орхидеје чине око 25% и најчешће су заступљене у умереном појасу (Artwood, 1986; Hossain et al., 2013). Површине богате орхидејама обухватају северне Анде, Суматру, Мадагаскар и Борнео и ту су искључиво заступљене епифитне орхидеје, затим Индокинеско полуострво где су једнако заступљене и епифитне и терестричне орхидеје и Југозападну Аустралију која је позната као најбогатији центар терестричних орхидеја (Cribb et al., 2003). Са друге стране, знатно слабији диверзитет орхидеја забележен је у умереном појасу где према наводима Gladkova (1982) у Северној Америци расте 170 врста, у целој Европи расте 215 врста из 36 родова (Stewart, 1989), док Hagsater и Dumont (1996) наводе да у Европи, Северној Америци као и на Блиском истоку забележено преко 300 врста терестричних орхидеја.

Фамилија Orchidaceae представља најбројнију фамилију и са преко 850 родова и преко 25 000 врста чини око 10% од укупног броја цветница (Chase et al., 2003; Roberts and Dixon, 2008). Према Takhtajan (2009) фамилија Orchidaceae је подељена на 6 потфамилија: Apostasiodeae, Vanilloideae, Cypripediodeae, Neottioideae, Epidendroideae и Orchidoideae.

Таксономски преглед орхидеја према Takhtajan (2009) констатованих на истраживаном подручју:

Царство: Plantae
Раздео: Magnoliophyta
Класа: Liliopsida
Подкласа: Liliidae
Ред: Orchidales
Фамилија: Orchidaceae
Потфамилија: Orchidoideae
Род: *Orchis*
Врсте: *Orchis purpurea* Huds.
Orchis militaris L.
Orchis mascula L.
Род: *Anacamptis*
Врсте: *Anacamptis pyramidalis* (L.) Rich
Род: *Neotinea*
Врсте: *Neotinea ustulata* (L.) R.Bateman, Pridgeon & M.W.Chase
Neotinea tridentata (Scop.) R.M.Bateman, Pridgeon & M.W.Chase
Род: *Gymnadenia*
Врсте: *Gymnadenia odoratissima* (L.) Rich
Gymnadenia conopsea (L.) R.Br.
Род: *Ophrys*
Врсте: *Ophrys sphegodes* Mill.
Ophrys scolopax Cav.
Род: *Himantoglossum*
Врсте: *Himantoglossum jankae* Spreng.
Род: *Platanthera*
Врсте: *Platanthera bifolia* (L.) L.C.Rich
Род: *Spiranthes*
Врста: *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall.
Потфамилија: Neottioideae
Род: *Epipactis*
Врсте: *Epipactis helleborine* (L.) Crantz
Epipactis microphylla (Ehrh.) Sw.
Род: *Limodorum*
Врсте: *Limodorum abortivum* (L.) Sw.
Род: *Cephalanthera*
Врсте: *Cephalanthera longifolia* (L.) Fritsch

Фамилију Orchidaceae чине вишегодишње, зељасте биљке, често епифите и сапрофите са кореном, кртолама или ризомом. Листови су им наизменично, ретко наспрамно или пршљенасто распоређени, цели, са рукавцем, код епифита и сапрофита су углавном редуковани. Цветови су изразито зигоморфни, сакупљени у цвасти. Цветни омотач је прост (перигон) из два пршљена са по три листића, углавном круницоликог типа. Непарни доњи листић унутрашњег круга перигона већином се разликује обликом и бојом од осталих листића и гради тзв. усну или лабелум (labellum) која је код неких врста издужена у дугачку остругу. Андрецеум чине два или само један прашник. Тучак са састоји из три оплодна листића, плодник је подцветан. Плод је чаура са великим бројем семена који имају веома чврсту семењачу и слабо диференцирану клицу (ембрион) (Diklić, 1976; Tatić and Blečić, 2002).

2.2. Основне морфолошке карактеристике анализираних врста

***Anacamptis pyramidalis* (L.) Rich. – Пластак –** вишегодишња биљка која расте на сунчаним и полуосунчаним падинама, проређеним шумама и ливадама, на кречњачким земљиштима. Достиже висину од 20-60 cm. Стабло је веома танко, у горњем делу угласто, док је при основи прекривено са неколико мрких листова у виду рукавца. Листови су линеарно ланцетасти, на врху зашиљени, светло зелене боје, распоређени дуж целог стабла. Цваст класолика, збијена, пирамидалног облика, док се ретко могу наћи јединке са лоптастим или ваљкастим обликом цвасти. Цваст је састављена од великог броја ситних цветова, који најчешће имају пурпурноцрвену боју, док је ређе заступљена бела боја цветова. Цвета од маја до јула (Harp and Harp, 2005). У Србији се налази на листи строго заштићених врста, док је према глобалној категоризацији IUCN уврштена у категорију мала забринутост (LC).

***Orchis militaris* (L.) – Солдатски каћун** – врста орхидеје која се најчешће може наћи у полусеновитом подручју, између жбунова на ливадама и ободима шума, на добро дренираном кречњачком земљишту (Stroh, 2016). Ово је релативно дуговечна орхидеја, која према неким наводима литературе има животни век минимално 10 година (Harp and Harp, 2005). Просечна висина се креће од 20-45 cm. Стабло је круто, светло зелене боје, у горњем делу угласто док је у основи прекривено листовим у виду рукавца. Листови су груписани у доњем делу стабла, док је горњи део стабла без листова. Цваст је у почетку цветања купаста, касније округло јајаста или издужена, састављена од бројних цветова, светлијих или тамнијих нијанси љубичасте боје, ређе

беличасти или потпуно бели. Цвета у мају месецу (Harp and Harp, 2005). Према IUCN Црвеној листи популације ове врсте су у значајном опадању и уврштена је у категорију мала забринутост (LC). У Србији се налази на листи строго заштићених врста.

***Orchis purpurea* Huds. – Каћун –** врста која настањује сеновита и полусеновита подручја као што су листопадне шуме, ободи шума и ливаде. Од тренутка клијања до првог цветања најчешће је потребно од 8 до 10 година. Дуговечна орхидеја чији животни век након цветања траје минимум 10 година. Висина стабла креће се од 30-100 cm, у горњем делу је углавном угласто и често пурпурне боје. Лисна розета је груписана у доњем делу стабла, док је за листове карактеристичан широко елиптични до издужено јајасти одлик. Цваст је класолика, велика, у почетку цветања купаста, касније добија јајасти до ваљкасти облик. Цветови крупни, беличасти са љубичастим пегама. Листићи перигона су скупљени у виду шиљасте отворене кациге, са унутрашње стране зеленкасте, а са спољашње љубичасте боје. Цвета у мају и јуну месецу (Harp and Harp, 2005). Према IUCN Црвеној листи *O. purpurea* је означена као врста чија је бројност и заступљеност популација у констатном опадању. На листи је биљака заштићених као природне реткоси у Србији, док је на глобалном нивоу од стране IUCN уврштена у категорију мала забринутост (LC).

***Orchis mascula* (L.) L. – Каћунак –** Врста која настањује сеновите терене, листопадне шуме и обронке шума. Може се наћи на различитим типовима земљишта, али су то најчешће кречњачка земљишта неутралне до слабо киселе реакције (Summerhayes, 1951; Rackham, 2003; Jacquemyn et al., 2009). Висина се креће од 10-45 cm, има светло зелено стабло која често има и црвенкасто-љубичасте нијансе. У горњем делу стабло је нешто угласто, док је у доњем делу прекривено листовима у виду рукавца. Листови су издужено ланцетасти до ланцетасти, зелене боје са истакнутим нервима, не ретко прекривени тамно љубичастим пегама. Цваст је састављена од већег броја цветова, јајастог облика у почетку цветања, а касније ваљкаста. Цветови су средње величине, различитих нијанси љубичасте боје. Спада у групу орхидеја које прве почињу цветање, април – мај (Harp and Harp, 2005). У Србији се налази на листи строго заштићених врста, док је према глобалној категоризацији IUCN уврштена у категорију мала забринутост (LC).

***Neotinea tridentate* (Scop.) R.M. Bateman, Pridgeon & M.W Chase – Мали каћунак –** Врста чије природно станиште представљају полуосенчена и осунчана подручја, као што су ободи шума и ливаде прекривене жбунастом вегетацијом. Најчешће настањује сува до релативно влажна кречњачка земљишта. Достиже висину

од 15-40 cm, стабло је круто, светло зелено, у горњем делу незнатно угласто, док је у основи обухваћено листовима у виду рукавца. Листови су зелене боје са плавичастом превлаком. Цваст је збијена и има велики број цветова, у почетку купаста, касније округласто јајаста или издужена. Цветови су најчешће светлије или тамније нијансе љубичасте и ружичасте боје, ређе беличасти или потпуно бели. Цвета од априла до јуна (Rossi, 2002). Прецизна заступљеност и величина популација на глобалном нивоу није позната, али је према IUCN критеријумима оцењен опадајући тренд и спада у категорију мала забринутост (LC). У Србији је се налази на листи биљака заштићених као природне реткости.

***Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br. – Врањак –** је терестрична орхидеја која најчешће насељава влажне ливаде и падине прекривене жбуњем. Најчешће настањује земљишта настала на креди или кречњаку (Meekers et al., 2012). Висока је од 10 до 60 cm, стабло је круто, на попречном пресеку округло, светло зелене боје. Има три до пет базалних листова, широко до уско ланцетастих, издужених, са израженим нервом и зашиљеним врхом, зелени. Цваст је издужена, дугачка до 20 cm, ваљкаста, састављена од великог броја цветова, растресита. Што се више цветова отвара, цваст постаје гушћа. Цветови су ситни, једнобојни, розе или љубичасте нијансе. Цвета од краја маја до почетка јула месеца. Временски период између клијања семена и цветања у природним условима углавном износи 3 до 5 година (Harp and Harp, 2005). Према IUCN Црвеној листи популације ове врсте су у значајном опадању и уврштена је у категорију мала забринутост (LC). У Србији се налази на листи строго заштићених врста.

***Gymnadenia odoratissima* (L.) Rich. – Миришљави врањак –** Врста која углавном настањује кречњачке подлоге, суве до влажне ливаде и падине прекривене жбуњем. Достиже висину од 15 до 40 cm. Стабло је танко, у доњем делу округласто, у горњем делу угласто, при основи са дугачким, лабаво прилеглим шиљатим листовима у виду рукавца. Листови су узани, линеарни до линеарно ланцетасти, са зашиљеним врхом, са слабо израженим нервима. Цваст је у почетку купаста, док у пуном цветању добија ваљкаст облик, и састоји се од великог броја ситних цветова, пријатног мириса (Rossi, 2002). Цвета од маја до јула. Према IUCN Црвеној листи популације ове врсте су у значајном опадању и уврштена је у категорију мала забринутост (LC). У Србији се налази на листи строго заштићених врста.

***Ophrys sphegodes* Mill. – Ситан шаренбубац –** Врста из рода *Ophrys* која због изгледа цвета има јединствени систем опрашивања познатији као псеудокопулација. Наиме, ова врста има цвет који личи на женку пчеле *Andrena nigroaenea* те се

опрашивање врши обмањивањем мушких јединки ове врсте. Расту на осунчаним падинама на супстратима који належу на кредне и јурске кречњаке (Jacquemyn et al., 2015). Висина стабла се креће од 10 до 45 cm, жуто-зелене боје. Листови су сиво-зелене до зелене боје са истакнутим нервима, издужено елиптични до широко ланцетасти, доњи листови (3-6) су најразвијенији, а у горњем делу (2-6) су у виду рукавца или брактеја. Цваст је састављена од 2-9 цветова, жуто-зелене боје. Спада у групу орхидеја које међу првима почињу са цветањем, од априла до маја месеца (Harp and Harp, 2005). На листи је биљака заштићених као природне реткости Србије. Због тренутно заступљене конфузије са другим таксонима још увек није познат тренд популације ове врсте на глобалном нивоу (IUCN Red list; Pedersen and Faurholdt, 2007).

***Ophrys scolopax* Cav. ssp. Cornuta (Steve.) E.G.Camus – Мачково уво –** И за ову врсту терестричне орхидеје је карактеристично опрашивање псеудокопулацијом. Њено природно станиште представљају ливаде и пропланци дуж обода шума. Стабло је високо до 35 cm. Има 3-6 приземних листова, издужено ланцетастог или елиптичног облика и у горњем делу 2-4 листа у виду рукавца. Цваст је састављена од 3-12 цветова који су различите величине. Цветање почиње током априла и траје до јуна месеца (Rossi, 2002). На листи је биљака заштићених као природне реткости Србије и заштићена је CITES конвенцијом.

***Limodorum abortivum* (L.) Sw. – Остружница, Шиљореп –** мико-хетеротрофна врста која настањује проређене храстово – грабове шуме. Најчешће се може наћи на кречњачким земљиштима или на земљиштима насталим на магматским стенама (Wood, 1993). Углавном робусна врста која достиже висину до 80 cm. Стабло може бити сиве, смеђе или најчешће љубичасте боје, прекривено малобројним мркољубичастим, кратким, на врху зашиљеним листовима у виду рукавца. Цваст је гроздаста, издужена и растресита, садржи 4-20 крупних љубичастих цветова (Rossi, 2002). На листи је биљака заштићених као природне реткости у Србији. Много више је распорстањена у јужнијим пределима у односу на северне. Тренутно није позната укупна величина популација на глобалном нивоу, али обично расте у популацијама које садрже мали број јединки (IUCN Red List; Bournérias and Prat, 2005; Delforge, 1995; GIROS, 2009; Pignatti, 1982; Rossi, 2002; Vakhrameeva et al., 2008). Према IUCN Црвеној листи ова врста спада у категорију мале забринутости (LC).

***Platanthera bifolia* Boenn. – Вимењак –** Расте у отвореним, листопадним шумама, од низина до алпског појаса, најчешће на кречњачким земљиштима слабо киселе реакције (Harp and Harp, 2005). Стабло висине 15-45 cm, бледо зелене боје, угласто

према врху, а при основи обавијено са два зашиљена узано ланцетаста листа у виду рукавца. Листови су бледо зелене боје, широко јајасти до издужени, најчешће 2, ређе 3 и стоје један наспрам другог. Поред ова два главна листа, на стаблу се налази још 1-5 мањих ланцетастих листића која подсећају на брактеје. Цваст је углавном растресита, ваљкаста, садржи 5-25 цветова. Цветови беличасти, пријатног мириса. Цвета крајем маја и током јуна (Harp and Harp, 2005). Према статусу IUCN Црвене листе популације ове врсте имају опадајући тренд и сврстане су у категорију мале забринутости (LC).

Himantoglossum jankae **Spreng. - Смичак –** робусна врста која искључиво расте на добро дренираним кречњачким земљиштима, и у ретким сличајевима на глиновитим или песковитим земљиштима (Harp and Harp, 2005), по ободима шума, светлим шикарама и осунчаним затрављеним падинама. До недавно се водила под називом *H. caprinum* (M.Bieb.) Spreng. која насељава искључиво северозападни регион Мале Азије. (Molnár et al., 2012). Стабло је обично високо од 30-110 cm, прекривено листовима, у горњем делу угласто. Листови смештени у основи стабла у виду рукавца, издужено јајасти до издужено ланцетасти, меснати, пре почетка цветања плаво-зелени, док у току цветања добијају жућкасту боју. Цваст класолика, растресита, састављена од великог броја цветова (Molnár et al., 2012). На Балканском полуострву тренутно су познате само фрагментисане популације ове врсте са веома малим бројем јединки (Bateman et al., 2017). *H. jankae* (на званичним сајтовима заведена као *H. caprinum*) је под заштитом у већини земаља у којој је евидентирано њено присуство (Molnár et al., 2012).

Spiranthes spiralis **(L.) Chevall – Засучак –** Врста чије станиште представљају осунчане и суве ливаде и пустаре. Може се наћи на различитим типовима земљишта, од кречњачких до пешчаних и шљунковитих дина слабо киселе реакције (Jacquemyn and Hutchings, 2010). Стабло је висине 3-20 cm, плаво-зелене боје, у горњем делу прекривено длачицама. Листови су јајасти до јајасто ланцетасти, груписани у розету, обавијајући пупољак из кога ће се наредне године развити цваст. Цваст је узана, збијена и садржи велики број малих беличастих цветова који су спирално распоређени по цветној дршци. Ово је врста орхидеје која има најкасније цветање, од краја августа до октобра (Harp and Harp, 2005). На листи је биљака заштићених као природне реткости у Србији, док је на Фрушкој гори доста ретка. На глобалном нивоу, број и величина популација ове врсте су у опадању (Jacquemyn and Hutchings, 2010).

Epipactis helleborine **(L.) Crantz. – Калуђерка широколисна–** Врста која расте у листопадним, углавном буковим шумама. Најчешће настањује умерено влажна земљишта, киселе до неутралне реакције, док се у неким случајевима може наћи на

карбонатним земљиштима (Robatsch, 1983). Стабло најчешће достиже висину од 25-80 cm, усправно, у основи обавијено листовима у виду рукавца, у горњем делу прекривено маљама, зелене боје. Листови су округласти, широко јајасти до издужено ланцетасти са зашиљеним врхом, тамнозелени, прекривени ситним длачицама. Цваст је класолика, растресита, издужена и састоји се од великог броја зеленкастих цветова који су постављени у висећи положај пре цветања. Цвета од краја јуна до почетка августа месеца. Ова врста такође живи у асоцијацији са ектомикоризним гљивама које их снадбевају хранљивим материјама из кореновог система оближњих стабала (Harp and Harp, 2005). Према наводима Harp and Harp (2005), период између клијања и првог цветања најчешће износи 18 месеци, мада им је некада потребно и до 9 година. На глобалном нивоу популације ове врсте имају опадајући тренд и званични статус IUCN Црвене листе мала забринутост (LC).

***Epipactis microphylla* (Ehrh.) Sw.** – Ова врста воли сеновита подручја као што су засенчене листопадне шуме. Најчешће настањује карбонатна земљишта (Landwehr, 1983). Достиже висину од 15 – 45 cm, стабло је танко, нежно, зелене боје, прекривено маљама у горњем делу. Листови веома мали, јајасто ланцетасти до линеарно ланцетасти. Цваст растресита, састављена од малог броја ситних црвенкасто зелених цветова. Цвета у јуну и јулу месецу (Rossi, 2002). Према IUCN Црвеној листи ова врста има категорију скоро угрожена (NT), популације су веома мале и имају тенденцију опадања у свим државама у којима су заступљене (Bournérias and Prat, 2005; Delforge, 1995; GIROS, 2009; Pignatti, 1982; Rossi, 2002; Tsintides et al., 2007), док се у Србији налази на листи строго заштићених врста.

***Neotinea ustulata* (L.) R.Bateman, Pridgeon & M.W.Chase – Каћун медени –** Расте на затрављеним површинама као што су ливаде и шумске чистине, од низина до алпског појаса. Најчешће се може наћи на хумусном и добро аерисаним кречњачким земљиштима (Tali et al., 2004). Стабло достиже висину од 5-30 cm, светло зелене боје. Листови су издужено ланцетасти, зашиљени на врху, плаво-зелене боје. Цваст је класолика, растресита, пре цветања јајаста до округласта, црвено-пурпурне боје, садржи велики број малих цветова пријатног мириса. Цвета од јуна до августа месеца. У природним условима биљкама је потребно до три године од клијања семена до почетка цветања. Свака јединка може да цвета 4 узастопне сезоне (у неким случајевима и 7), након чега биљка завршава животни циклус или улази у период дормантности (Harp and Harp, 2005). Бројност и величина популација на глобалном нивоу није

позната, међутим, према евиденцији IUCN Црвене листе долази до брзог смањења популација. У Србији се налази на листи строго заштићених врста.

***Cephalanthera longifolia* (L.) Fritsch – Заврата бела –** Врста која расте у листопадним шумама и шикарама. Ова врста настањује алкална кречњачка земљишта, али може да настањује и декалцификована земљишта (Harp and Harp, 2005). Висина стабла се креће од 15-60 cm. Стабло је витко и прекривено бројним листовима све до цвасти. Цваст је класоклика, растресита, издужена и састоји се од 3-20 белих цветова средње величине. Цвета у априлу и мају месецу. Није познато колики временски период је потребан да прође између клијања семена и првог цветања, док је у лабораторијским условима потребно око две и по године (Harp and Harp, 2005). Величина популације и тренд истих на глобалном нивоу нису познате, међутим, постоје литературни наводи који указују на опадајући тренд на неколико локалитета (Lang 2004; Delforge, 1995). Према категоризацији IUCN Црвене листе има статус мала забринутост (LC).

2.3. Цитологија терестричних орхидеја

Идентификација основног броја хромозома орхидеја представља основу за разумевање нивоа плоидности врста које спадају у ову фамилију, као и саму повезаност између њих (Felix and Guerra, 2005). Фамилија Orchidaceae је космополитска и релативно млада фалимија која броји велики број врста, што условљава велику различитост када је у питању број хромозома. Такође, честа појава полиплоидности и анеуплоидности доприноси хромозомској варијабилности ове фамилије. Према наводима D'Emerico et al. (1999, 2000) анеуплоидност је већ окарактерисана као механизам еволуције кариотипа код неких родова орхидеја као што су Epipactis, Limodorum и Listera. На пример, код врсте *Epipactis aspromontana* су пронађене индивидуе код којих је било могуће утврдити низ анеуплоидних серија са 46,47,48,49,50,51,52, и 53 хромозома (Giuseppina et al., 2010), док су код врсте *Limodorum abortivum* пронађена два цитотипа са диплоидним различитим бројем хромозома 2n=56 и 2n=60 (D'Emerico et al., 1999). Постоје наговештаји да централна физија или фузија представља механизам укључен у анеуплоидну диференцијацију хромозома (Cox et al., 1998).

Фамилија Orchidaceae је подељена на 6 потфамилија: Apostasiodeae, Vanilloideae, Cypripediodeae, Neottioideae, Epidendroideae и Orchidoideae (Takhtajan 2009). Према наводима Okada (1988), потфамилију Apostasioideae одликује број хромозома n=24, док потфамилију Cypripedioideae одликује знатно мањи број хромозома n=10, 13 (Cox et al., 1998). Потфамилију Orchidoideae карактерише велика варијабилност у броју хромозома, која се креће од n=7 до n=84 (Felix and Guera, 1998). У својој студији, Felix and Guerra (2005) су утврдили да су код потфамилија највише заступљене полиплоидне серије 7, 14, 21, 28, 42, да је основни број хромозома терестричних орхидеја n=7, као и да се већина родова састоји од палеополиплоида, што објашњава валику варијабилност хромозома.

Група аутора D'emerico et al. (1993) су за врсту *A. pyramidalis* утврдили да могу постојати три кариотипа, диплоид 2n=36, триплоид 2n=54 и тетраплоид 2n=72. Они су затим анализирали јединке са љубичастим, розе и белим цветовима, из две различите популације, и утрвдили уску повезаност између кариотипа и обојености цветова, тако да су јединке са љубичастим цветом окарактерисане као диплоиди, а цветови са белим цветом као тетраплоиди. Они су такође објаснили да су триплоидне јединке са розе цветовима настале укрштањем диплоидне љубичасте јединке и тетраплоидне беле јединке. Група аутора Marhold et al. (2005) су код врсте *Gymnadenia conopsea* утврдили популације са два нивоа плоидности, диплоиде (2n=2x=40) и тетраплоиде (2n=4x=80). У склопу ових популација је чак пронађена једна јединка са 2n=5x=100. У Табели 1 су приказане вредности броја хромозома испитиваних врста на основу литературних навода.

Фамилија Orchidaceae се истиче као фамилија која има највећи опсег величине генома од свих цветница који се креће у распону од 0,33-55,4 pg/1C. Потфамилије Vanillioideae и Cypripedioideae имају највећу величину генома чије се 1C вредности крећу од 7,3-55,4 pg за прву и 4,1-43,1 pg за другу потфамилију. Прате их Epidendroideae са 0,3-19,8 pg и Orchidoideae са распоном од 2,9-16,4 pg, док најмањи распон има потфамилија Apostasioideae са 0,4-6,0 pg (Leitch et al., 2009).

Велика варијабилност између потфамилија и родова у величини генома (Leitch et al., 2009) и броју хромозома (Felix and Guera, 2005) указује на висок степен диверзитета и сложене еволутивне процесе у оквиру фамилије Orchidaceae.

Табела1. Бројност хромозома терестричних орхидеја

Род	**Врста**	**Број хромозома (2n)**	**Извор**
Anacamptis	*A. pyramidalis*	36, 54, 72	D'emerico et al. (1993)
Orchis	*O. militaris*	42	Kamari et al. (1995)
	O. purpurea	42	Kamari et al. (1995)
	O. mascula	42	Cozzolino et al. (2004)
Neotinea	*N. tridentata*	42	Cozzolino et al. (2004)
	N. ustulata	42	Martinez and Perez (2019)
Gymnadenia	*G. conopsea*	40, 80, 100	Marhold et al. (2005)
	G. odoratissima	40, 80	Hedren et al. (2000)
Ophrys	*O. sphegodes*	36	Bianco et al. (1989)
	O. scolopax	36	Bernardos and Amich (2002)
Limodorum	*L. abortivum*	48,56, 60	Bernardos and Amich (2002) D'Emerico et al. (1999)
Platanthera	*P. bifolia*	42	Nilsson (1983)
Epipactis	*E. helleborine*	20, 36, 38, 40, 44, 60	Weijer (1952); Silvestre (1983); Averyanov et al. (1982)
	E. microphylla	38,40	Kamari et al. (1995); D'emerico et al. (1999)
Himantoglosum	*H. hircinum*	36	D'emerico et al. (1990)
Spiranthes	*S. spiralis*	30	Jacquemyn et al. (2010)
Cephalanthera	*C. longifolia*	32	Moscone et al. (2007)

2.4. Угроженост биодиверзитета терестричних орхидеја

Због изузетно великог диверзитета, али и веома комплексне везе са другим организмима, од којих се највише истиче успостављање симбиозе са одређеним гљивама као и потреба за посебном групом инсеката за опрашивање, орхидеје имају веома високу конзервациону вредност на глобалном нивоу (Jones, 2006; Swarts and Dixon, 2009). Међутим, према наводима Seaton et al. (2010), и даље је присутан значајан пад у бројности и величини популација орхидеја на њиховим природним стаништима. Зависност орхидеја да опрашивачи буду само одређена група инсеката доводи до ограничавања оплодње, а самим тим и до спречавања раста популације приликом чега се подстиче инбридинг депресија (Cribb et al., 2003; Jones, 2006; Brundrett, 2007). Такве мале и фрагментисане популације су изложене негативним антропогеним утицајима у виду неконтролисаног сакупљања и уништавања како надземних делова током периода цветања, тако и подземних органа, који се касније користе у преради (Cribb et al., 2003; Jones 2006; Brundrett, 2007; Swarts and Dixon, 2009). Ово потврђује и чињеница да су све врсте орхидеја укључене у Конвенцију о међународној трговини угроженим врстама

дивље фауне и флоре (CITES), у оквиру којег чине 9,8% Прилога 1, 73% Прилога 2 и 70% од укупног броја врста које су обухваћене овом Конвенцијом (CITES 2013). Такође, запажено је неконтролисао претварање ливада и шума, које представљају природна станишта терестричних орхидеја, у обрадиве површине и викенд насеља, док се многе од њих користе за испашу стоке (Kalopissis, 1988; Dixon et al., 2003; Brundrett, 2007; Swarts and Dixon, 2009; Liu et al., 2010; Paul et al., 2013). Поред тога, према наводима Carey et al. (2002) климатске промене утичу на перформансе орхидеја што се одражава на дистрибуцију самих врста и динамику популације. Као пример негативног утицаја глобалног загревања на одрживост терестричних орхидеја, Robbirt et al. (2014) наводе пример нарушеног ко-еволуцијског односа биљка-опрашивач. Наиме, врста *O. sphegodes* има цвет који личи на женку пчеле *Andrena nigroaenea*, те се опрашивање врши псеудокопулацијом, односно обмањивањем мушких јединки ове врсте. Они су утврдили да уколико пролећне температуре буду нешто више од просечних, повећава се вероватноћа да пчеле започињу свој циклус парења пре цветања ове врсте, што за последицу има изостанак оплодње и плодоношења.

Због свега наведеног, већина терестричних орхидеја се налази под заштитом међународних или националних институција и налази се на листи различитих директива и IUCN Црвене књиге (Phitos et al., 1995; Hagaster and Dumont, 1996; Whigham and Willems, 2003). Интегрисани приступи за очување угрожених врста односе се на умрежавање елокошких и генетичких истраживања, као и *in situ* истраживања и *ex situ* умножавања биљног материјала (Falk, 1990; Ramsay and Dixon, 2003). Према наводима Fay (1994), умножавање биљног материјала помоћу протокола у контролисаним *in vitro* условима показала се као одржива процедура за умножавање ретких и угрожених биљних врста у сврху њиховог очувања, као и шире примене.

2.5. Оплемењивање орхидеја

Орхидеје имају слабу репродуктивну баријеру што их чини изузетно погодним за међусобно укрштање и стварање нових хибрида (Hossain et al., 2013). Краљевско хортикултурно друштво (Royal horticultural industry) је крајем 2011. године регистровало 250 000 култивара и преко 106 000 атрактивних хибрида, створених спонтаном или планском хибридизацијом. (Hossain et al., 2013). Конвенционалне методе оплемењивања које подразумевају класичну хибридизацију могу да трају од 2-

13 година када су у питању орхидеје (Arditti, 1992; Kostenyuk et al., 1999; Sim et al, 2007; Tang and Chen, 2007). Међутим, већина хибрида који се налазе на тржишту, настала је спонтаним и планским укрштањем епифитних тропских врста орхидеја, док је знатно мање пажње посвећено врстама које припадају групи терестричних орхидеја. Према литератури, спонтана међуврсна хибридизација између терестричних орхидеја у природним условима забележена је између врста родова *Gymnadenia* × *Dactylorhiza* (Stace 1975; Preston et al., 2002; Stace, 2010), *Gymnadenia* × *Anacamptis* (Stace 1975) *Gymnadenia* × *Pseudoarchis* (Sell and Murrell, 1996), *Anacamptis* × *Orhis*, *Anacamptis* × *Platanthera* (Savić, 1998), као и унутарврсна хибридизација врста које припадају родовима *Anacamptis*, *Orchis, Ophrys, Gymnadenia, Neotinea* и многе друге (Savić, 1998; Đorđević et al., 2002; Radak et al., 2019). Хибридизација је у већини случајева ограничена на F1 генерацију, са малим бројем хибридних потомака, што се највероватније јавља као последица смањене атрактивности хибридних јединки за опрашивача или унутрашњих генетичких фактора који ограничавају даљи репродуктивни успех хибрида (Quillet et al., 1995; Campbell et al., 1997; Scopece et al., 2008). Такође, група аутора Scopece et al. (2008) су установили смртност ембриона код 36% хибридних парова. Међутим Gardes (2002) као највећи проблем у животном циклусу орхидеја и опстанку нових хибрида истиче сложен процес клијања семена, те да су неопходна даља истраживања из ове области.

Код орхидеја је заступљено цитоплазматско наслеђивање. Bateman et al. (2006, 2008) потврђују у својој студији да код већине орхидеја наследне особине мајчинске биљке у већој мери доприносе фенотипу него очинске. Као пример тога наводи се природни хибрид *Orchis angusticruris* (*Orchis purpurea* × *Orchis simia*) код којег су вегетативне карактеристике скоро идентичне карактеристикама *Orchis purpurea,* док су код генеративних органа једнако заступљене особине оба родитеља, или су можда чак више заступљене особине мајчинске биљке. Наслеђивању морфолошких особина по мајчинској линији сведоче и молекуларна истраживања која потврђују да се код орхидеја пластиди једино наслеђују од мајчинске биљке (Corriveau and Coleman, 1988; Cafasso et al., 2005).

2.6. Генеративно размножавање терестричних орхидеја

Животни циклус орхидеја је директно зависан од других организама. Врсте које припадају фамилији Orchidaceae карактерише јединствен систем опрашивања који је заснован да привуче опрашиваче користећи најсложеније системе обмана како би започеле преношење полена. Механизми обмане укључују имитацију хране опрашивача, цветну мимикрију хране опрашивача, имитацију места легла, имитацију склоништа, псеудоантагонизам, привлачење партнера за удварање и псеудокопулацију. (Tremblay et al., 2005; Jersakova et al., 2006).

Након опрашивања и успешне оплодње формира се чаура која може да садржи између 1 300 и 4 000 000 семена (Arditti 1967). Величина семена свих орхидеја је изузетно мала, чија се дужина креће од 0,25 до 1,2 mm (Knudson 1922; Hoenhe 1940; Rasmussen, 1985), а тежина од 0,3 до 14μg (Burgeff, 1936; Harley, 1950). Величина и структура семена чини семе веома погодним за разношење ветром (Rasmussen 1995), међутим, велики број семена, лако и сигурно разношење не значи сигурно потомство када су у питању терестричне орхидеје. Код ове групе биљака, клијање семена је окарактерисано као веома сложен процес, који представља ограничавајући корак у развоју нове биљке и условљен је низом биотичких и абиотичких фактора. Основни проблем огледа се у веома ситном семену, које није способно самостално да клија. Наиме, орхидеје које расту у умереном климату карактерише њихова репродуктивна екологија, односно дорматност семена која се тешко и споро прекида у *ex situ* условима (Butcher and Marlow, 1989). Група аутора Baskin and Baskin (2014) наводе да семена орхидеја која расту у умереном појасу имају веома специфичан облик морфо-физиолошке дорматности која се састоји од морфолошке компоненте (присуство недиференцираног ембриона и чврст семени омотач) и физиолошке компоненте. Као такав, ембрион није у стању да се правилно диференцира, већ се развија тако да прво формира протокорм - специфична структура која се образује између стадијума ембриона и клијанца (Baskin and Baskin, 2014). Под физиолошком компонентом се подразумева да ембрион нема довољан потенцијал раста да би пробио семени омотач и исклијао (Baskin and Baskin, 2001). Поред тога, семена терестричних орхидеја немају ендосперм, док је садржај хранљивих материја у зрелом семену концентрисан у ћелијама ембриона и обухвата липиде, протеине и угљене хидрате и њихова количина се разликује од врсте до врсте (Rasmussen, 1995). Међутим, иако ембриони садрже

угљене хидрате у облику сахарозе, глукозе, фруктозе, малтозе, рамнозе, садржај шећера најчешће буде утрошен пре почетка клијања семена, или преостала количина не буде довољна да подржи клијање (Manning and Van Staden, 1987). Поред тога, ембриони немају ензиме који претварају липиде у слободне шећере и самим тим нису у стању да метаболишу полисахариде и липиде (Manning and Van Staden, 1987). Услед недостатка нутријената који су неопходни за клијање семена, почетак клијања и формирање протокорма је условљено успостављањем симбиозе са одговарајућим гљивама које снадбевају ембрион са водом, угљеним хидратима, минералима и витаминима (Rasmussen, 1992; Rasmussen, 1995; Yoder et al., 2000; Kauth et al., 2008).

2.7. Микориза терестричних орхидеја

Микориза орхидеја има велики утицај на адаптабилност биљака, почевши од снадбевања семена угљеником што подстиче клијање семена и формирање сејанца, док се код многих врста ова веза одржава током целог животног циклуса (Rasmussen, 2002; Abadie et al., 2006; Rasmussen and Rasmussen, 2007). Микориза орхидеја припада групи ендомикориза чија је основна одлика да мицелија гљиве насељава интрацелуларне просторе ћелија и паренхимског ткива корена, након чега продире у саму ћелију кортекса и ту формирају творевине које се називају пелотон. Овај тип микоризе је јединствен по томе што се јавља искључиво у оквиру једне од највећих фамилија цветница, Orchidaceae.

Основна карактеристика микориза орхидеја јесте да хифе улазе у корен кроз ризодермис након чега формирају комплексно увијене хифе унутар ћелије биљке домаћина (Peterson et al., 2004). Ендомикоризу орхидеја први је открио Reisek 1847. године (Hadley, 1982) након чега је интензивно настављен развој протокола за добијање чисте културе ендофита (Curtis, 1939; Hadley, 1970; Ramsay et al., 1986).

Иако је систематика гљива које живе у симбиози орхидејама још увек предмет многих истраживања, која у последње време највише укључују молекуларну карактеризацију (Sharon et al., 2008, Yukava et al., 2009; Jiang et al., 2011; Kohler et al., 2015), неке чињенице су ипак познате. Гљиве које живе у симбиози са орхидејама углавном припадају роду *Rhizoctonia* и могу бити у анаморфном или телеморфном стадијуму, али постоје наводи да се симбиоза може успоставити и са сапрофитним, не-микоризним гљивама (*Cylindrocarpon, Fusarium, Trichoderma*) (Snech et al., 1991; Currah et al., 1989;

Zelmer, 1994; Currah et al., 1997; Vujanović et al., 2000; Gezgin and Eltem, 2009). Такође, постоји разлика између симбиозе аутотрофних и мико-хетеротрофних врсте орхидеја. Наиме, аутотрофне терестричне орхидеје формирају микоризу са анаморфним родовима као што су *Ceratorhiza*, *Epulorhiza* и *Moniliopsis* (Currah et al., 1997; Rasmussen, 2002). Већина ових симбионата приозводи ензиме као што су целулаза и полифенол оксидаза које омогућавају да се органске материје у земљишту разложе у једноставне шећере. Са друге стране, мико-хетеротрофне и миксотрофне врсте орхидеја живе у симбиози са ектомикоризалним гљивама као што су *Thelephoraceae* и *Russulaceae* (Abadie et al., 2006; Girlanda et al., 2006) преко којих се повезују са дрвећем или жбуњем домаћинима и на тај начин се снадбевају фотоситентским продуктима аутотрофног домаћина.

Телеоморфни облик гљива које припадају групи *Rhizoctonia* обухватају три фамилије базидомицета - *Tulansellaceae*, *Sebacinaceae* и *Ceratobasidaceae* (Peterson et al., 1998; Shan et al., 2002; Sharon et al., 2008), док анаморфни стадијум имају гљиве из родова *Ceratorhiza*, *Epulorhiza*, *Moniliopsis*, и *Rhizoctonia* (Moore, 1988). Гљиве из рода *Rhizoctonia* припадају класи “mycelia sterilia” чија је основна карактеристика да немају споре, размножавање се врши фрагментима мицелије и да у циклусу свог развића имају само мицелију и склероције (Ranković, 2003). Систематика ових гљива се проучава на основу морфолошких и молекуларних карактеристика. Конвенционалне методе за идентификацију гљива из рода Rhizoctonia базирају се на морфолошким особинама културе, које подразумевају боју колоније, формирање ексудата и склероција, и структурне карактеристике хифе односно присуство монилиоидних ћелија и број једара у младим ћелијама (Currah et al., 1987; Currah et al., 1997; Snech et al., 1991). На основу броја једара у ћелијама, извршена је подела гљиве из рода *Rhizoctonia* на вишеједарне, двоједарне и моноједарне. Тако се као вишеједарни тип истиче важан биљни патоген *Rhizoctonia solani* (телеоморфе: *Thanatephorus, Ceratobasidiales*). Двоједарне ћелије имају гљиве из родова *Ceratobasidium* (*Ceratobasidiales*) и *Tulasnella* (*Tulasnellales*), док се моноједарни сојеви јављају код анаморфи *Ceratobasidium* (Hietela et al., 2001). Према наводима Snech et al. (1991), двоједарна *Rhizoctonia* spp. представља највећу групу гљива које живе у симбиози са орхидејама.

Ендофитна гљива која најчешће живи у симбиози са терестричним орхидејама јесте *Tulasnella calospora*. Ова гљива је изолована из корена *Dactylorhiza purpurella* и *Anacamptis laxiflora* као и из корена многих терестричних и епифитних орхидеја које расту на Аустралијском континенту. Распрострањена је широм света и обично се

налази у сваком екосистему, од тропских до умерених климатских зона. Такође, сојеви који припадају овој врсти показали су се компатибилни са неколико врста орхидеја из умереног појаса (Rasmussen, 1995; Kohler et al., 2015). *Ceratobasidium cornigerum* представља другу врсту ендофитне гљиве која живи у симбиози са терестричним орхидејама. Изолована је из корена *Goodyera repens, Dactilorhiza purpurella* и *Orchis laxiflora* и сојеви ове врсте успешно успостављају микоризу у *in vitro* условима са терестричним орхидејама из умерене зоне (Warcup and Talbot, 1966; Muir, 1987; Rasmussen, 1995).

2.8. Примена *in vitro* културе биљних ткива у сврху наклијавања семена терестричних орхидеја

Како је клијање семена у природи зависно од многих фактора, који директно утичу на његову брзину и интензитет, герминација терестричних орхидеја у контролисаним *in vitro* условима, под којим се подразумева и симбиотско и асимбиотско наклијавање семена, представља најефикаснији метод за њихово умножавање (Johnson et al., 2007).

In vitro симбиотско клијање семена представља процедуру у којој се симбиоза између гљиве и биљке, у овом случају семена, одвија у стерилним условима (Zettler, 1997). Према наводима Rasmussen et al. (1990) и Qien et al. (2008) симбиотско наклијавање семена иницира већи степен клијања и формирања протокорма у односу на асимбиотски протокол. Међутим, недостаци симбиотског наклијавања семена у *in vitro* условима огледају се у веома дугачкој и релативно скупој процедури. Поред тога, симбиозу је тешко успоставити у *in vitro* условима и често се дешава да гљива која је изолована са мајчинске биљке није компатибилна са семеном исте те врсте, односно, не може успешно да се успостави симбиоза и самим тим није у могућности да иницира клијање (Xu and Mu, 1990; Pierce et al., 2010). Иако овај тип клијања семена у *in vitro* условима има велики значај у испитивању специфичности микоризних гљива, као и сам развој симбиозе (Kulinov and Filippov, 2001; Stewart and Kane, 2007), асимбиотско клијање семена *in vitro* представља јединствену технологију за проучавање утицаја различитих абиотичких фактора на клијавост семена и развој сејанца, без посредства гљива.

2.8.1. Асимбиотско клијање семена орхидеја *in vitro*

In vitro технологије базиране на *ex situ* конзервацији као што су асимбиотско клијање семена, размножавање микропропагацијом и криопрезервација коришћене су са циљем очувања ретких и угрожених биљних врста, посебно орхидеја (Wochok, 1981; Arditti and Ernest, 1993; Arditti, 1994; Fay, 1994; Hopper, 1997; Decruse et al., 2003; Ramsay and Dixon, 2003; Dutra et al., 2008; Yam and Arditti, 2009; Mohanty et al., 2012; Bhattacharyya et al., 2017). Асимбиотско *in vitro* наклијавање семена неколико врста епифитних орхидеја успостављено је 1922. године од стране америчког ботаничара Lewis Knudson-а, који је установио да садржај салепа чини 48% слузи, 27% скроба, 5% протеина и свега неколико процената шећера и растворљивих минерала. Након овог сазнања и нешто ранијег сазнања да гљиве имају способност да разлажу шећере из шећерне трске (Bernard, 1909), дошло се до закључка да гљиве подстичу клијање семена тако што разграђују скроб, пентозе и азотна једињења и највероватније снадбевају семе једињењима који стимулишу раст. Ову претпоставку је потврдио у свом истраживању управо Knudson (1922, 1924) успостављајући асимбиотско клијање семена врста из родова *Cattleya*, *Laelia* и *Epidendrum* на хранљивој подлози која садржи шећер и минерале (Arditti, 1967). Његово истраживање представља прекретницу у наклијавању семена орхидеја у контролисаним условима, након чега су настављена интензивна истраживања са циљем побољшања овог протокола (Yates and Curtis, 1949; Vacin and Went, 1949; Van Waes and Devergh, 1986; Malmgren, 1996; Kitsaki et al., 2004; Kauth et al., 2006; Pierce et al., 2013). До сада је асимбиотско клијање семена успешно упостављено код следећих врста терестричних орхидеја: *Cypripedium debile* (Hsu and Lee, 2012), *Cypripedium macranthos* (Huh et al., 2016), *Cypripedium lentiginosum* (Jiang et al., 2017), *Dactilorhiza osmanica* (Sazak and Ozdener, 2006), *Anacamtis palustris* (Magrini et al., 2011), *Cephalanthera falcata* (Yamazaki et al., 2006), *Bletia purpurea* (Dutra et al., 2008; Johnson et al., 2011), *Orchis coriophora* (Bektis et al., 2013) *Orchis mascula* (Valletta et al., 2008) и код врста из рода Ophrys (Kitsaki et al., 2004).

Иако је биологија клијања семена иста код свих врста орхидеја и подразумева бубрење ембриона и формирање протокорма, неопходно је да се за сваку врсту утврди протокол како би клијање, раст и развиће биљака било што брже и успешније. Степен зрелости семена, прекидање дормантости и стерилизација семена, састав и садржај хранљиве подлоге, осветљење и температура представљају факторе који имају снажан

утицај на клијање семена (Arditi, 1967; Rasmussen, 1995; Kauth et al., 2008; Zeng et al., 2014).

Техником асимбиотског наклијавања семена могу бити обухваћена и незрела и зрела семена, и обе процедуре имају своје предности и недостатке. У последње време све ширу примену проналази наклијавање незрелог семена јер се на тај начин спречава улазак семена у стадијум дормантности, и према неким ауторима смањује се инфективни потенцијал (Linden, 1980; Arditti et al., 1982; Miyoshi, 1988; DePauw and Ramphrey, 1993; Lauzer et al., 1994; Light and MacConaill, 1998). Међутим, употреба незрелог семена подразумева идентификацију оптималног стадијума развоја чаура, што захтева континуирано праћење фенологије биљака (Kitsaki et al., 2004; Hicks, 2006; Jiang et al., 2017). Такође, техника незрелог семена захтева брзо увођење у културу, семе не може да се излаже третманима сушења и самим тим нема могућност дужег складиштења и чувања, док зрело и добро осушено семе може да се чува дужи временски период (Ramsay and Dixon, 2003; Seaton and Pritchard, 2003; Seaton et al., 2010). Иако код примене зрелог семена за асимбиотско клијање постоје одређене баријере у виду дормантности семена или веће појаве инфекције, постоје протоколи којима се лако превазилазе ови проблеми. Применом одговарајућих хемијских третмана успешно се врши стерилизација семена и оштећење семеног омотача (Van Waes and Debergh, 1986; Rasmussen, 1995; Valletta et al,., 2008), ембрион постаје способан да усваја воду што доводи до прекидања физиолошке дормантности (Rasmussen, 1995; Baskin and Baskin, 2014; Sgarbi et al., 2007).

Садржај минерала, као и њихови доступни облици у хранљивој подлози представљају најважнији део у култури биљног ткива. Бројна истраживања су доказала да је асимбиотско клијање семена терестричних орхидеја углавном условљено присуством азота и азотних једињења у хранљивој подлози (Lugo Lugo, 1955; Rasmussen, 1995; Kauth et al., 2006; Stewart and Kane, 2006; Sgarbi et al., 2009; Tavares et al., 2012; Ponert et al., 2013). Према наводима Stenberg and Kane (1998) и Kauth et al. (2006), хранљива подлога Knudson C, која садржи амонијачни и нитратни облик азота, има позитиван утицај на клијање семена *Encyclia boothiana* var. *erythronioides* и *Calopogon tuberosus.* Врста *Blatia purpurea*, која настањује северно амерички континент, једнако успешно клија на подлогама и са органским и са неорганским облицима азота, што указује на способност ове врсте да усваја шири спектар азотних облика (Dutra et al., 2008). Са друге стране, према наводима Sgarbi et al. (2009) неорганski облици азота имали су инхибиторно дејство на клијање *Limodorum*

abortivum. Сличан резултат су објавили Magrini and De Vitis (2017) у својој студији истичући да је већи степен клијавости врста из рода *Limodorum* успостављен на медијуму са органским облицима азота, док су Ponert et al. (2013) утврдили да и изузетно мале концентрације нитрата имају инхибиторно дејство на клијање семена *Pseudorchis albida.*

За већину терестричних орхидеја, присуство органских суплемената који представљају извор амино киселина у хранљивој подлози, има снажан утицај на клијање семена. Најчешће коришћени органски адитиви у *in vitro* култури су кокосова вода, банана пудер, пептон, казеин хидролизат, екстракт квасца и сок од ананаса. Међутим, поменути суплементи не одговарају свакој врсти и нису у стању да иницирају клијање кад год се додају у хранљиву подлогу, док код неких врста могу имати инхибиторно дејство (Chand, 1991; Roy and Banerjee, 2002; Gupta, 2016). Због тога је од изузетне важности испитати утицај органских суплемената на клијање и спрам потребе их прилагодити свакој биљној врсти. Кокосова вода је течни ендосперм истоимене врсте који садржи хормон зеатин и мање заступљен кинетин, као и друге супстанце које стимулишу и подстичу раст орхидеја као што су шећери, широк спекар аминокиселина и витамине (Malmgren, 1996; Yong et al. 2009; Gupta et al., 2016). Позитиван утицај овог суплемента на клијање утрвђен је код врста *Cypripedium macroanthos, Eulophia nuda* као и за многе врсте из рода *Ophrys*, код којих је установљен знатно већи проценат клијавости на медијуму који је био обогаћен овим суплементом (Kitsaki et al., 2004; Nanekar et al., 2014; Huh et al., 2016). Казеин хидролизат представља комплекс аминокиселина који врло често улази у састав хранљиве подлоге намењене за наклијавање семена орхидеја (Gupta et al., 2016). Позитиван утицај казеина на клијање семена *Eulophia nuda* утврђен је од стране групе аутора Nanekar et al. (2014), док су Kumar et al. (2002) у својој студији поред подстицајног деловања казеина на клијање семена врста *Rhynchostylis retusa* и *Cymbidium elegans* приказали знатно краћи временски период потребан за клијање. Са друге стране постоје врсте код којих присуство казеина није иницирало клијање семена (Van Waes and Debergh, 1986) док је инхибиторно деловање овог суплемента утврђено код врста *Coelogyne barbata* и *Herminium lanceum* (Chand, 1991). Пептон је водорастворљив протеин хидролизат који садржи високе концентрације аминокиселина и његов утицај на клијање се разликује од врсте до врсте. Бројним истраживањима се утврдило да има подстицајно дејство на клијање семена *Epidendrum ibaguenese* (Hossain, 2008), *Calopogon tuberosus* (Kauth et al., 2008), *Eulophia cullenii* (Decruse et al., 2013) *Dactilorhiza masculata* subsp. *masculata*,

Dactilorhiza incarnata subssp. *serotina* и *Liparis loeselii* (Vejsadova, 2006). Инхибиторни ефекат је утврђен код врсте *Vanda tessellata* (Roy and Banerjee, 2002), док код врсте *Calanthe discolor* није забележен ни позитиван ни негативан ефекат (Kano, 1965).

Осветљење представља један од најважнијих фактора животне средине када је у питању клијање семена орхидеја. Због своје важности и директног утицаја на клијање, бројне студије су се бавиле испитивањем утицаја овог фактора у *in vitro* условима, укључујући индивидуални утицај осветљења (Stewart and Kane, 2006; Godo et al., 2010; Chen et al. , 2015), затим утицаја осветљења у комбинацији са различитим хранљивим подлогама (Kauth, 2005; Kauth et al., 2006; Johnson et al., 2011; Quiroz et al., 2017), квалитет и квантитет осветљења (Fukai et al., 1997; McKinley and Camper, 1997), као и утицај осветљења на различите фазе клијања семена и развоја сејанца (Stewart and Kane, 2006; Dutra et al. 2008).

Таксономске разлике и разлике у окружењу које настањују врсте, одражавају се на потребе семена за осветљењем приликом клијања (Rasmussen, 1995). Тако се за терестричне орхидеје које настањују Аустралију сматра да се највећи степен клијавости постиже у условима 16h осветљења, док се за врсте холарктичног региона сматра да и најслабији извор светлости може имати инхибиторно дејство на клијање (Van Waes and Debergh, 1986; Rasmussen et al., 1990; Yamazaki and Miyoshi, 2006). Међутим, Arditti et al. (1981) указују на различити утицај осветљења на клијање семена орхидеја из умереног климата, што се разликује се од врсте до врсте. Ове наводе потврђује група аутора Dutra et al. (2008) у својој студији, која је утврдила да врста *Bletia purpurea*, која настањује северно амерички континент, има знатно виши степен клијавости у условима 16h осветљења. Сличан резултат је добијен и код врсте *O. mascula*, код које није уопште успостављено клијање семена у условима потпуног мрака (Valletta et al., 2008). Такође, знатно бржи развој сејанца у условима 16h осветљења постигнут је и код врсте *Calopogon tuberosus* (Kauth et al., 2006) и *Orchis coriophora* (Bektas et al., 2013), док је код врсте *Goodyera oblongfolia* установљена једнако добра клијавост и у условима потпуног мрака и у условима са осветљењем (Arditti, 1981). Истакнуте референце указују да је утицај осветљења на клијање семена био предмет многих истраживања, међутим, исто тако указују да је свакој биљној врсти неопходно утврдити оптималне услове за клијање семена и развој сејанца.

2.9. Примена терестричних орхидеја

За разлику од комерцијалних орхидеја, које представљају најпродаванију цветницу у Европи, терестричне орхидеје још увек нису довољно заступљене на хортикултурном тржишту. Према наводима Kauth et al. (2006) главна ограничења у комерцијализацији терестричних орхидеја представљају:

1) производња је усмерена на аматерске произвођаче, који имају само ограничени број таксона;
2) необавештеност потрошача о овој групи орхидеја што за последицу има веома мало тржиште и слабу заитересованост индустрије;
3) сложена процедура размножавања из семена.

Међутим, терестричне орхидеје су нашле велику примену у прехрамбеној индустрији, фармацији и медицини. Најпознатији производ који се прави од подземних органа орхидеја назива се Салеп и користи се у производњи сладоледа, као кондиторски производ или топли напитак (Kasparek and Grimm, 1999; Tamer et al., 2006). Највећи произвођачи салепа су Турска, у којој се сваке године произведе између 15 и 20 тона салепа, затим Грчка, Ирак и Албанија (Sezik, 2002; Ghorbani et al., 2014; Quave and Pieroni, 2015; Kreziou et al., 2016). Врсте које се најчешће користе у прехрамбеној индустрији припадају родовима *Anacamptis* Rich., *Dactylorhiza* Neck., *Himantoglossum* Spreng., *Oprhrys* L., *Orchis* L., *Separis* L., и *Steveniella* Schltr. (Kasparek and Grimm, 1999; Kreziou et al., 2016; Ghorbani et al., 2017). Такође, ова група орхидеја се често користи у фармацеутској и козметичкој индустрији и медицини. Поједине врсте из ове групе орхидеја производе мирис који се састоји од хемијских једињења, а који се примењују у парфемима, аромама и есенцијалним уљима попут бензил ацетата, бензалдехида и еугенола (Schiestl et al., 2011; Huber et al., 2005). Иако оваква примена орхидеја има велики економски значај како на локалном, тако и на државном нивоу, неконтролисано и нелегално сакупљање терестричних орхидеја из њихових природних популација значајно угрожава њихов опстанак, пре свега због веома комплексног и дуготрајног процеса размножавања (Kreziou et al., 2016).

3. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

Почетни задатак истраживања био је да се испита диверзитет терестричних орхидеја на подручју Фрушке горе. Основна морфолошка и цитолошка карактеризација мапираних врста указаће на генетичку варијабилност, која може обезбедити успех у њиховом оплемењивању. Циљ овог мултидисциплинарног истраживања је научни и техничко иновативни допринос истраживањима везаним за оплемењивање и примену терестричних орхидеја у хортикултури и пејзажној архитектури.

Међу важним циљевима истиче се испитивање едафских фактора станишта, са задатком утврђивања физичких и хемијских особина земљишта као и анализа стена на којима је земљиште настало. Добијени резултати биће даље искориштени за утврђивање фактора који позитивно или негативно утичу на клијање семена у вештачки створеним *in vitro* условима. На основу претходног, циљ је изналажење оптималног састава хранљивих подлога за асимбиотско наклијавање семена одабраних врста, што може представљати протокол за *ex situ* очување диверзитета терестричних орхидеја, њихово масовно умножавање за потребе конзервације, као и примену у хортикултури и пејзажној архитектури.

Изолација и идентификација гљива из кореновог система има за задатак утврђивање присутности и улоге ендомикоризних гљива код одраслих јединки.

На основу добијених резултата, који такође обухватају и оцењивање пронађених врста према декоративности и адаптибилности, и SWOT анализе, биће могуће правилно дефинисати програм оплемењивања пронађених врста и формирати модел сорте који ће представити предлог идеотипа, односно фенотипа, погодног за широку примену у хортикултури и пејзажној архитектури, што уједно представља основни циљ ове докторске дисертације.

4. РАДНА ХИПОТЕЗА

Диверзитет терестричних орхидеја на подручју Фрушке горе је изразито богат и као такав може бити од значаја за даљу конзервацију и укључивање терестричних орхидеја у програме оплемењивања. Имајући у виду да фамилија Orchidaceae спада у групу цветница са најваријабилнијом величином генома, што указује на висок степен диверзитета и сложене еволутивне процесе у оквиру ове фамилије, анализом морфолошких и цитолошких карактера испитиваних врста добиће се увид у могућност коришћења датог материјала у програмима оплемењивања. Прецизна SWOT анализа као и на њој засновани модели сорте послужиће за правилан одабир родитељских комбинација у евентуалним укрштањима, по концепту својства. Из постојеће гермплазме могуће је издвојити врсте са комерцијалним значајем јер имају јединственост, препознатљивост и испуњавају крајњи циљ који у свим аспектима значи иновативност у хортикултури, односно оплемењивачком раду на орхидејама.

У раду се полази од претпоставке да едафски фактори имају утицај на распростирање и дистрибуцију терестричних орхидеја. Очекује се да ће анализа едафских фактора представити прецизну слику природног станишта врста и дефинисање потенцијалне примене у урбаним срединама различитих намена.

Основни проблем у широј примени терестричних орхидеја јесте чињеница да је за њихово размножавање, како генеративно тако и вегетативно, потребан дуг временски период. У раду се полази од претпоставке да се додавањем суплемената који представљају извор органског облика азота може повећати степен клијавости и истовремено скратити временски период клијања. Успостављањем протокола превазишле би се баријере које стоје на путу масовној продукцији и употреби терестричних орхидеја као цветних таксона различитих намена. Очекује се да добијени протоколи за *in vitro* умножавање могу бити и део протокола за *ex situ* конзервацију најугроженијих врста.

Испитивањем присутности микоризних гљива у кореновом систему утврдиће се да ли је симбиоза између биљке и гљиве активна и током периода цветања.

5. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА

5.1. Материјал

Биљни материјал сакупљен је на природном станишту које обухвата сува травна земљишта, обронке шума и шуме на подручју Фрушке горе. Фрушка гора је острвска планина која се највећим делом налази у северном делу Србије, у аутономној покрајини Војводини, док мањи део залази у источну Хрватску. Простире се између Дунава и Саве у правцу исток-запад, од Белегиша, Сурдука и Старог Сланкамена на истоку, према Шаренграду и Шиду на западу у дужини од око 80 km, док највећа ширина износи 15 km (Miljković, 1975). Иако је највиши врх висок свега 539 m (Црвени чот), захваљујући веома богатом и јединственом диверзитету, део Фрушке горе налази се под посебном заштитом и има категорију Национални парк.

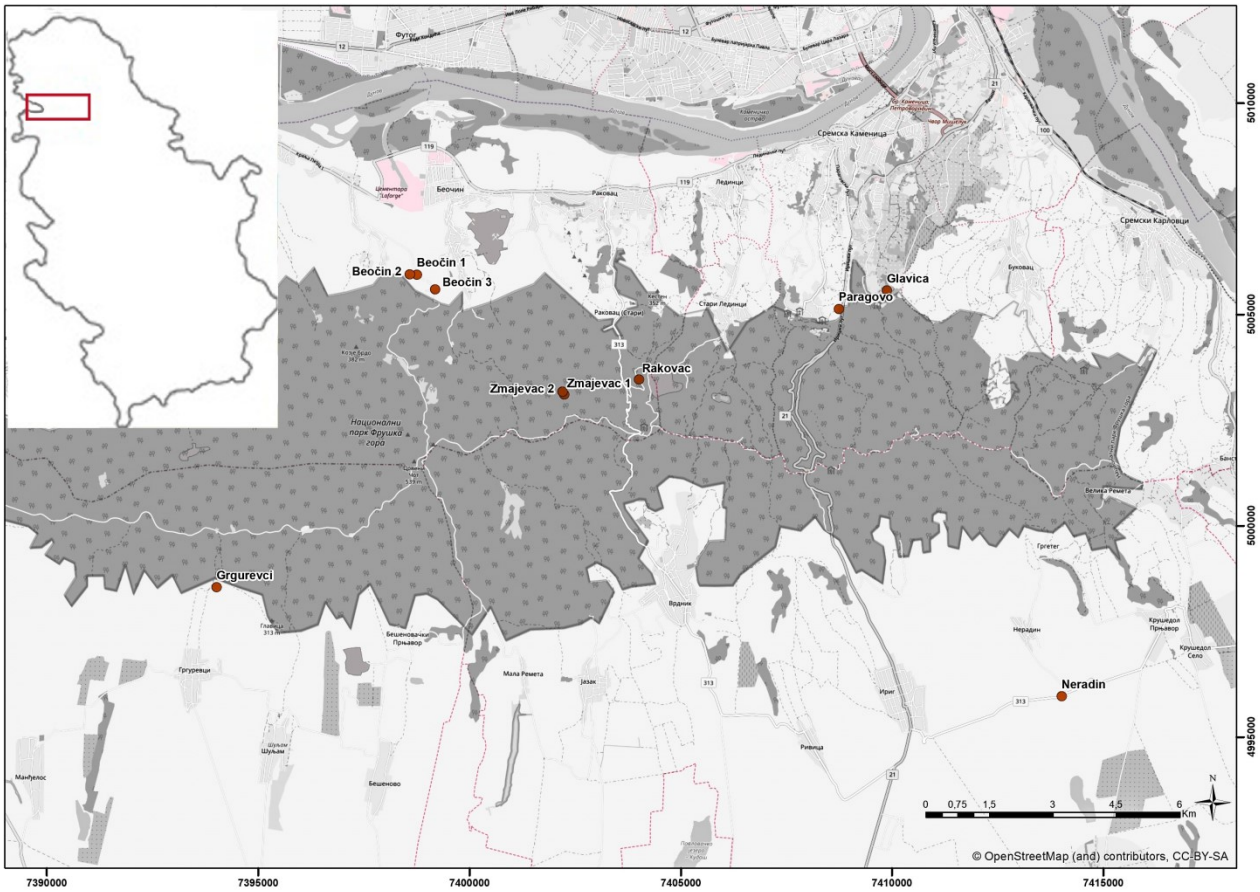
Испитивањима је обухваћено укупно 17 врста од којих 13 припада потфамилији Orchidoideae, док 4 припада потфамилији Neottioideae.

5.2. Методе

5.2.1. Евидентирање и мапирање биљног материјала

Теренски део истраживања обухватао је евидентирање и мапирање популација терестричних орхидеја на 10 локалитета, приликом чега је извршена детерминација, морфолошка карактеризација и одређивање величине популација. Детерминација пронађених врста је спроведена у складу са Delforge (2006) и GIROS (2009). Мапирањем су обухваћене врсте које су са једне стране биле лако уочљиве са бројном популацијом и чија би масовна продукција задовољила потребе хортикултуре и пејзажне архитектуре и са друге стране врсте чија популација броји свега неколико индивидуа и које су показале висок степен угрожености.

За сваки локалитет, на којем је евидентирана присутност орхидеја утврђене су координате и надморска висина помоћу ручног GPS пријемника (Garmin, eTrex 30), а добијени подаци су обрађени у програму ArcGIS, верзија 10.7 (Слика 1).



Слика 1. Позиција локалитета који представљају природно станиште терестричних орхидеја на подручју Фрушке горе

Након идентификације врста и мапирања локалитета извршено је бројање јединки у оквиру популација са циљем утврђивања величине популације. На основу добијених резултата приступило се категоризацији стања помоћу шестостепене скале (Табела 2) коју су поставили Wotavová et al. (2004). Бројање јединки и категоризација стања вршена је током трогодишњег теренског истраживања, како би се испратила динамика ширења, односно смањења популација пронађених врста.

Табела 2. Категоризација стања популације према бројности

Категорија	Стање популације	Број биљака
0	Локално изумирање врста	0
1	Популација близу изумирања, опадајући број биљака	1-10
2	Стабилна популација, мали број биљака али без тенденције опадања	1-10
3	Стабилна популација	10-100
4	Стабилна популација, велики број биљака	100-1000
5	Веома велика популација	1000+

5.2.2. Морфолошка карактеризација испитиваних врста

Морфолишка карактеризација обухватила је оцењивање квантитативних и клавитативних својстава у периоду 2014-2016. године, са циљем испитивања диверзитета терестричних орхидеја. Кодирање стања морфолошких карактера изведено је према интернационалном UPOV дескриптору (The International Union for the Protection of New Varieties of Plants). Како би мерења могла обухватити и вегетативне и генеративне органе, за сваку врсту биљни материјал је узиман током цветања од априла до октобра месеца. Мерење морфометријских параметара обухватило је по 10 јединки из сваке популације изузев шумских врста које су заступљене у изузетно малом броју (1-5 јединки).

Мерење вегетативних (хабитус, лист) и одређених генеративних карактеристика (цваст) код врста чије популације броје мали број јединки вршено је *in situ* како би се уништавање појединачних индивидуа свело на минимум.

Мерење квантитативних параметара обухватило је

Хабитус: Висина биљке (mm)

Лист: Дужина листа, ширина листа (mm)

Цваст: Висина цвасти, број цветова (mm)

Цвет: Висина цвета, ширина цвета, дужина лабелума, ширина лабелума (mm)

Описна својства (квалитативна мерења) обухватила су следеће параметре:

Лист: Облик листа, боја листа

Цвет: Положај цветне дршке, облик горњег листића спољашњег круга цветног омотача, облик бочног листића спољашњег круга цветног омотача, валовитост бочног

листића спољашњег круга цветног омотача, број боја спољашњег круга цветног омотача, број боја унутрашњег круга цветног омотача, валовитост унутрашњег круга цветног омотача, број боја лабелума, валовитост маргина лабелума

5.2.3. Цитолошка карактеризација испитиваних врста

Како би се детаљно испитао диверзитет терестричних орхидеја, које расту на подручју Фрушке горе, приступило се цитолошкој карактеризацији односно утврђивању броја хромозома, нивоа плоидности као и одређивању величине генома испитиваних врста. Узорковање биљног материјала и цитолошка карактеризација се одвијала током 2016-2017. године, приликом чега је обухваћено 11 врста терестричних орхидеја из 19 природних популација:

- Са локалитета Раковац узоркован је биљни материјал из три популације – *Cephalanthera longifolia, Limodorum abortivum, Orchis mascula*;
- Са локалитета Беочин 1 узоркован је биљни материјал четири популације врста – *Anacaptis pyramidalis, Gymnadenia conopsea, Neotinea ustulata, Orchis purpurea;*
- Са локалитета Беочин 2 узоркован је биљни материјал популације врста *Ophrys sphegodes, Orchis militaris.*
- Са локалитета Беочин 3 узоркован је биљни материјал из четири популације врста – *Gymnadenia conopsea; Gymnadenia odoratissima; Anacamptis pyramidalis, Orchis purpurea.*
- Са локалитета Главица узоркован је биљи материјал из четири популације врста – *Orchis purpurea, Anacamptis pyramidalis, Orchis militaris,* и *Gymnadenia conopsea*.
- Са локалитета Змајевац и Парагово узоркован је биљни материјал врсте *Platanthera bifolia* и *Epipactis microphylla*

Колекционисање материјала потребног за цитолошке анализе обухватило је узорковање генеративних и вегетативних органа са истих јединки. Узорковање цветних пупољака вршено је за потребе одређивања броја хромозома и нивоа плоидности, док је узорковање младих листова вршено за потребе одређивања величине генома. Цитолошка карактеризација је извршена у лабораторији за цитологију, која се налази у склопу Института за ратарство и повртарство на Римским Шанчевима под руководством др Јованке Атлагић.

5.2.3.1. Испитивање бројности хромозома

Утврђивање броја хромозома извршено је помоћу “Squash“ анализе мејотичких хромозома из плодника у фази пупољака. Из сваке популације је одабрано по 5 јединки са којих је вршено узорковање цветова и цветних пупољака који су били у различитим фазама развоја. Биљни материјал је транспортован у ручном фрижидеру у лабораторију за културу ткива, Департмана за воћарство, виноградарство, хортикултуру и пејзажну архитектуру Пољопривредног факултета у Новом Саду, где се приступило припреми узорака за даље анализе. За бојење хромозома користиле су се цитолошке боје ацето-кармин и Феулген.

Припрема боја ацето-кармин и Феулген

Поступак припреме цитолошке боје ацето-кармин подразумевао је загревање 45% сирћетне киселине (100ml) до кључања након чега се додавао пудер ацето-кармин-а (1g). Кување добијеног раствора је трајало 5-10 минута уз повремено мешање односно све док се није добила тамно црвена боја. Припрема боје је завршена филтрацијом кроз филтер папир.

Припреме цитолошке боје Феулген је подразумевала постепено растварање 1 g фуксина у 200 ml кључале дестиловане воде. Добијени раствор је охлађен и профилтриран кроз филтер папир. У филтрат су потом додати 1 N HCL (30 ml) и калијум метабисулфит (3 g) уз повремено мешање. Ерленмајерова тиквица са раствором је потом затворена, а целулозни чеп се додатно фиксирао са парафилмом. Како би се обезбедили услови константног мрака, ерленмајер је додатно увијен у алуминијумску фолију и одложен у мрачну комору на собну температуру у трајању од 24 h. У добијени раствор се затим додавало 0,5 g активног угља, након чега је боја остављана да преноћи на температури од 4˚C. Припрема боје је завршавана филтрацијом раствора кроз филтер папир.

Поступак припреме биљног материјала и бојење хромозома

Биљни материјал је првенствено третиран са 0,5% раствором колхицина у трајању од 2 h на собној температури након чега се приступило фиксацији према Sharma and Sharma (1996) у раствору сирћетна киселина - етанол 1:3. Улога фиксације јесте да

фиксира, односно стопира ћелијску деобу, а да истовремено не дође до деформације хромозома. Цветни пупољци су чувани у раствору фиксатива минимум 24 h након чега се приступило бојењу хромозома. Биљни материјал је прво хидролизован у 1N HCL на температури од 60˚C у трајању од 10 минута. Следило је испирање у дестилованој води и одлагање биљног материјала у цитолошку боју Феулген у трајању од 2 h, на собној температури. Плодник је потом издвојен из цветног пупољка, премештен на предметно стакло и уз додатак капи 1% ацето-кармина прекривен покровницом након чега је препарат припремљен према сквош методу. За анализу припремљених апарата коришћен је светлосни микроскоп са камером и софтвер за обраду добијених слика Image Analyzing System Motic Images Plus.

5.2.3.2. Одређивање величине генома методом проточне цитометрије

Све јединке које су обухваћене испитивањима везаним за одређивање бројности хромозома коришћене су у анализи утврђивања величине генома методом проточне цитометрије. Као референтни стандард користио се лист врсте *Vicia faba* (2C = 27.84 pg DNK) (Doležel et al., 1998). Млади листови су узорковани са 5 јединки из сваке популације. Изузетак представљају шумске врсте чије популације броје свега неколико јединки. Биљни материјал је одложен у теглице са водом (свака индивидуа је одложена у посебну теглицу) које су потом транспортоване у ручном фрижидеру где температура не прелази 10˚C. Бојење једара је урађено је према протоколу Travnicek et al. (2011) уз помоћ 4',6'-diamidino-2-fenilindola (DAPI). Диференцирани листови су подељени на сегменте величине 0,5 cm^2 који су потом ситно исецкани у петри кутији уз додатак 0,5 ml хладног Otto I пуфера (Otto, 1990). Свежа суспензија је потом профилтрирана кроз најлон филтере (пречних пора 40 µm) и остављена на инкубацију на собну температуру у трајању од 10 минута. Филтрату је затим додато 3-4 запремине пуфера за бојење Otto II(4 µg ml^{-1} DAPI боје и 0,4 M Na_2HPO4). Припремљени узорци су анализирани проточним цитометром Partec PA (Partec GmbH, Munster, Немачка) који је опремљени лампом са живиним луком као извор УВ светлости. Подаци добијени на хистограму су обрађени уз помоћ FloMax® софтвера (Partec, Münster, Немачка) за детекцију и обраду сигнала. Величина генома је израчуната помоћу формуле коју су представили Galbraith et al. (1998):

$$2C\ DNK\ (pgDNK) = \frac{\text{средња вредност флуоресценције узорка}}{\text{средња вредност флуоресценције стандарда}} \times \text{ референтна вредност DNK стандарда}$$

5.2.4. Испитивање едафских карактеристика станишта

Један од постављених циљева био је да се испитају едафске карактеристике локалитета на којем су идентификоване терестричне орхидеје, што је обухватило геолошку и педолошку анализу станишта. Лабораторијска испитивања земљишта обављена су у Лабораторији за педологију и водни режим земљишта, Департмана за ратарство и повртарство, Пољопривредног факултета у Новом Саду.

5.2.4.1. Геолошка анализа станишта

За потребе анализе односа геолошке грађе, карактеристика тла и дистрибуције различитих врста орхидеја, коришћени су подаци са основне геолошке карте – лист Фрушка гора и припадајући тумач за карту. Дигитализација карте је рађена у програму ArcGIS, верзија 10.7. према следећем протоколу: формиран је shape fajl (polygon.shp) са којим су исцртани стратиграфски полигони основне геолошке карте – СФРЈ Нови Сад 1:100 000. Након тога је формиран нови shape fajl са којим су нанешене тачке локалитета.

У овим истраживањима, анализа и објашњење геолошких појмова урађена је према Petkoviću (1975a, 1975b, 1976), Miljkoviću (1996, 2005) и Miljkoviću (1998).

5.2.4.2. Педолошка анализа станишта

Педолошка анализа станишта, са циљем утврђивања типова земљишта који погодују расту и развићу терестричних орхидеја, обухватила је анализу физичких и хемијских особина земљишта. Физичке особине земљишта обухватиле су испитивање механичког састава, док су анализом хемијских својстава земљишта испитани следећи параметри: хемијска рекција, садржај карбоната ($CaCO_3$), садржај укупног угљеника и хумуса, садржај лако приступачног фосфора (P_2O_5) и калијума (K_2O) и садржај укупног азота (N) у земљишту.

Узорковање површинског слоја земљишта (првих 20 cm) вршено је са 10 локалитета приликом чега је са сваког локалитета узето по 3 узорка тежине 1,5 kg.

Изузетак поново чине шумски локалитети где величина популације не броји више од 5 јединки те је са тих станишта узиман по један узорак земљишта. Укупно 22 узорка земљишта (Табела 3) су пребачена у картонске кутије и одложена у лабораторију без хемикалија и прашине где се приступило њиховом сушењу до ваздушно сувог стања. Након две недеље, узорци су самлевени у млину за млевење земљишта што је представљало завршну фазу припреме земљишта за даље анализе физичких и хемијских особина земљишта.

Табела 3. Приказ узорковања земљишта према локалитетима

ЛОКАЛИТЕТИ	**БР. УЗОРАКА**	**ВРСТА**
Беочин 1	2,3,4	*A. pyramidalis* *O. militaris* *N. tridentata* *O. purpurea* *G. conopsea*
Беочин 2	1	*O. sphegodes,* *O. militaris*
Беочин 3	5,6,7	*O. purpurea* *A. pyramidalis* *G. conopsea* *G. odoratissima*
Раковац	13 14	*L. abortivum* *O. mascula*
Змајевац 1	11	*P. bifolia*
Змајевац 2	12	*E. helleborine*
Парагово	18,19	*E. microphylla* *E. helleborine*
Нерадин	15,16,17	*S. spiralis*
Гргуревци	8,9,10	*S. spiralis*
Главица	20,21,22	*H. jankae* *O. purpurea* *G. conopsea* *A. pyramidalis* *O. militaris*

Физичке особине земљишта

Одређивање механичког састава земљишта извршено је Пипет методом и обухватало је испитивање садржаја ситног песка (СП), крупног песка (КП), праха и глине. За потребе ове методе узорци земљишта су третирани натријум-пирофосфатом. Одређивање текстурне класе земљишта извршено је на основу класификације по Tommerup-u.

Хемијске особине земљишта

- Хемијска реакција земљишта: pH вредност је одређена у суспензији земљишта са водом (H_2O) и 1M KCl (1:2,5) уз помоћ pH-metra.
- Садржај $CaCO_3$ је одређен волуметријски, помоћу калциметра по Scheibler-u
- Одређивање органског угљеника и хумуса **(**C_{org} **)-** Укупни C_{org} методом мокрог спаљивања (Tyurin, 1931) у модификацији (Simakov, 1957) ($K_2Cr_2O_7$)
- Одређивање P_2O_5 и K_2O **–** Одређивање лако приступачног фосфора и калијума у земљишту Al – методом по Egner – Riehm-u. Садржај фосфора је одређен колориметријским поступцима, а садржај калијума је одређен пламенофотометријски.
- Одређивање укупног садржаја N **–** Добијене вредности садржаја хумуса множене су са 0,05 и добијен је садржај азота у земљишту.

5.2.5. Асимбиотско клијање семена у *in vitro* условима

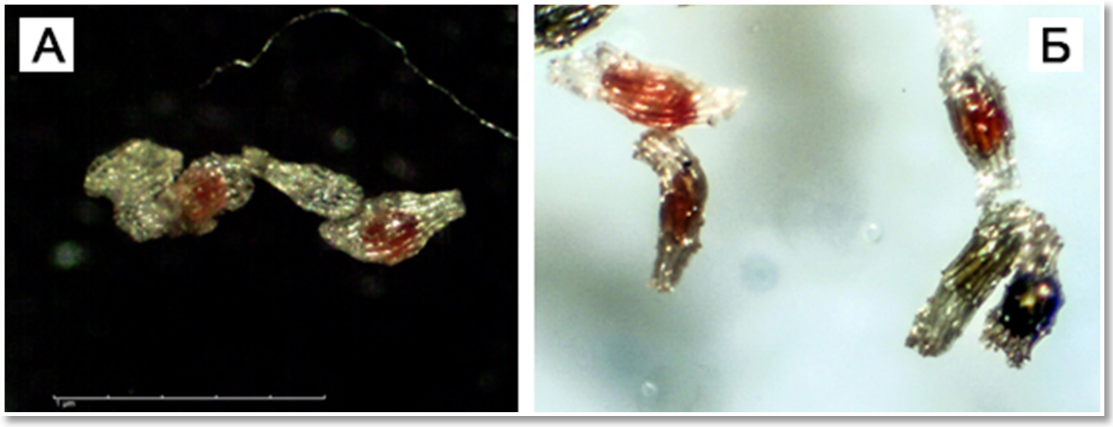
У циљу развијања методологије за *ex situ* очување диверзитета терестричних орхидеја приступило се изналажењу оптималне хранљиве подлоге за асимбиотско клијање семена у лабораторији за *in vitro* културу. Испитан је утицај различитих медијума, суплемената и осветљења, који подстичу клијање семена и развој сејанца. Испитивање је обухватило културу недозрелих и зрелих семена како би се утврдио оптималан стадијум зрелости семена, који је потребан за успешно формирање протокорма у контролисаним *in vitro* условима. Огледом су обухваћене врсте које су имале довољно развијених чаура и код којих је установљен висок проценат виабилног семена: *A. pyramidalis*, *G. conopsea*, *G. odoratissima, H.jankae, O. sphegodes*, *O. militaris, S. spiralis*.

5.2.5.1. Култура недозрелих семена

Културом недозрелих семена су обухваћене све наведене врсте изузев *Ophrys sphegodes* и *Orchis militaris*. Недозреле чауре су колекционисане од јуна до августа 2015. и 2016. године. Чауре су одложене у папирне кесе и транспортоване у лабораторију за културу ткива (Департман за воћарство, виноградарство, хортикултуру и пејзажну архитектуру, Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду) након чега се приступило њиховој површинској стерилизацији. Површинска стерилизација чаура је урађена у 10% раствору калцијум-хипохлорита ($CaClO_2$) уз додатак 0,1% Tween-а 20 у трајању од 40 минута. Након испирања стерилном дестилованом водом, чауре су пребачене у ламинарну комору где су потопљене у 96% алкохол и краткотрајно третиране отвореним пламеном. Семена су затим изолована из чауре помоћу стерилног скалпел ножића и посејана на хранљиву подлогу.

5.2.5.2. Култура зрелих семена – колекционисање, складиштење и испитивање виабилности семена

Зреле чауре су колекционисане током лета и јесени 2016. и 2017. године. Затим су одложене у папирне кесе и транспортоване у лабораторију за културу ткива где је урађена екстракција зрелог семена. Изоловано семе је затим остављено на сушење на собној температури у трајању од 48 h након чега је одложено на чување у условима потпуног мрака на температури од 4˚C све до употребе. Сетва семена је спроведена након 3 месеца. Са циљем утврђивања да ли је семе након складиштења сачувало способност клијања, пре сетве семена приступило се испитивању виабилности семена према Vellupillai (1997). Сам поступак се заснива на потапању семена у раствор 1% 2,3,5 trypheniltetrazolim hloridom (pH 7,0) на собној температури у трајању од 24 h. Поступак бојења је завршен испирањем семена дестилованом водом. Бројање виабилног семена (црвено обојен ембрион) је вршено помоћу бинокуларне лупе Motic 39C N9GO (Слика 2). Сетва семена је урађена само за оне врсте чија је виабилност износила више од 50%.



Слика 2. Виабилно семе (црвено обојено): а) *Ophrys sphegodes*; б) *Gymnadenia conopsea*

Стерилизација семена

Изолована семена су одложена у мале филтер кесице Whatman No. 3 које су затим потопљене у дестиловану воду у трајању од 24 h на температури од 4˚C. Површинска стерилизација је урађена потапањем кесица са семенима у 7% раствор калцијум-хипохлорита ($CaClO_2$) уз додатак 0,1% Tween-а 20, уз повремено мешање. Након 20 минута, семена су испирана дестилованом водом. Стерилизација биљног материјала је завршена у ламинарној комори потапањем кесица у 70% алкохол у трајању од 2 минута и поновним испирањем у стерилној дестилованој води.

Утицај хранљиве подлоге и осветљења на клијање семена

Са циљем изналажења оптималног састава хранљиве подлоге, који подстиче клијање семена, формирање протокорма и развијање биполарног сејанца, испитана су два базална медијума - Knudson C (Knudson 1946) (Morel modification) (KC) и модификован Malmgren медијум (1996) (MM) (Табела 4) – обогаћена са суплементима који представљају извор органског облика азота. Базални медијум у комбинацији са једним суплементом чинили су једну испитивану комбинацију, док је контрола представљала базални медијум без суплемената (MMK и KCK). Суплементи који су додати у обе хранљиве подлоге чинили су кокосова вода (CW 50 ml l^{-1}), сок од ананаса (PJ 50 ml l^{-1}) и пептон (PE 2 g l^{-1}), док је casein hydrolysate (CA 400 mg l^{-1}) у комбинацији са фолном киселином (0,5 mg l^{-1}) додат само у KC медијум. Разлику између испитиваних медијума чинила је и комбинација са адитивима (A) – MM хранљива подлога је обогаћена са L-глутамином (100 mg l^{-1}) док је KC обогаћен са Л глутамином

(100 mg l^{-1}) и фолном киселином (0,5 mg l^{-1}). Све хранљиве подлоге које су обухваћене овим истраживањем садржале су 2% сахарозе, 7% агара и 1% активног угља, док им је pH вредност подешена на 5,8 пре аутоклавирања на температури 121˚C у трајању од 20 мин. Стерилисан медијум је потом разливен у петри кутије пречника 9 cm тако да свака петри кутија садржи 50 ml медијума. Стерилисано семе је нането на површину хранљиве подлоге помоћу лабораторијске спатуле након чега су петри кутије увијене једним слојем парафилма (Parafilm M, Menasha, Wisconsin, US) и одложене у собу за узгајање на температуру 23 ± 2˚C.

Са циљем одређивања оптималног осветљења који подстиче клијање семена у *in vitro* условима, свака испитивана комбинација медијума је постављена под два режима светлости: режим 16 h светло/8 h мрак (16/8 C/M) јачине 40 µmol m^{-2} s^{-1} и режим потпуног мрака (0/24 C/M). Сваки третман је имао 5 понављања. Мерења су вршена 8, 10 и 12 недеља након постављања огледа и обухватала су одређивање степена клијавости која је подељена у 7 фаза развоја: семена код којих је дошло до бубрења ембриона али без пробијеног омотача (%); семена са набубрелим ембрионом и пробијеним омотачем (%); формирање протокорма са ризоидима (%); формирање протокорма са вршним пупољчићем и ризоидима (%), формирање првог листа (%), издуживање првог листа (%) и сејанац са два или три листа (%) (Табела 5), док је степен укупне клијавости (%) чинио збир свих фаза, изузев нулте фазе. Истовремено су вршена морфометријска мерења ембриона и протокорма: висина ембриона/протокорма (mm); ширина ембриона/протокорма (mm), висина вршног пупољчића (mm). Бројање исклијалог семена као и мерења величине ембриона/протокорма вршена су помоћу бинокулатне лупе Motic 39C N9GO и софтвера Motic image plus 2.0.

Табела 4. Састав и садржај базалних хранљивих подлога

	KC	MM
Макроелементи (mg/l)	-	-
$Ca(NO_3)_2$	347.43	-
KH_2PO_4	250.0	75
KCl	250.0	-
$MgSO_4$	122.3	97.7
$(NH_4)_2SO_4$	500.0	-
NH_4NO_3	500.0	-
$Ca_3(PO_4)_2$	-	75
Микроелементи (mg/l)	-	-
$FeSO_4x7H_2O$	25.0	27.85
$MnSO_4xH_2O$	5.7	1.54
Na_2EDTA	-	37.26
Витамини (mg/l)	-	-
D-Biotin	-	0.05
Фолна киселина	-	0.5
Глицин	-	2.0
Мио-инозитол	-	100.0
Никотинска киселина	-	5.0
Витамин (Б6)	-	5.0
Тиамин	-	10.0
Казеин	-	400.0

Табела 5. Фазе клијања семена испитиваних врста (модификација Stewart and Zettler 2002)

Фаза	Опис стања
0	Бубрење ембриона
1	Наставак бубрења ембриона, пробијен семени омотач (= клијање)
2	Формирање протокорма
3	Формирање пупољчића и ризоида
4	Појава првог листа
5	Издуживање првог листа
6	Сејанац са два или три листа

5.2.6. Изолација и идентификација гљива из кореновог система

Како би се избегло смањење величина популација приликом узорковања, за потребе испитивања присутности гљива у кореновом систему је одабрано 7 врста са 4 локалитета: *G. conopsea* (Беочин 1, Беочин 3), *G. odoratissima* (Беочин 3), *A. pyramidalis*

(Беочин 1), *E. microphylla* (Парагово), *O. sphegodes* (Беочин 2), *O. militaris* (Беочин) и *O. mascula* (Раковац). Након морфолошке идентификације врста орхидеја, приступило се узорковању кореновог система. Из сваке популације, одабрано је по 5 јединки са којих је вршено узорковање. Биљни материјал је транспортован у Лабораторију за микробиологију на Департману за ратарство и повртарство, Пољопривредног факултета, Универзитета у Новом Саду, где се вршила изолација и идентификација микоризних гљива.

5.2.6.1. Стерилизација биљног материјала и изолација гљива

Коренчићи су пажљиво ослобођени од остатака земље и испрани под млазом текуће воде. Стерилизација је настављена у ламинарној комори где су коренчићи потопљени у раствор натријум хипохлорида (NaOCl) у трајању од 5 минута након чега је уследило испирање стерилном дестилованом водом. Коренчићи су затим исецкани на сегменте величине 2 mm који су потом стављени на PDA (Potato Dextrose Agar) подлогу са додатком 50 mg/l стрептомицина. Петри кутије су затваране парафилмом и инкубиране у мраку на температури од 26˚C током две недеље, односно док хифе нису постале видљиве и формирале мицелију. Изолати су очишћени методом врхова хифа и чувани на PDA подлози у условима потпуног мрака на температури 4˚C.

5.2.6.2. Морфолошка карактеризација гљива

Изолати гљива су чувани на собној температури (26˚C) у трајању од две недеље, док је део изолата чуван у истим условима у трајању од 6 недеља како би дошло до формирања склероција. Проучавање морфолошких особина вегетативних органа обухватило је праћење развоја и оцену фенотипских карактеристикеа *Rizoctonia* spp. (облик, величина, боја, ивице, мирис, и стварање ексудата на површини колоније) на PDA подлози као и испитивање микроскопских особина мицелије прављењем отисних препарата (септираност хифе, утврђивање броја једара, формирање монилиоидних ћелија и уколико су присутне, облик монилиоидних ћелија). Микроскопирање и фотографисање вршено је помоћу Olimpus KHC микроскопа (утврђивање ивице и структуре мицелије, увећање 10×) и помоћу Olimpus BX-50 за микроскопске особине мицелије (увећање 400× или 1000×).

5.2.7. Анкета „Рангирање потенцијалног пласмана врста на тржишту“

Потребе тржишта за новим производом терестричних орхидеја испитане су кроз методологију “Пет тачака успеха” које је поставио Nau (2007). Анкета је обухватила одговоре на пет питања, од којих три обухватају добро познати DUS тест који се користи у свим проценама сорти. Оцењивање је спроведено кроз експертску анкету у којој је учествовало 53 особе, међу којима су професори, студенти и представници хортикултурних компанија. Од испитаника се тражило да одговоре са Да или Не на следећа питања:

Иновативност: Да ли је то потпуно нови тип биљке, који раније није виђен на тржишту?

Јединственост: Да ли има јединствену, занимљиву или нову боју цвета, форму, облик и/или величину?

Различитост: Да ли има приметно другачији хабитус, висину или неке друге особине које раније нису виђене у вртовима - баштама?

Стабилност: Да ли се период цветања одвија током одговарајуће сезоне, нпр. током лета, зиме или током целе године? Да ли је отпорна/толерантна на временске услове на регионалном нивоу (подразумева широк спектар услова на планираним тржиштима)?

Потражња: Да ли задовољава или превазилази потребе индивидуалних башта и да ли је погодна/у складу са потребама професионалних узгајивача?

5.2.8. Статистичке методе обраде података

Резултати свих истраживања обухваћених овом дисертацијом обрађени су у програмском пакету STATISTICA 13 (StatSoft. Inc, Tulsa, OK, USA). За квантитативне податке морфолошких особина испитиваних врста примењена је основна статистичка обрада која обухвата одређивање средње вредности и стандардне девијације. Такође, урађена је и анализа варијансе (One way ANOVA) како би се испитале статистички значајне разлике између испитиваних врста, док је мултивариационом дискриминантном анализом извршено груписање испитиваних јединица према сличностима на нивоу врсте и популације. Анализа главних компоненти (PCA) спроведена је за квалитетивне и квантитативне податке, како би се испитала варијабилност и кључне компоненте варијације на нивоу врсте. Пре PCA анализе, квалитативни подаци су стандардизовани помоћу STANDARDIZE процедуре у оквиру Microsoft Excell пакета, чиме је стандардна девијација за све параметре сведена на 1.

Подаци који представљају цитолошке особине врста и популација обрађени су кроз основне статистичке прорачуне што подразумева одређивање средње вредности, стандардне девијације, минималне и максималне вредности и коефицијент варијације. Груписање испитиваних популација према сличностима извршено је преко мултиваријационе Кластер анализе која је спроведена на основу средњих вредности. Код врста које су заступљене на више локалитета анализом варијансе је испитано да ли постоји статистички значајна разлика у величини генома унутар врсте, и између популација, након чега је за исте податке урађен и Данканов тест вишеструких интервала.

За резултате који представљају утицај осветљења и хранљиве подлоге на клијање семена урађена је анализа варијансе како би се испитао утицај различитих фактора на клијање семена. Мофрометријски подаци ембриона и протокорма обрађени су основном статистичком обрадом која подразумева средњу вредност и коефицијент варијације. Данканов тест вишеструких интервала је примењен за утврђивање разлика између средњих вредности где вредности обележене истим словом нису стратистички значајне за $p<0,05$.

За обраду података који су добијени у оквиру анкете „Рангирање потенцијалног пласмана врста на тржшту“ извршена је One way ANOVA.

6. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

6.1. Генетички диверзитет испитиваног материјала

6.1.1. Евидентирање и мапирање терестричних орхидеја *in situ*

Фрушка гора представља природно станиште великог броја терестричних орхидеја, што је чини изразито богатим подручјем. То потврђује и резултат добијен теренским истраживањем у периоду између 2014-2016, приликом којег је евидентирано 17 различитих врста терестричних орхидеја на 10 локалитета (Табеле 6, 7). Међутим, већина популација је изолована и јавља се у еколошки маргиналним стаништима, окруженим пољопривреним земљиштима и викенд насељима где су често изложене неповољним антропогеним факторима (Слика 3).

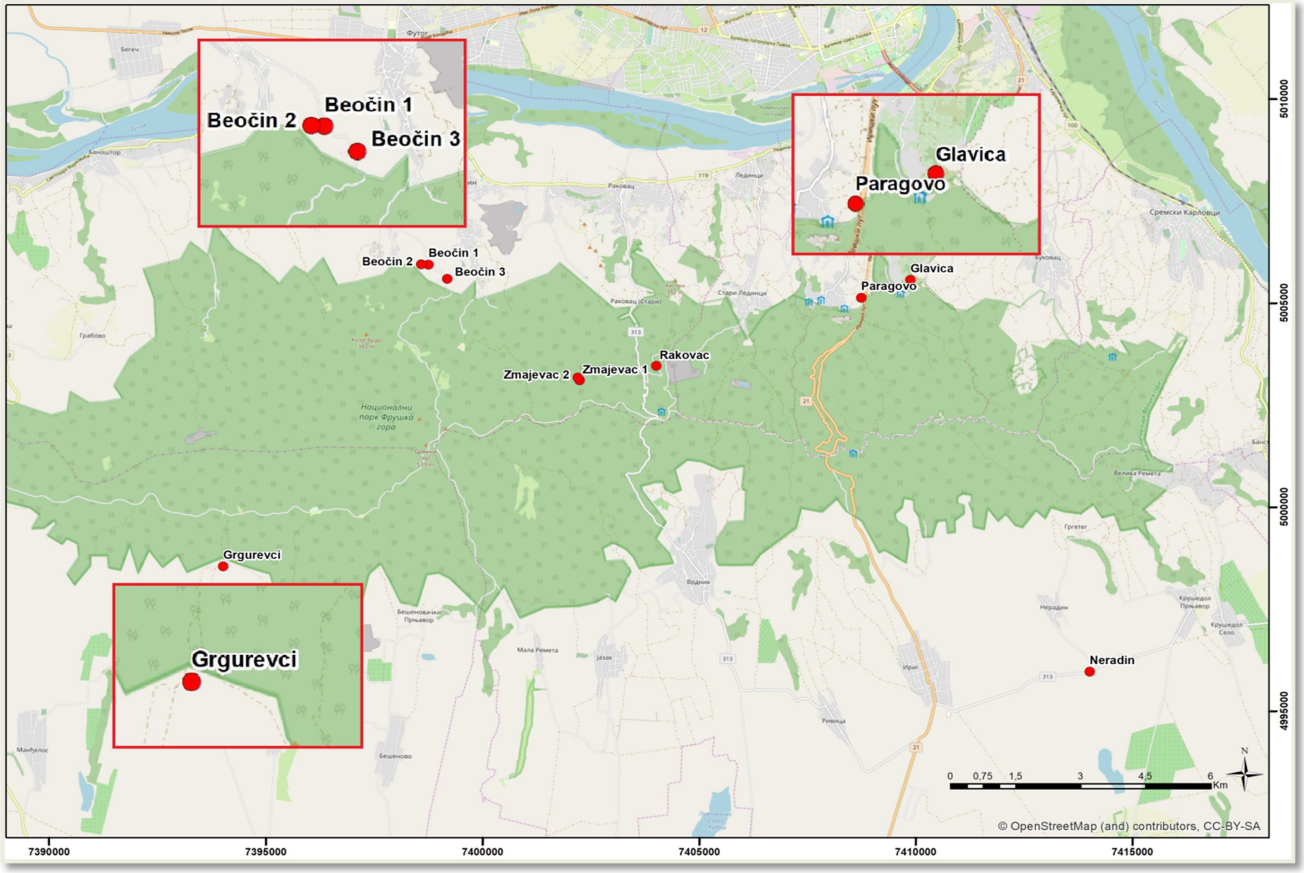
Вишегодишњи резултати добијени током теренског истраживања указују да су најчешће присутне врсте евидентиране на три локалитета и припадају родовима *Anacamptis* и *Gymnadenia* (Беочин 1, Беочин 3 и Главица). Популације ових врста бројале су између 10-100 односно 100-1000 индивидуа и окарактерисане су као стабилне. Две веома честе врсте са стабилним популацијама, *Spiranthes spiralis* и *Orchis militaris*, евидентиране су на два, односно три локалитета. Такође, мапиране су и стабилне популације врста *Neotinea tridentata* и *Ophrys sphegodes* на једном локалитету. Иако је врста *Orchis purpurea* евидентирана на три локалитета, њене популације не могу бити окарактерисане као стабилне због веома малог броја јединки у овиру сваке појединачне популације. Родови *Himantoglossum* и *Epipactis*, као и врсте *Orchis mascula*, *Limodorum abortivum* и *Platanthera bifolia*, са мање од 10 јединки у популацији, припадају популацијама близу изумирања.

Иако је према категоризацији величине популације већина ливадских врста окарактерисана као стабилна, локалитети на којима су заступљене популације ових врста се налазе изван заштићеног подручја Националног парка, изложени различитим неповољним факторима (Слика 5). Посебно се истичу локалитети Беочин 3 и Главица које су обрасле високим травама, док се локалитети Беочин 1, Беочин 2 и Нерадин врло често користе за испашу стоке. На тај начин долази до уништења надземног дела биљке током цветања, што за последицу има знатно мањи степен оплодње, а самим тим и количину семена која би потенцијално исклијала. Такође, део локалитета Беочин 3 је

коришћен као дивља депонија где је приликом чишћења исте дошло до уништавања популација *O. purpurea* и *G. odoratissima* (Слика 4).

Слика 3. Локалитет Беочин 3

Слика 4. Уништено природно станиште популација *Orchis purpurea* и *Gymnadenia odoratissima*



Legenda:

- Lokalitet
- Važeća granica NP „Fruška gora“

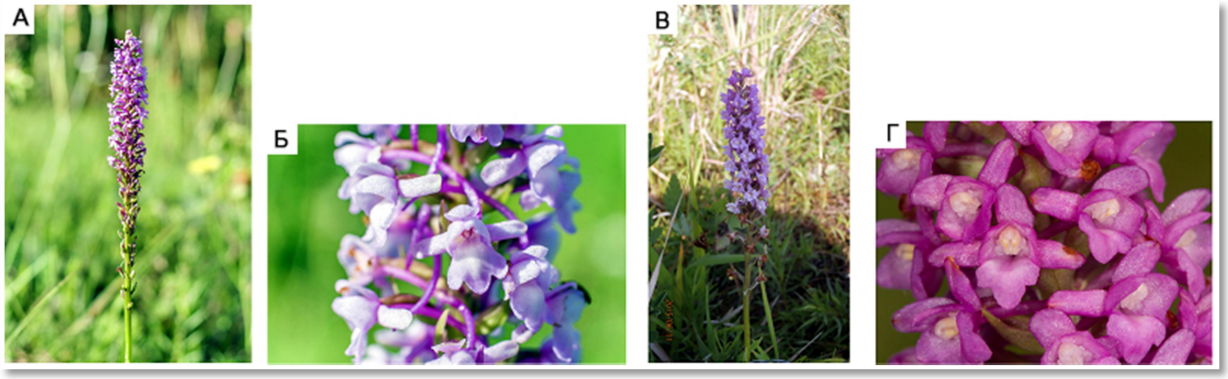
Слика 5. Распоред локалитета терестричних орхидеја на територији Фрушке горе

Табела 6. Локалитети и категоризација величине популације према броју јединки

Локалитет	Координате (географска дужина, ширина, висина)	Врсте	Величина популације		
			2014.	2015.	2016.
Беочин 1	45,1907861° N 19,7114611° E 207,22	*Anacamtis pyramidalis*	4	4	4
		Orchis militaris	3	3	3
		Neotinea tridentata	4	3	3
		Orchis purpurea	1	2	2
		Gymnadenia conopsea	3	3	3
		Neotinea ustulata	-	-	2
Беочин 2	45,190898° N 19,709237° E 256,82	*Ophrys sphegodes*	3	3	3
		Orchis militaris	2	2	2
Беочин 3	45,187726° N 19,717001° E 204,98	*Orchis purpurea*	1	1	2
		Anacamptis pyramidalis	4	4	4
		Gymnadenia conopsea	3	3	3
		Gymnadenia odoratissima	3	3	3
Раковац	45,169143° N 19,778772° E 342,55	*Limodorum abortivum*	0	0	2
		Orchis mascula	1	1	2
		Cephalanthera longifolia	1	1	0
Змајевац I	45,165705° N 19,756336° E 404,47	*Platanthera bifolia*	0	0	1
Змајевац II	45,166330° N 19,755781° E 409,97	*Epipactis helleborine*	2	2	2
Парагово	45,184818° N 19,838675° E 179,83	*Epipactis microphylla*	2	2	2
		Epipactis helleborine	2	2	2
Нерадин	45,102958° N 19,907311° E 186,97	*Spiranthes spiralis*	3	3	4
Гргуревци	45,123489° N 19,652675° E 335,81	*Spiranthes spiralis*	3	3	3
Главица	45,188898° N 19,853043° E 164,37	*Himantoglossum jankae*	0	0	2
		Orchis purpurea	2	2	2
		Gymnadenia conopsea	3	3	4
		Anacamptis pyramidalis	4	4	4
		Orchis militaris	3	3	3
		Ophrys scolopax	0	2	2

Слика 6. Приказ врста терестричних орхидеја евидентираних на Фрушкој гори:

а) *Orchis purpurea*; б) *Orchis militaris*; в) *Orchis mascula*; г) *Neotinea tridentata*; д) *Anacamptis pyramidalis*; ђ) *Neotinea ustulata*; е) *Epipactis microphylla*; ж) *Spiranthes spiralis*; з) *Eepipactis helleborine*; и) *Limodorum abortivum*; ј) *Cephalanthera longifolia*; к) *Himantoglossum jankae*; л) *Ophrys scolopax*; љ) *Ophrys sphegodes*; м) *Platanthera bifolia*. (фото: Савић Д., Дулић Ј.)



Слика 7. Приказ цвасти и цветова врста *Gymnadenia conopsea* (а,б) и *Gymnadenia odoratissima* (в, г) (фото: Савић Д., Дулић Ј.)

6.1.2. Диверзитет терестричних орхидеја утврђен на основу мофолошке и цитолошке карактеризације

6.1.2.1. Морфолошка карактеризација терестричних орхидеја заснована на квантитативним и квалитативним особинама

Квантитативни параметри вегетативних и генеративних органа указују да се врсте знатно разликују према свим особинама што је потврђено и анализом варијансе испитиваних морфометријских особина (Табела 7). Анализом резултата уочене су статистички значајне разлике између испитиваних врста (Табела 8), пре свега код особина које чине хабитус – висина стабла, дужина цвасти и број цветова. Висина биљака кретала се од 158,70 mm код врсте *S. spiralis*, до 534,20 mm код *H. jankae* и 569,33 mm код *G. conopsea.* Висина стабла се разликовала и између популација у оквиру исте врсте од којих се највише истиче *O. militaris* са просечном висином од 357,20 mm за популацију која расте на локалитету Главица и 312,00 mm за популацију која расте на локалитету Беочин 2. Високо варирање запажено је и код дужине цвасти где су се вредности кретале од 60,10 mm за врсту *S. spiralis* до 225,00 mm за врсту *L. abortivum.* Најмањи број цветова имале су врсте *O. sphegodes* (5,30) и *E. microphylla* (6,60) док је највећи број цветова забележен ков врста из рода *Gymnadenia* (66,00 за *G. odoratissima* и 51,30 за *G. conopsea*).

Особине листа показују да постоји разлика између испитиваник врста како по морфометријским (квантитативним) особинама (висина листа, ширина листа) тако и по

описним (квалитативним) особинама (облик и боја листа). Највише вредности морфометријских параметара забележене су код врсте *O. purpurea* са просечном дужином 135,71 mm и ширином листа 44,14 mm, док су најмање вредности измерене код врсте *S. spiralis* и *E. microphylla* са просечном дужином листа 15,50 mm и 17,74 mm и ширином листа 9,30 односно 4,13 mm. Резултати који представљају квалитативне податке указују да код врста *G. conopsea, G. odoratissima, A. pyramidalis* и *E. microphylla* преовладава ланцетаст облик лиске (1). Уско елиптичан облик је установљен код врста, *O. militaris*, *N. tridentata*, *O. sphegodes* и *S. spiralis* (2) док је код врсте *H. jankae* и *O. purpurea* (3) забележен елиптичан облик листа. Обојеност листа је варирала између зелене и тамно зелене боје, где је код врста *G. conopsea, G. odoratissima, A. pyramidalis* и *O. sphegodes* установљена зелена боја листа (3), док је код свих осталих врста установљена тамно зелена боја листа (5).

Квантитативне особине генеративних органа, односно цвета, показале су да постоје разлике између врста, међутим нису уочене статистички значајне разлике између популација унутар исте врсте. Такође, резултати показују да дужина лабелума углавном утиче на димензију односно висину цвета. Врста која се истиче са највећим вредностима ових карактера је *H. jankae* са просечном висином цвета 50,45 mm и дужином лабелума 39,70 mm. Прати је *L. abortivum* са 24,00 mm просечном висином цвета и 22,10 mm просечном дужином лабелума, док су најмање вредности измерене код врсте *S. spiralis* са просечном висином цвета 3,50 mm и дужином лабелума 4,20 mm.

Иако је грађа цвета код свих орхидеја иста и састоји се из три листића спољашњег круга цветног омотача (два бочна и један горњи листић), и три листића унутрашњег круга цветнго омотача, неопходно је утврдити разлике како између врста, тако и између популација. Квалитативне особине обухваћене овим истраживањем обухватиле су мерења свих популација, међутим, с' обзиром да нису уочене разлике између популација унутар исте врсте, резултати по врстама су обједињени (Табела 9). Код особине “Положај цветне дршке” утврђена су сва три типа положаја, усправан, полу-усправан и хоризонтални. Међутим, само две врсте (*L. abortivum* и *S. spiralis*) су имале усправан полошај цветне дршке, две врсте (*G. conopsea* и *G. odoratissima*) хоризонтални положај, док је код свих осталих врста установљен полу-усправни положај цветне дршке. Особине које листиће спољашњег и унутрашњег круга цветног омотача указују на висок степен варијације између испитиваних врста. Облик горњег листића спољашњег круга цветног омотача варирао је од елиптичног до јајастог, док је облик бочних листића спољашњег и унутрашњег круга цветног омотача варирао од

уско елиптичног до овалног. Обојеност спољашњих и унутрашњих листића цветног омотача варирала је у броју боја од 1 до 3. Иако су потврђене разлике између квантитативних особина лабелума, квалитативне осовине нису показале велико варирање. Број боја лабелума се кретао од 1 до 2 док је валовитост маргина варирала од категодије Одсутно или веома слаб до средње.

Табела 7. Просечне вредности квантитативних параметара вегетативних и генеративних органа измерених у периоду 2014.-2016. године

Врста	Локалитет	Висина (mm)	Дужина цвасти (mm)	Дужина листа (mm)	Ширина листа (mm)	Број цветова	Висина цвета (mm)	Ширина цвета (mm)	Лабелум дужина (mm)	Лабелум ширина (mm)
O. militaris	Беочин 2	312,00±14,46	75,00±11,33	99,88±8,76	30,40±2,95	30,60±5,27	10,50±1,27	5,09±0,54	9,55±0,71	5,26±0,76
O. militaris	Главица	357,20±33,92	93,00±15,95	108,76±7,93	35,48±2,62	36,90±5,40	12,53±1,08	7,62±0,83	11,83±0,74	4,52±0,42
x̄		334,50±24,19	84,00±13,64	104,32±8,35	32,94±2,78	33,75±5,33	11,52±1,18	6,35±0,68	10,69±0,73	4,89±0,59
O. purpurea	Беочин 1	409,33±25,42	106,00±3,60	133,00±5,19	42,16±3,17	40,67±2,08	16,70±0,17	12,97±0,04	11,02±0,03	8,90±0,17
O. purpurea	Беочин 3	422,33±20,30	102,00±2,64	135,67±2,08	43,67±4,93	39,33±2,57	16,43±0,55	12,90±0,36	11,33±0,57	8,66±0,57
O. purpurea	Главица	434,50±24,30	102,25±2,72	138,45±2,33	46,62±7,03	38,25±6,18	16,45±0,38	12,87±0,57	11,15±0,19	8,55±0,64
x̄		422,053±23,34	103,41±2,98	135,71±3,2	44,15±5,04	39,41±3,61	16,52±0,37	12,91±0,32	11,16±0,26	8,70±0,46
A. pyramidalis	Главица	321,00±30,41	50,10±4,28	99,00±15,15	15,55±0,95	37,30±4,80	8,68±0,97	9,68±0,76	7,60±0,69	9,00±0,00
A. pyramidalis	Беочин 3	308,60±31,44	47,90±5,34	98,70±14,46	15,35±0,91	37,10±4,81	8,68±0,94	9,58±1,11	7,60±0,96	9,00±0,00
A. pyramidalis	Беочин 1	272,20±31,28	39,20±9,00	99,60±14,00	8,30±1,05	33,80±2,34	9,71±0,50	10,41±0,94	7,40±0,69	9,00±0,00
x̄		300,60±31,04	45,73±6,20	96,10±14,53	13,06±0,97	36,07±3,98	9,02±0,80	9,89±0,93	7,53±0,78	9,00±0,00
G. conopsea	Главица	573,10±58,71	154,80±21,51	134,12±16,56	13,18±1,89	52,40±8,04	8,79±1,04	12,92±0,80	4,90±0,56	6,70±0,94
G. conopsea	Беочин 1	572,70±59,16	154,30±21,58	133,96±16,6	13,75±1,88	50,60±8,50	8,73±1,07	12,99±0,86	4,90±0,48	6,70±0,94
G. conopsea	Беочин 3	562,20±50,23	144,90±20,25	131,81±16,52	12,29±2,29	50,90±7,43	8,73±1,00	12,93±0,86	4,80±0,42	6,90±0,74
x̄		569,33±56,03	151,33±21,11	129,96±16,56	12,87±2,02	51,30±7,99	8,75±1,03	12,94±0,84	4,86±0,48	6,76±0,87
O.sphegodes	Беочин 2	245,60±30,31	73,20±19,85	41,30±3,46	14,70±2,05	5,30±1,33	16,49±2,28	16,27±0,44	8,90±0,73	8,60±0,51
G. odoratissima	Беочин 3	308,40±52,14	83,30±14,57	107,69±8,52	7,05±0,60	66,00±7,98	5,76±0,72	7,71±0,97	3,13±0,26	2,59±0,46
E. microphylla	Парагово	241,40±39,16	87,36±28,48	17,74±2,88	4,13±0,41	6,60±2,17	11,17±0,64	10,83±0,31	6,60±0,51	3,00±0,08
L. abortivum	Раковац	445,00±6,88	225,00±13,12	-	-	8,80±1,13	24,00±0,81	36,37±0,67	22,10±2,03	5,70±0,82
H. jankae	Беочин 1	534,20±19,74	208,30±13,40	94,7±7,16	30,03±2,54	39,70±2,83	50,45±2,27	9,14±0,68	39,70±2,16	4,80±0,23
S. spiralis	Нерадин	158,70±12,20	60,10±6,90	15,50±1,43	9,30±1,15	20,90±2,37	3,50±0,52	4,50±0,52	4,20±0,42	2,80±0,42
N. tridentata	Беочин 1	265,00±33,08	42,80±4,18	63,77±7,14	19,51±1,98	41,60±5,13	8,81±0,54	6,22±1,07	6,08±0,22	5,94±0,82

Табела 8. Анализа варијансе за морфометријске карактеристике испитиваних врста

Извори варирања	Степени слободе	Висина		Дужина цвасти		Дужина листа		Ширина листа		Број цветова	
		Средина квадрата	F однос	Средина квадрата	F однос	Средина квадрата	F однос	Средина квадрата	F однос	Средина квадрата	F однос
Intercept	1*	18818644*	6714,710*	1415457*	5261,272*	1180293*	2268,807*	57318,64*	11978,13*	168247,3*	7435,108*
Врста	17*	456452*	55,717*	29893*	111,113*	14087*	105,854*	1145,83*	239,19*	2636,4*	116,506*
Грешка	142	2803		269		133		133		22,6	

*p<0,05

Извори варирања	Степени слободе	Висина цвета		Ширина цвета		Лабелум дужина		Лабелум ширина	
		Средина квадрата	F однос	Средина квадрата	F однос	Средина квадрата	F однос	Средина квадрата	F однос
Intercept	1*	25048,70*	19704,45*	18413,87*	13474,77*	13812,47*	15425,30*	5629,770*	13,617,62*
Врста	17*	1070,35*	841,99*	476,97*	349,03*	729,80*	815,02*	45,427*	109,88*
Грешка	142	1,27		1,37		0,90		0,413	

*p<0,05

Табела 9. Просечне вредности квалитативних параметара вегетативних и генеративних органа измерених у периоду 2014-2016. године

Врста	ОЛ	БЛ	ПЦД	ГЛ: О	БЛ: О	БЧЛ: ВМ	СКЦО: ББ	УК(Б): О	УК(Б): ВМ	УК(Б): ББ	Л: ББ	Л: ВМ
G. conopsea	1,0	3,0	3,0	3,0	1,0	1,0	2,0	3,0	1,0	2,0	1,0	1,0
G.odoratissima	1,0	3,0	3,0	3,0	1,0	1,0	1,0	3,0	1,0	1,0	1,0	1,0
H.jankae	3,0	5,0	2,0	2,0	2,0	1,0	2,0	2,0	1,0	2,0	2,0	2,0
L.abortivum	-	5,0	1,0	4,0	3,0	1,0	2,0	3,0	1,0	2,0	1,0	2,0
O.militaris	2,0	5,0	2,0	3,0	3,0	1,0	3,0	1,0	1,0	2,8	2,0	1,0
O.purpurea	3,0	5,0	2,0	3,0	3,0	1,0	3,0	1,0	3,0	2,4	2,0	2,0
A.pyramidalis	1,0	3,0	2,0	3,0	3,0	1,0	2,0	2,0	1,0	2,3	2,6	2,0
N.tridentate	2,0	5,0	2,0	3,0	3,0	5,0	3,0	1,0	3,0	3,0	2,0	1,3
O.sphegodes	2,0	3,0	2,0	2,0	3,0	1,0	1,0	1,0	1,0	2,0	1,0	1,0
S.spiralis	2,0	5,0	1,0	3,0	3,0	1,0	1,0	2,0	3,0	1,0	2,0	2,0
E.microphylla	1,0	5,0	2,0	2,0	2,0	1,0	2,0	2,0	1,0	1,0	2,0	1,0

ОЛ – Облик листа: 1- ланцетасти ; 2 –уско елиптичан; 3 – елиптичан

БЛ – Боја листа: 1 – светло зелена; 3 – зелена; 5 – тамно зелена

ПЦД – Положај цветне дршке : 1- усправна;2 – полу-усправна; 3 – хоризонтална

ГЛ:О – Горњи листић спољашњег круга цветног омотача: Облик: 1– уско елиптичан; 2 елиптичан; 3 овалан; 4 - јајаст (обовате); 5 – спатулате

БЛ:О – Бочни листићи спољашњег круга цветног омотача: Облик: 1– уско елиптичан; 2 елиптичан; 3 овалан; 4 - јајаст (обовате); 5 – спатулате

БЛ:ВМ – Бочни листићи спољашњег круга цветног омотача: Валовитост маргина: 1– одсутан или веома слаб; 3 – слаб; 5 – средњи; 7 – јако; 9 – веома јако

СКЦО: ББ – Спољашњи круг цветног омотача: Број боја

УК(Б): О – Унутрашњи круг цветног омотача (бочни листићи): Облик: 1– уско елиптичан; 2 елиптичан; 3 овалан; 4 - јајаст (обовате); 5 – спатулате

УК(Б): ВМ – Унутрашњи круг цветног омотача (бочни листићи): Валовитост маргина: 1- одсутан или веома слаб; 3 – слаб; 5 – средњи; 7 – јако; 9 – веома јако.

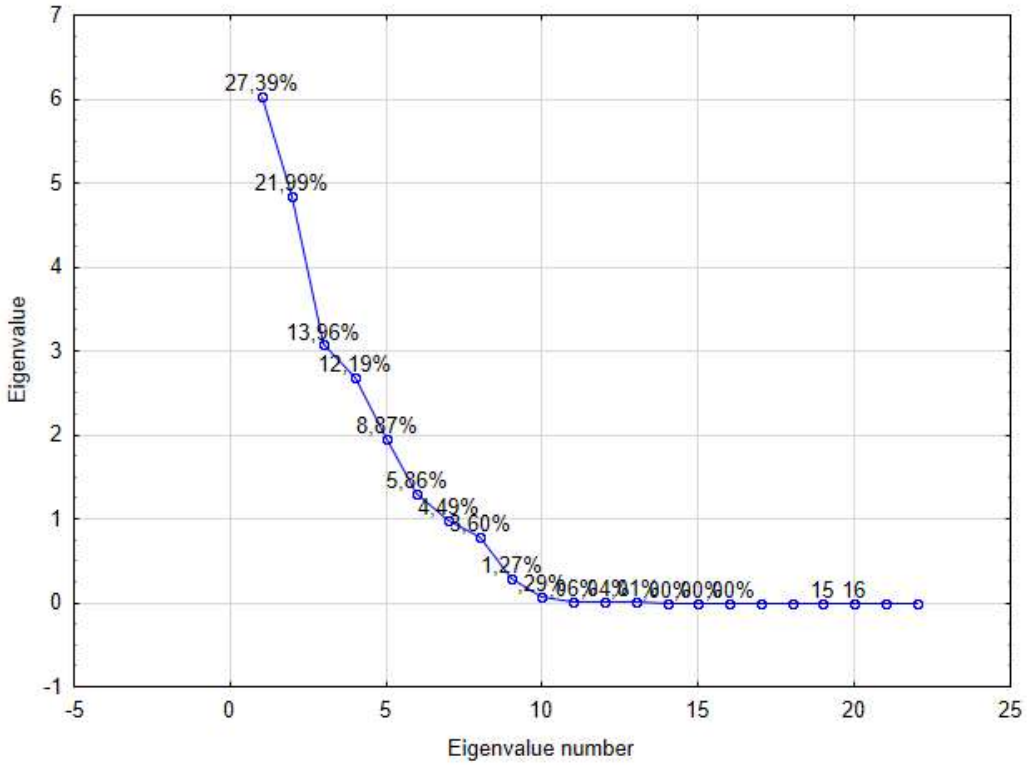
УК(Б): ББ – Унутрашњи круг цветног омотача (бочни листићи): Број боја

Л:ББ – Лабелум: Број боја

Л:ВМ – Лабелум: Валовитост маргина: 1 – одсутан или веома слаб; 2 – средње; 3 – јако

6.1.2.1.1. Анализа главних компонената испитиваних квалитативних и квантитативних података

Анализом главних компонената испитиваних особина утврђене су особине које носе највећи степен варијабилности узорка. Сви фактори који се налазе изнад првог подеока у-осе сматрају се значајним носиоцима варијабилности (Графикон 1). Прве три компоненте су од највећег значаја и објашњавају преко 60% варијабилности. Прва главна компонента (ГК1) објашњава 27,39% укупне варијабилности, друга главна компонента (ГК2) објашњава 21,98% варијабилности док трећа главна компонента (ГК3) објашњава додатних 13,95% укупне варијабилности. Наредне две компоненте (ГК4 и КГ5) су такође значајни носиоци варијације, док преостале компоненте имају сукцесивни пад или су занемарљиво мале. Особине које су показале највећи значај на ГК1 (вредности >0,70) обухватиле су углавном особине које карактеришу лист (ширина листа, облик листа, боја листа) и генеративне органе односно цвет (број боја спољашњег круга цветног омотача и облик бочних листича унутрашњег круга цветног омотача). Особине које су показале да имају највећи значај код друге и треће компоненте односе се на особине које дефинишу хабитус – висина биљке, дужина листа и положај цветне дршке за ГК2 и дужина цвасти за ГК3 (Табела 10).



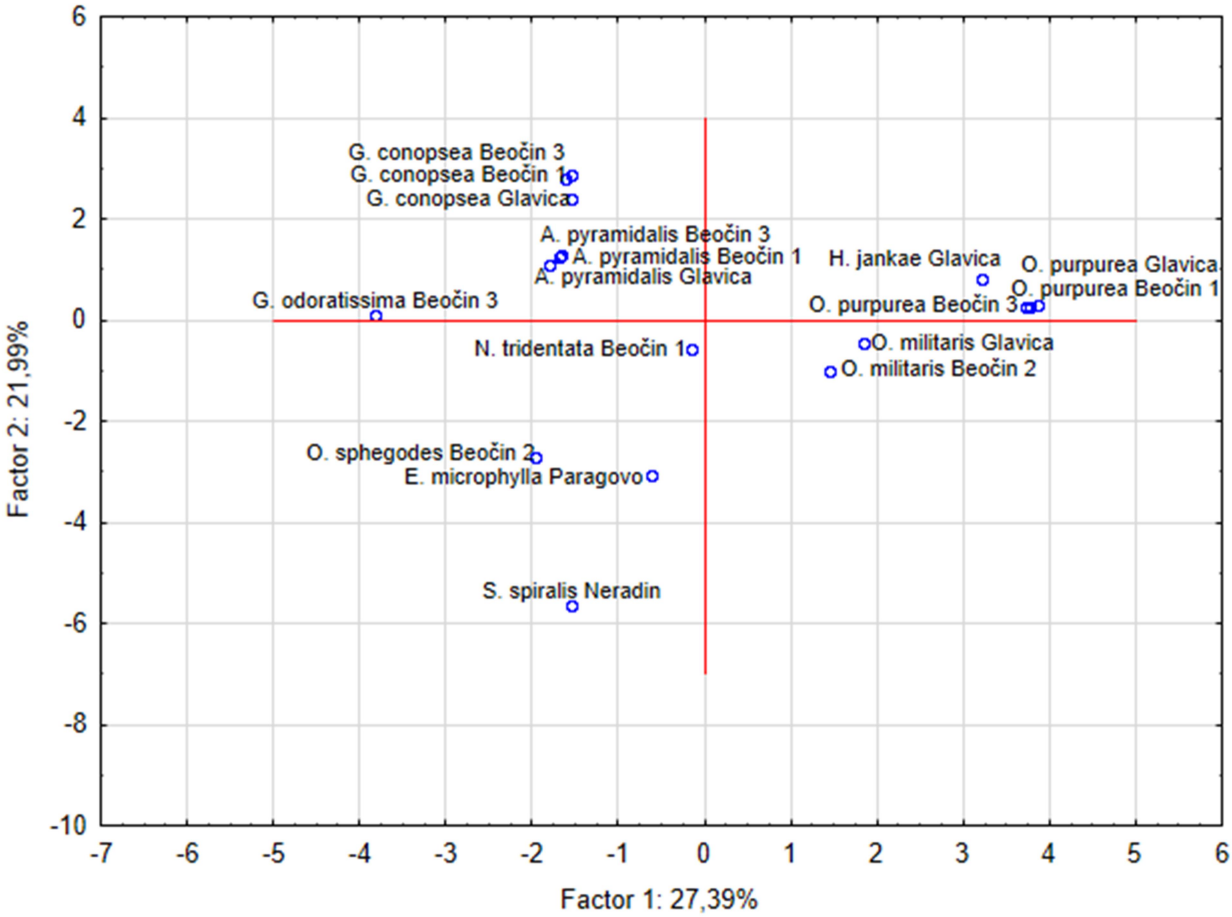
Графикон 1. Анализа главних компонената испитиваних особина

Табела 10. Мултивариациона анализа главних компонената квалитативних и квантитативних морфолошких особина

	ГК 1	ГК2	ГК3
Висина биљке	0,261409	0,773031*	-0,496114
Дужина цвасти	0,313823	0,427298	-0,788607*
Дужина листа	0,332289	0,846240*	0,022115
Ширина листа	0,931501*	0,112075	0,113868
Број цветова	0,000023	0,622549	0,045036
Висина цвета	0,573654	0,103906	-0,491486
Ширина цвета	0,081939	0,387048	-0,401274
Лабелим: дужина (мм)	0,581426	0,073826	-0,378452
Лабелум: ширина (мм)	0,204038	0,481456	0,312868
Облик листа	0,847049*	-0,416128	-0,036847
Боја листа	0,779607*	-0,472783	-0,061414
Положај цветне дршке	0,267773	0,712974*	0,286537
Горњи листић спољашњег круга цветног омотача-облик	-0,487078	-0,143098	-0,390817
Бочни листићи спољашњег круга цветног омотача-облик	0,397128	-0,660423	0,441177
Бочни листићи спољашњег круга цветног омотача-Валовитост маргина	-0,332386	0,261906	0,626679
Спољашњи круг цветног омотача-Број боја	0,764059*	0,273621	0,442867
Унутрашњи круг цветног омотача (бочни листићи)-облик	-0,713751*	0,478579	-0,071170
Унутрашњи круг цветног омотача (бочни листићи)-Валовитост маргина	0,573213	-0,313005	-0,000145
Унутрашњи круг цветног омотача (бочни листићи)-Број боја	0,386562	0,622836	0,183997
Лабелум: увијање	-0,284343	-0,325312	-0,530044
Лабелум: валовитост маргина	0,643979	-0,409685	-0,284892
Својствена вредност	**6,025179**	**4,837117**	**3,070490**
Укупна варијанса	**27,38718**	**21,98690**	**13,95677**
Кумулативна пропорција	**27,38718**	**49,3941**	**63,3308**

На конструисаном биплоту који је састављен од прве и друге главне компоненте (Графикон 2), уочава се генерално груписање популација према типу варијабилности на популације које припадају родовима *Orchis* и *Himantoglossum* са десне стране и *Anacamptis*, *Gymnadenia*, *Neotinea*, *Ophrys*, *Epipactis* и *Spiranthes* са леве стране графикона. Популације рода *Orchis* и *Himantoglossum* представљају хомогену групу са две подгрупе густо распоређене око првог подеока y-осе. Специфично и слично варирање утврђено је код популације врста *G. odoratissima* и *A. pyramidalis* које су се груписале на истом подеоку y-осе али удаљено од родова *Orchis* и *Himantoglossum.* Врста *N. tridentata* се налази на приближно истом подеоку x-осе као популације *A.*

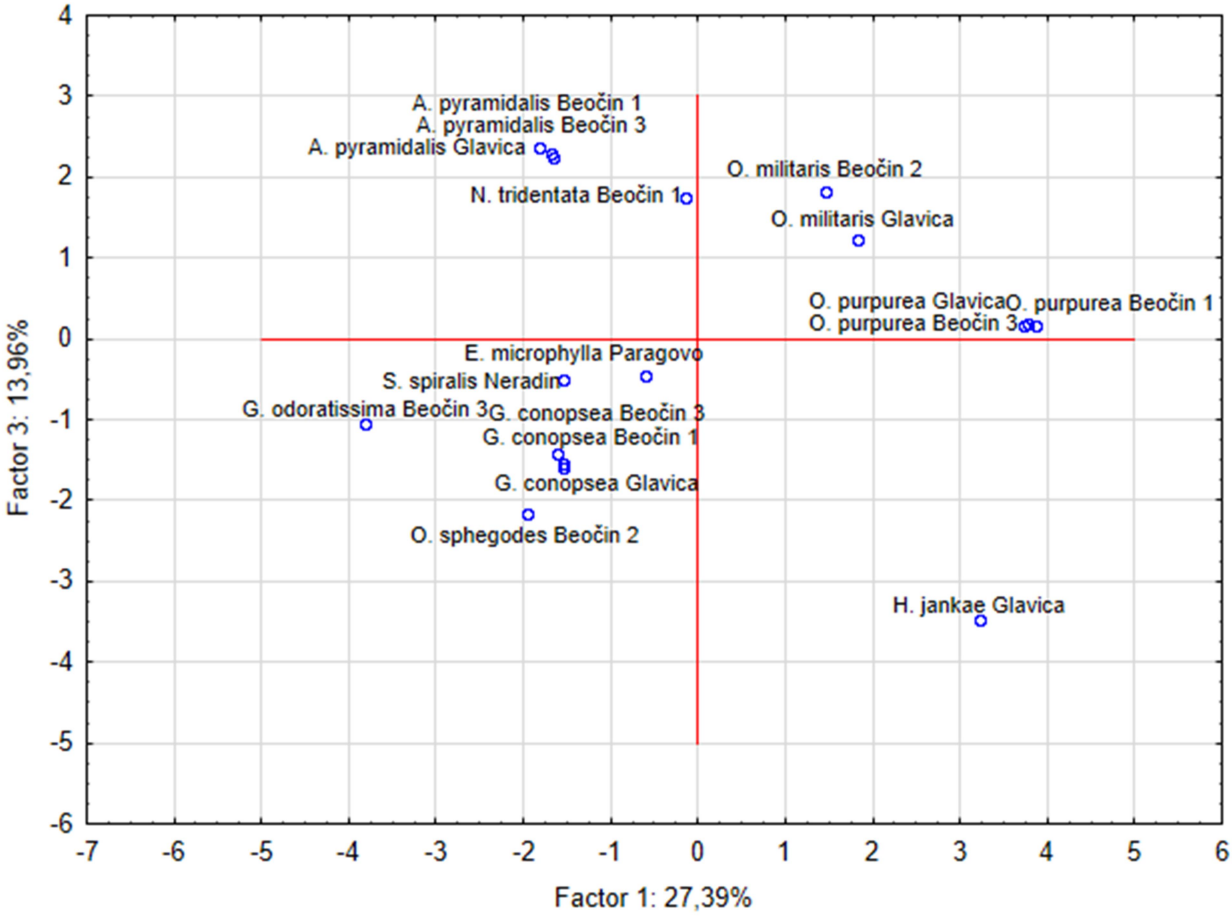
pyramidalis али знатно ближа нултом подеоку у-осе, док се популација врсте *S. spiralis* издвојила од осталих у засебну групу. Веома блиско груписање утврђено анализом главних компонената варијације показала је да локалитет нема значаја, односно да су исте врсте варирале на исти начин без обзира на локалитет на ком су узорковане.



Графикон 2. Анализа главних компоненти прва два фактора који објашњавају 49,39% варијабилности

Графикон формиран на основу прве и треће компоненте (Графикон 3) приказује да је генерално груписање извршено на исти начин као и на графикону који је састављен од прве две компоненте. Популације родова *Orchis* и *Himantoglossum* су гуписане са десне стране док су популације родова *Anacamptis*, *Neotinea*, *Gymnadenia*, *Ophrys*, *Epipactis* и *Spiranthes* груписане са леве стране графикона. Међутим, дошло је до удаљавања популација унутар рода *Orchis*, док се популација *S. spiralis* више не издваја од осталих група. Популација врсте *N. tridentata* се удаљила од нултог подеока у-осе и групише се са популацијама врсте *A. pyramidalis.* Као и код првог начина

посматрања, врсте варирају на исти начин без обзира на локалитет, што се осликава у веома блиским позицијама на графикону.



Графикон 3. Анализа главних компоненти за први и трећи фактор који објашњавају 41,35% варијабилности

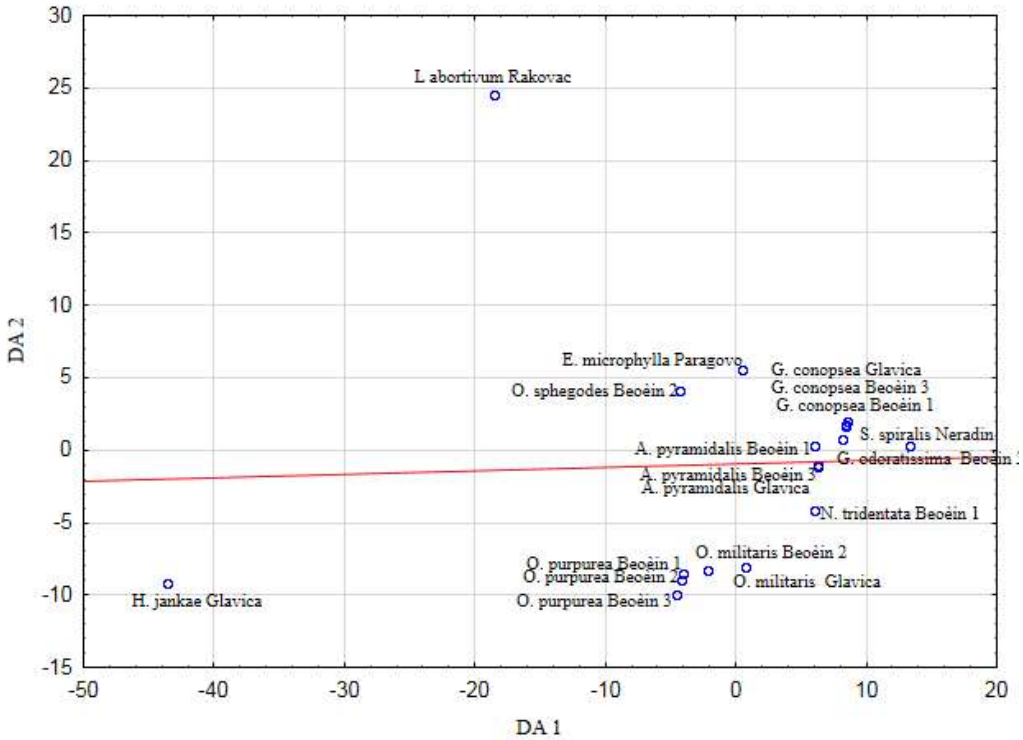
6.1.2.1.2. Мултивариациона дискриминантна анализа квантитативних морфолошких карактеристика

Мултивариационом дискриминантном анализом утврђене су разлике између испитиваних популација, као и класификација категорија зависних варијабли на основу утврђених разлика. Као најважније категорије истичу се резултати који представљају морфометријске особине генеративних органа, односно цвета, од којих највећи значај има висина цвета за прву компоненту и ширина цвета за другу компоненту (Табела 11). Дијаграм канонских вредности приказује груписање популација на основу карактера који су показали највећи значај (Графикон 4). Графикон приказује да популације из рода *Orchis* чине хомогену групу која се груписала око нултог подеока x- осе. Врсте из родова *Anacamptis*, *Gymnadenia*, *Neotinea* и *Spiranthes* су се груписале око десетог

подеока x-осе, али око нултог подеока y-осе што указује на сличности ових популација за другу компоненту. Популације врста *L. abortivum* и *H. jankae* су показале велику хетерогеност и високо варирање својстава што их чини удаљеним од свих група.

Табела 11. Мултивариациона дискриминантна анализа квантитативних морфолошких карактеристика

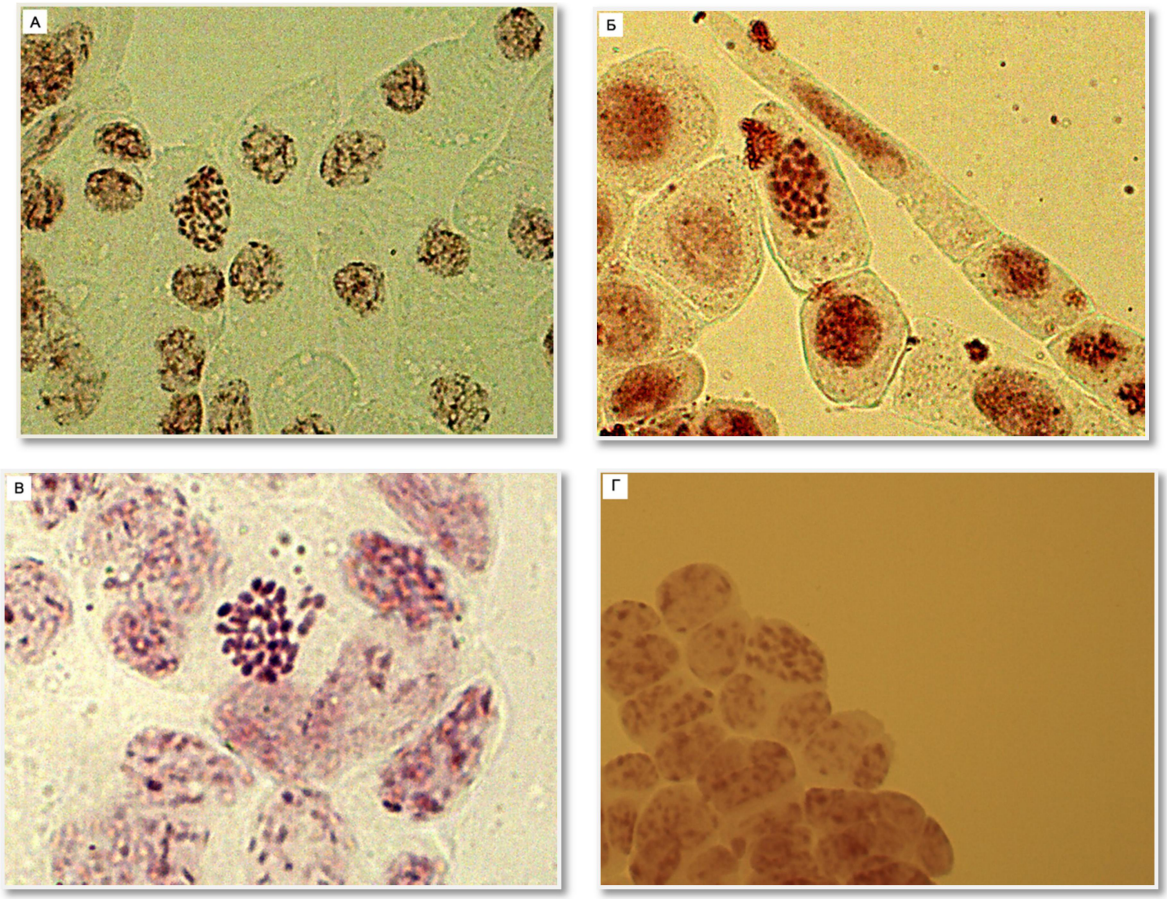
	МДА 1	МДА 2	МДА 3
Висина биљке (cm)	0,0524	0,06056	-0,16001
Дужина цвасти (cm)	-0,2504	-0,26557	-0,25834
Дужина листа (cm)	0,2047	0,22266	-0,22158
Ширина листа (cm)	-0,2545	0,64442	0,62960
Висина цвета (mm)	-0,7383*	0,26875	0,04536
Број цветова	0,4678	0,10477	-0,49150
Ширина цвета (mm)	-0,0361	-0,75895*	0,37409
Лабелум: ширина (mm)	0,0988	0,01895	0,54734
Лабелум: дужина (mm)	-0,5357	-0,12208	-0,23182
Својствена вредност	**204,2389**	**69,41847**	**23,53026**
Кумулативна пропорција	**0,6087**	**0,81562**	**0,88575**

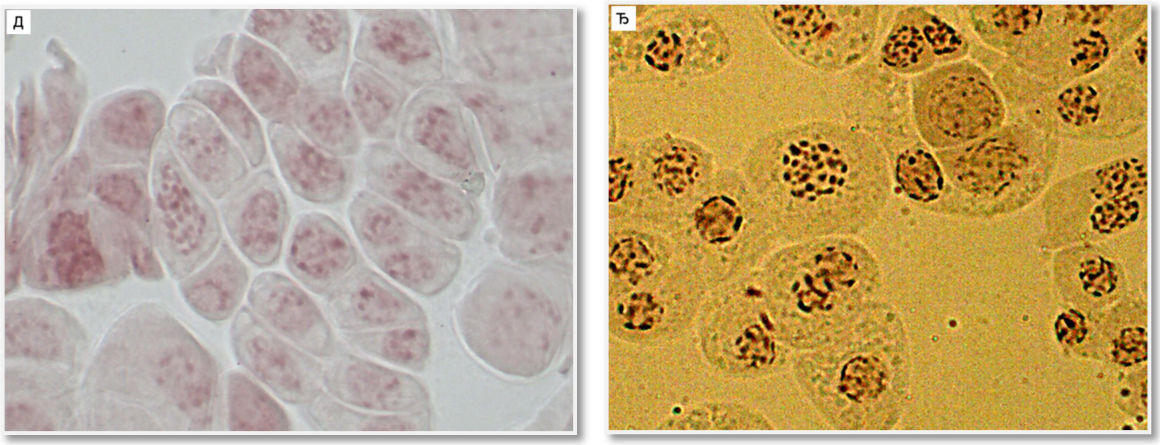


Графикон 4. Дијаграм канонских вредности дискриминантне анализе испитиваних врста

6.1.2.2. Цитолошка карактеризација испитиваних врста

Број хромозома утврђен је из укупно 12 популација терестричних орхидеја које расту на подручју Фрушке горе: по једна популација од *O.mascula*, *C. longifolia*, *L. abortivum, O. sphegodes , G.odoratissima, N.ustulata,* док је код врста *A.pyramudalis* и *G. conopsea* утврђен број хромозома из 3 популације (Табела 12). Одређивање броја хромозома у оквиру врста *O. purpurea*, *O. militaris*, *E. microphylla* и *P. bifolia* упркос великом броју понављања није било успешно, те су се за потребе обраде података користили литературни наводи (Nilsson, 1983; Kamari et al., 1995; D'emerico et al., 1999). Број хромозома код испитиваних врста кретао се од 24 до 42. Најмањи број хромозома установљен је код врсте *C. longifolia* (2n=2x=32) док је код врсте *L. abortivum* утврђен хаплоидан број хромозома (n=24). Прате их *A.pyramidalis* и *O. sphegodes* са 2n=2x=36. Врсте *G. conopsea*, *G.odoratissima* и *E. microphylla* карактерише једнак број хромозома (2n=2x=40). Једнак број хомозома (2n=2x=42) установљен је код свих врста које припадају роду *Orchis*, али и код врста *P. bifolia* и *N.ustulata* (Слика 8).





Слика 8. Мејотички хромозоми из плодника цветних пупољака: а) *Anacamptis pyramidalis*; б) *Cephalanthera longifolia*; в) *Gimnadenia conopsea*; г) *Gimnadenia odoratissima*; д) *Limodorum abortivum*; ђ) *Neotinea ustulata*

Величина генома је успешно одређена за 13 врста у оквиру 20 популација. Анализом резултата запажене су разлике у величини генома како између врста, тако и између популација унутар исте врсте. Најмања величина генома установљена је код врста које припадају роду *Gymnadenia* (2C = 10,12 за *G. conopsea* и 2C = 10,38 за *G. odoratissima*). Прате их *O. sphegodes, P. bifolia,* и *N.ustulata* са просечним вредностима од 2C = 16,23 pg за прву, 2C = 17,01 pg за другу и 2C = 18,68 pg за трећу врсту (Табела 12).

Код врста *A. pyramidalis, G. conopsea, O. militaris* и *O. purpurea* је уочено да постоје разлике у величини генома између популација што је потврђено и Данкановим тестом вишеструких интервала (Табела 13). Тако су код врста *G. conopsea, O. militaris* и *O. purpurea* највише вредности установљене код популација са локалитета Главица, док је код врсте *A.pyramidalis* навиша вредност величине генома установљена код популације Беочин 3.

Табела 12. Број хромозома и величине генома 12 популација терестричних орхидеја: PL -ниво плоидности; 2n - број хромозома; 2C – укупна величина генома; 1Cx – величина моноплоидног генома; N – број анализираних индивидуа

Врста	Локалитет	PL	2n	2C у pg и (Mbp)	1Cx у pg и (Mbp)	SD	Min	Max	CV (%)	N
O.mascula	Раковац	2x	42	25,53	12,76	1,15	23,11	28,32	4,51	8
C. longifolia	Раковац	4x	32	30,21	15,11	0,66	28,97	31,01	2,19	5
L. abortivum	Раковац	-	24(n)	38,52	19,26	2,29	36,28	42,16	5,96	3
O. purpurea	Беочин 1		-	32,16	16,08	1,07	30,97	33,57	3,33	6
O. purpurea	Главица		-	35,04	17,52	0,22	34,80	35,24	0,63	3
O. purpurea	Беочин 3		-	33,11	16,56	1,07	31,84	34,40	3,24	4
x̄		2x	42	33,43	16,72	0,79	32,53	34,40	24,51	
O. militaris	Беочин 2		-	33,61	16,81	1,03	32,44	34,56	3,06	3
O. militaris	Главица		-	35,28	17,64	1,80	33,18	38,70	5,12	5
x̄		2x	42	34,45	17,25	1,42	32,81	36,63	4,09	
A.pyramidalis	Беочин 3	2x	36	26,45	13,23	0,50	25,58	27,30	1,88	5
A.pyramidalis	Главица	2x	36	25,85	12,92	0,36	25,43	26,44	1,41	4
A.pyramidalis	Беочин 1	2x	36	22,75	11,38	1,22	19,18	23,92	5,35	4
x̄		2x	36	25,01	12,51	0,69	23,39	25,88	2,88	
G. conopsea	Главица	2x	40	10,72	5,36	0,57	9,90	12,20	5,37	5
G. conopsea	Беочин 1	2x	40	10,20	5,10	0,87	8,82	11,43	8,54	5
G. conosea	Беочин 3	2x	40	9,45	4,73	0,66	8,25	10,47	7,01	5
x̄		2x	40	10,12	5,06	0,60	8,99	11,37	6,97	
G.odoratussima	Беочин 3	2x	40	10,38	5,19	0,79	8,60	11,43	7,64	5
O. sphegodes	Беочин 2	2x	36	16,23	8,12	0,33	15,68	16,83	2,03	5
E. microphylla	Парагово	2x	40	25,43	12,71	0,83	23,88	27,04	3,29	4
N.ustulata	Беочин 1	2x	42	18,68	9,34	0,58	18,10	19,71	3,11	5
P.bifolia	Раковац	2x	42	17,01	8,50	1,04	15,93	18,02	6,13	1
S. spiralis	Нерадин	-	30	18,50	9,25	0,29	18,02	19,06	1,57	5

Табела 13. Разлике у величини генома појединих врста на различитим локалитетима

Локалитет	*A.pyramidalis*	*G. conopsea*	*O. militaris*	*O. purpurea*
Беочин 1	22,75[б]	10,20[а]	-	32,16[б]
Беочин 2	-	-	33,61[б]	-
Беочин 3	**26,45[а]**	9,45[б]	-	33,11[б]
Главица	25,85[а]	**10,72[а]**	**35,28[а]**	**35,04[а]**

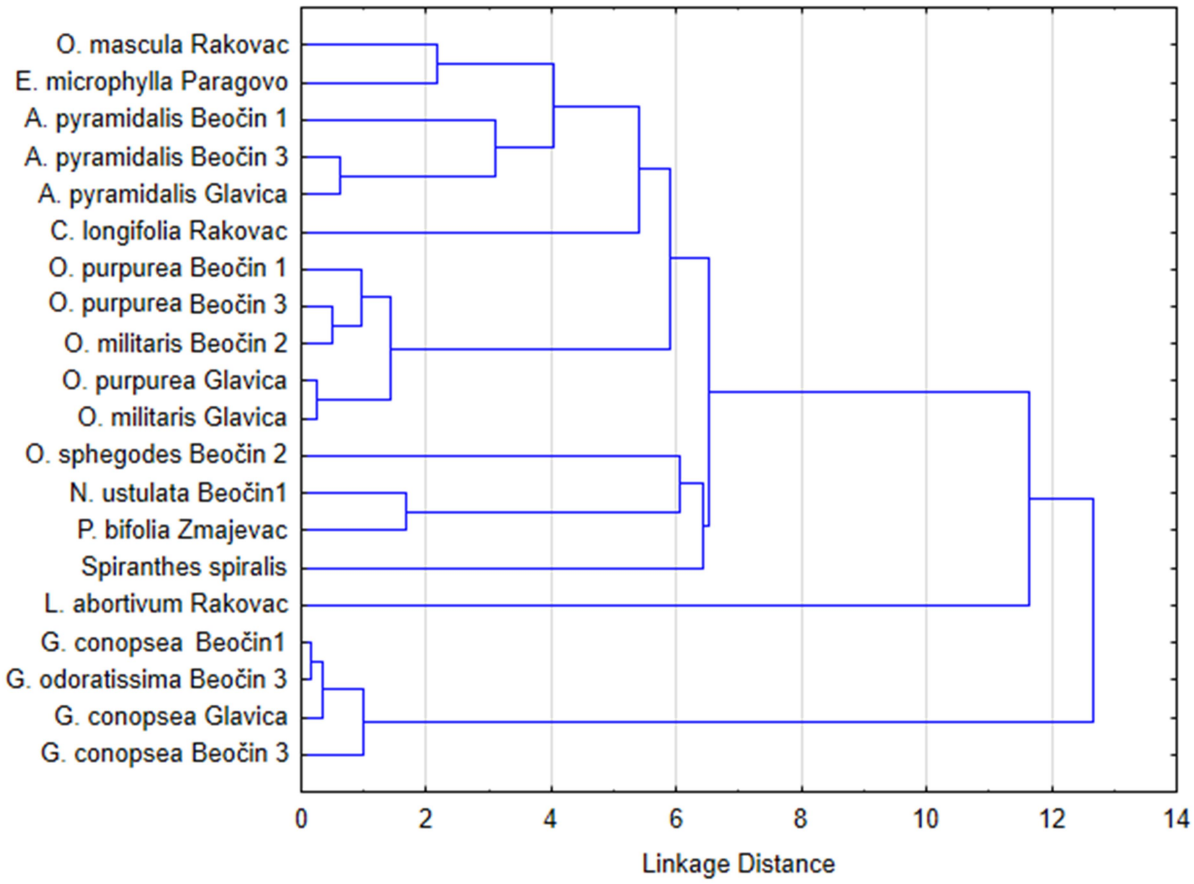
6.1.2.2.1. Мултивариациона кластер анализа цитолошких особина

Кластер анализом добијеном на основу анализираних цитолошких особина дошло је до груписања врста на највишем хијерархијском нивоу у два велика кластера (Графикон 5).

Први кластер чине уско повезане врсте из рода *Gymnadenia* за које је установљено да имају најмању величину генома (*G. conopsea* Беочин 1, G. *odoratissima* Беочин 3, *G. conopsea* Главица и *G. conopsea* Беочин 3) док је други кластер подељен на већи број субкластера.

У другом кластеру, сасвим издвојено од осталих је позиционирана врста *L. abortivum* која се истиче као врста са највећом величином генома, док су остале врсте позициониране у 3 већа субкластера. Први субкластер чине врсте *O. mascula* (Раковац), *E. microphylla* (Парагово), све популације *A. pyramidalis* и *C. longifolia* (Раковац), други кластер чине врсте из популација *O. militaris* и *O. purpurea,* док се ређи субкластер састоји од врста *O. sphegodes* (Беочин 2), *N. ustulata* (Беочин 1), *P. bifolia* (Змајевац) и *S. spiralis* (Нерадин).

Према спроведеној кластер анализи најближе постављене популације су *G. conopsea* (Беочин 1) и *G. odoratissima* (Беочин 3), затим популације врста *O. purpurea* и *O. militaris* које се налазе на локалитету Главица, *O. purpurea* Беочин 3 и *O. militaris* Беочин 2 и *A. pyramidalis* Беочин 3 и Главица.



Графикон 5. Цитолошка удаљеност испитиваних врста терестричних орхидеја на основу мултиваријационе кластер анализе

6.2. Анализа едафских особина станишта

У циљу сагледавања едафских карактеристика станишта терестричних орхидеја, приступило се анализирању геолошке подлоге као и испитивању педолошког састава, односно физичких и хемијских особина земљишта.

6.2.1. Геолошке карактеристике обрађених локалитета

Дигитализована геолошка карта (Слика 9) приказује да централним делом Фрушке горе доминирају метаморфне, магматске и седиментне стене мезозојске старости, односно да припадају различитим стадијумима развоја Тетиског океана (пре око 250-300 милиона година). Северне обронке планине, дуж којих се простиру локалитети Беочин 1, Беочин 2, Беочин 3, Главица и Парагово, чине млађе седиментне стене које су таложене у Панонском мору и углавном су представљене стенама у чијој грађи у великом проценту учествују карбонати. Сличне стене откривене су и на јужним падинама планине, али се њихов развој може пратити најчешће у долинама потока који пресецају овај део Фрушке горе.

Геолошку подлогу тла у околини локалитета Беочин 1, Беочин 2 и Главица, коју настањују готово исте врсте терестричних орхидеја, чине лапорци који су таложени у време панона, пре око 10 милиона година. Лапорци су седиментне стене изграђене од ситних честица глине и калцијум-карбоната. Проценат калцијум-карбоната у лапорцима варира од 25 – 75 %, а на конкретном локалитету забележен је веома висок проценат карбоната који достиже максималну вредност. Боја лапораца у околини локалитета Беочин 1 и Беочин 2 је светло сива до беличаста, што говори о високом проценту карбоната и о готово занемарљивој количини органске супстанце. Боја лапорца на локалитету Главица је сиво-жута до светло сива, што говори о високом проценту карбоната али и о минималним примесама минерала гвожђа, док одсуство тамнијих нијанси такође говори о готово занемарљивој количини органске супстанце. Локалитет Беочин 3, који настањују исте врсте као на претходна три локалитета, се налази на граници геолошке подлоге лапорци и сарматски седименти. Литолошки, ови седименти су представљени ритмичном сменом лапораца, лапоровитих глина, глина и ређе танким слојевима карбонатног пешчара. За овај локалитет је карактеристична и појава шарених тракастих лапоровитих глина, које означавају веома правилну

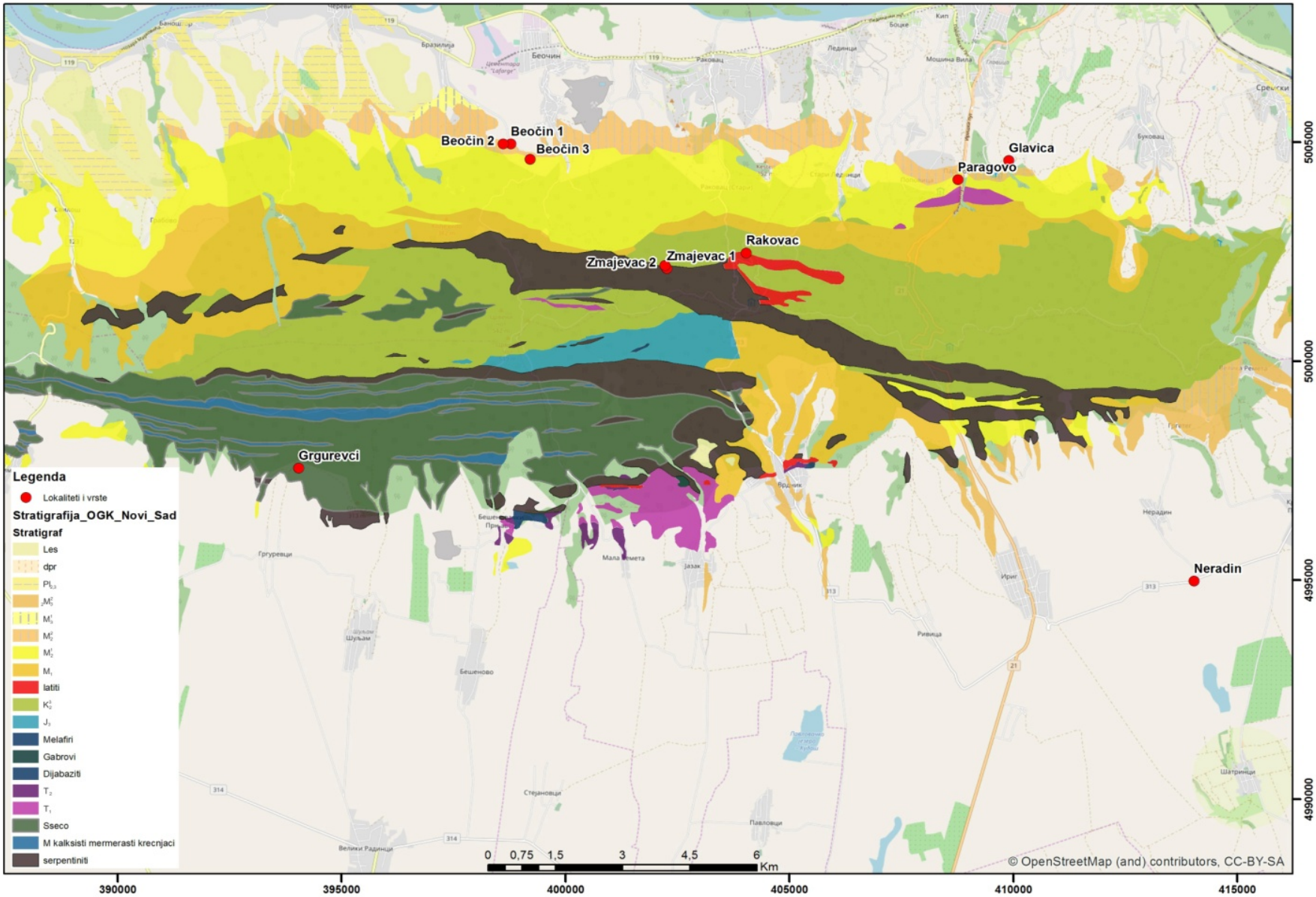
ритмичност у таложењу. Распадањем ових стена издваја се висока концентрација карбоната и мање концентрације гвожђа, калијума и силицијума.

У геологији терена у широј околини села Гргуревци доминира метаморфни комплекс тријаса. Најчешће се срећу кварцити и калшисти. Кварц је основни минерал који гради ове стене па се њиховим разлагањем ослобађају високе концентрације силицијума, док су карбонати присутни веома ретко. Испод локалитета Нерадин налазе се квартарни седименти који у себи носе веома широку лепезу минерала.

Локалитет Змајевац лоциран је изнад серпентинита. Серпентинити су стене светлозелене до тамнозелене боје. Граде их серпентински минерали – хризотил, антигорит, хризотил-азбест, магнетит, хромит, актинолит, талк, као и реликти пироксена и оливина. Настају процесом постмагматске метаморфозе, односно серпентинизације перидотита. Распадањем ових стена издвајају се магнезијум, силицијум, калцит, хлорит и други.

Геолошку подлогу околине локалитета Раковац чине вулканске стене латити. На основу мерења апсолутне старости утврђено је да су ове магматске стене последица вулканске активности која се одвијала пре око 38 милиона година, односно, у време горњег еоцена. Изграђене су од фенокристала оливина, аугита и лабрадора, који се налазе у стакластој маси. Састоји се од плагиокласа, калијског фелдспата, аугита, биотита, апатита и рудних минерала. Током природног разлагања латита ослобађају се гвожђе, калијум, алуминијум, магнезијум силицијум и други елементи.

Шира околина Парагова је веома тектонизована тако да се на веома малом простору налазе кречњаци тријаса, пешчари и глинци доњег миоцена и песковити кречњаци бадена. Испод тла на којем се налази локалитет са орхидејама налазе се песковити жућкасти кречњаци бадена, стари око 14 милиона година. Разлагањем ових кречњака издваја се висока концентрација карбоната, а далеко су ређе присутни кварц и минерали гвожђа.

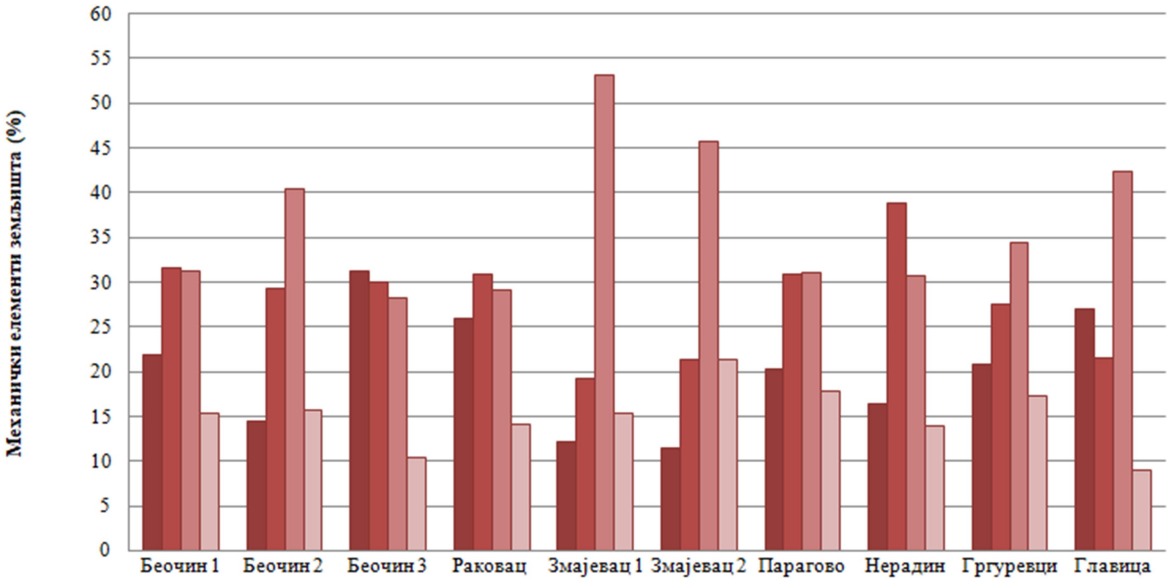


Слика 9. Дигитализована геолошка карта

6.2.2. Педолошка анализа станишта

6.2.2.1.Физичке особине земљишта

Испитивање физичких особина земљишта обухватило је одређивање механичког састава земљишта. Анализом резултата утврђено је да је код скоро свих испитиваних узорака, изузев земљишта узоркованог са локалитета Беочин 3 и Главица, фракција крупног песка мање застуљена од фракција ситног песка (Графикон 6). Највиши садржај крупног песка евидетниран је у земљишту узоркованом са локалитета Беочин 3 и Главица (31,6% и 27,9%), док су најмањи садржај крупног песка имала земљишта са локалитета Змајевац 1 и Змајевац 2 (12,2% и 11,5%). Највиши садржај ситног песка имала су земљишта узоркована са локалитета Нерадин (38,86%), док је највиши садржај праха евидентиран код земљишта са локалитета Змајевац 1 и Змајевац 2 (53,2% и 45,8%). Садржај глине код испитиваних узорака се кретао од 9% (Главица) до 21,4% (Змајевац 2).



	Беочин 1	Беочин 2	Беочин 3	Раковац	Змајевац 1	Змајевац 2	Парагово	Нерадин	Гргуревци	Главица
КП (%)	21,8	14,5	31,16	25,9	12,2	11,5	20,3	16,49	20,79	27,09
СП (%)	31,6	29,3	30,03	30,86	19,2	21,3	30,85	38,86	27,57	21,5
Прах (%)	31,23	40,4	28,33	29,2	53,2	45,8	31,05	30,7	34,37	42,41
Глина (%)	15,35	15,76	10,48	14,04	15,4	21,4	17,8	13,95	17,27	9

Графикон 6. Присутност механичких елемената у земљишту (%)

Према садржају појединих фракција механичких честица, испитивана земљишта се карактеришу прилично уједначеним механичким саставом и спадају у групу иловаче, глиновите иловаче и прашкасте глиновите иловаче (Графикон 7). Од 10 локалитета, земљиште узорковано са локалитета Беочин 1, Беочин 3, Раковац,

Нерадин и Главица спада у класу иловача, затим, земљиште узорковано са локалитета Беочин 2, Парагово и Гргуревци спада у класу глиновита иловача, док се земљиште узорковано са локалитета Змајевац 1 и Змајевац 2, који се налазе један у близини другог, карактеришу као прашкаста глиновита иловача.

Графикон 7. Карактеризација земљишта према механичком саставу

6.2.2.2. Хемијска својства земљишта

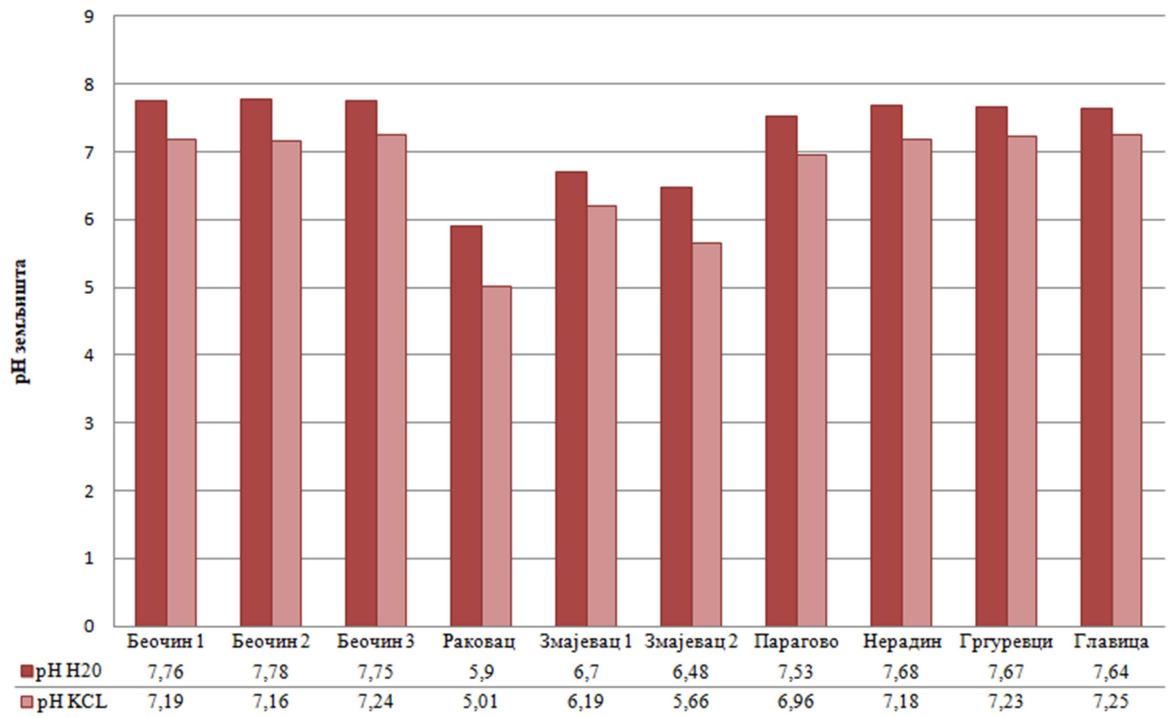
Одређивањем хемијских својстава земљишта добијена је прецизна слика о типу земљишта које настањују терестричне орхидеје на подручју Фрушке горе.

Хемијска реакције земљишта представља једну од најважнијих карактеристика течне фазе земљишта. Приказани резултати указују на разлику реакције земљишта између локалитета које је прекривено шумском вегетацијом и локалитета које настањују ливадске врсте. Иако су се вредности pH реакције земљишта кретале од 5,9 до 7,78 (измерено у H_2O), односно од 5,01 до 7,25 (измерено у KCL), код већине испитиваних локалитета утврђена је благо алкална реакција земљишног раствора, док је код свега 3 локалитета утврђена благо кисела реакција (Графикон 8). Најнижа pH вредност измерена је код земљишта чији се локалитети налазе у шумском појасу и износе 5,01 (Раковац), 5,66 (Змајевац 2) и 6,19 (Змајевац 1). Остали узорци земљишта нису показали велике разлике у pH реакцији, док су највише вредности забележене код узорака са локалитета Главица (pH 7,25) и Беочин 3 (pH 7,24). Такође, приказани резултати указују да садржај $CaCO_3$ варира у доста широким границама. У земљишту

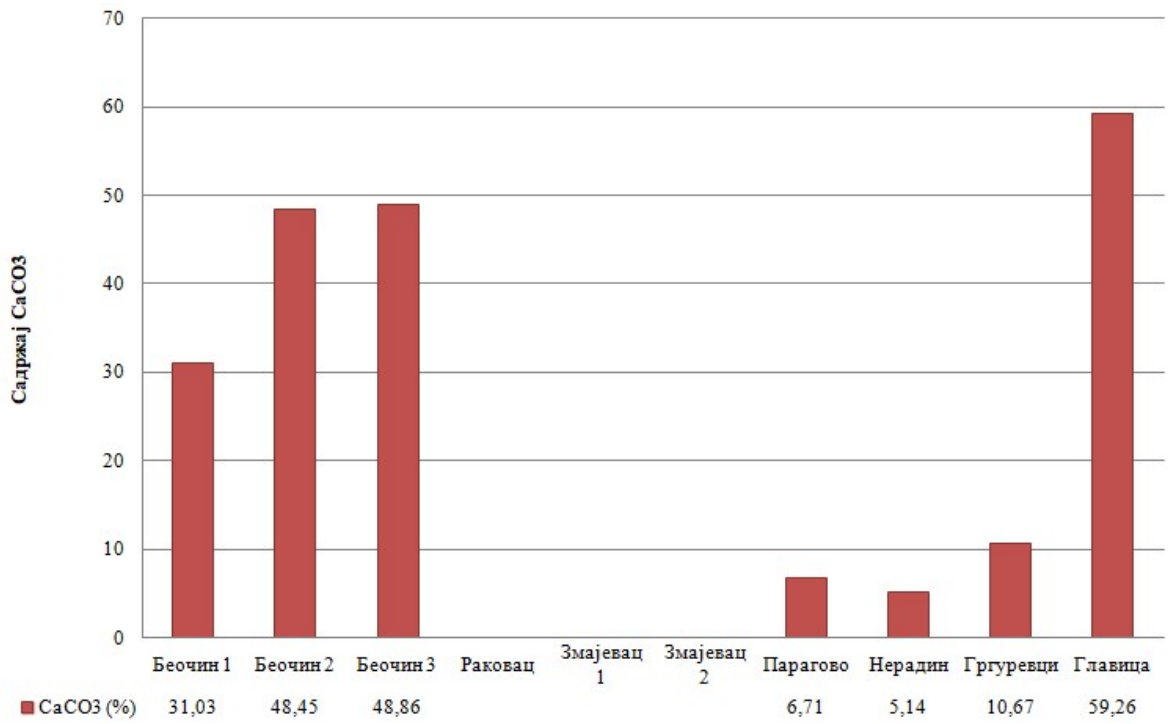
које је узорковано са локалитета Раковац, Змајевац 1 и Змајевац 2 није забележено присуство $CaCO_3$. Са друге стране, земљиште узорковано са локалитета Главица, Беочин 3 и Беочин 2 садржали су највиши проценат карбоната са просечним вредностима 59,26%, 48,86% и 48,45%. (Графикон 9). Имајући у виду да садржај карбоната повољно утиче на pH реакцију земљишта тако што изазива благо алкалну реакцију, добијени резултати се поклапају са резултатима који приказују хемијску реакцију земљишта.

Резултати који приказују садржај органског угљеника и хумуса у земљишту указују да већина узорака спада у групу јако хумозних земљишта (Графикон 10). Изузетак чини земљиште узорковано са локалитета Раковац (3,92%) и 8 (3,87%) које спада у категорију умерено хумозног земљишта. Земљиште узорковано са локалитета Змајевац 1, Гргуревци и Главица истиче се као земљиште са највишим процентом хумуса са средњим вредностима 9,09%, 7,95% и 7,18%. Високи садржај хумуса утиче на добру обезбеђеност земљишта азотом код свих испитиваних узорака, од којих се највише истичу локалитети Змајевац 1, Гргуревци и Главица код којих је израчунат просечан садржај азота 0,45%, 0,36% и 0,35% (Графикон 10).

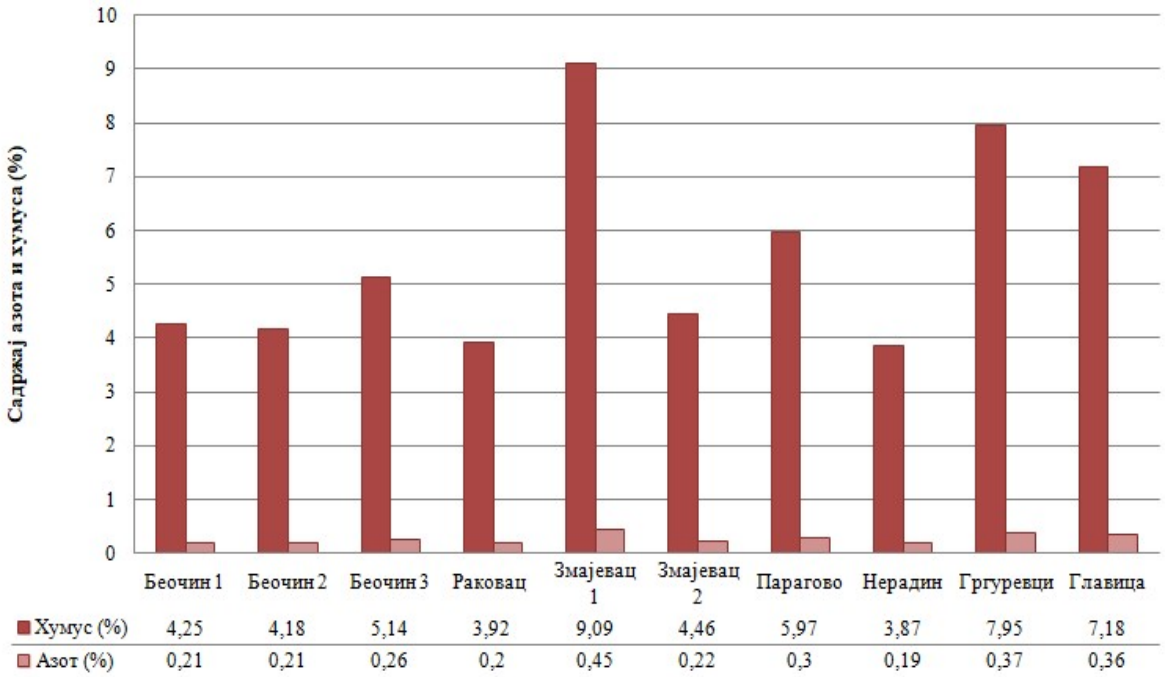
Упоредни приказ садржаја K_2O и P_2O_5 у 100 g земљишта истиче разлике у заступљености ова два елемента. На Графикону 11 може се видети знатно виши садржај лакоприступачног калијума у односу на фосфор. Садржај K_2O кретао се од 11,34 mg $100g^{-1}$ до 25,19 mg 100 g^{-1} земљишта што указује на добру обезбеђеност земљишта лакоприступачним калијумом. Са друге стране, просечне вредности P_2O_5 кретале су се од 1,8 mg $100g^{-1}$ до 6,75 mg $100g^{-1}$, што указује на изузетно ниску обезбеђеност земљишта лакоприступачним фосфором.



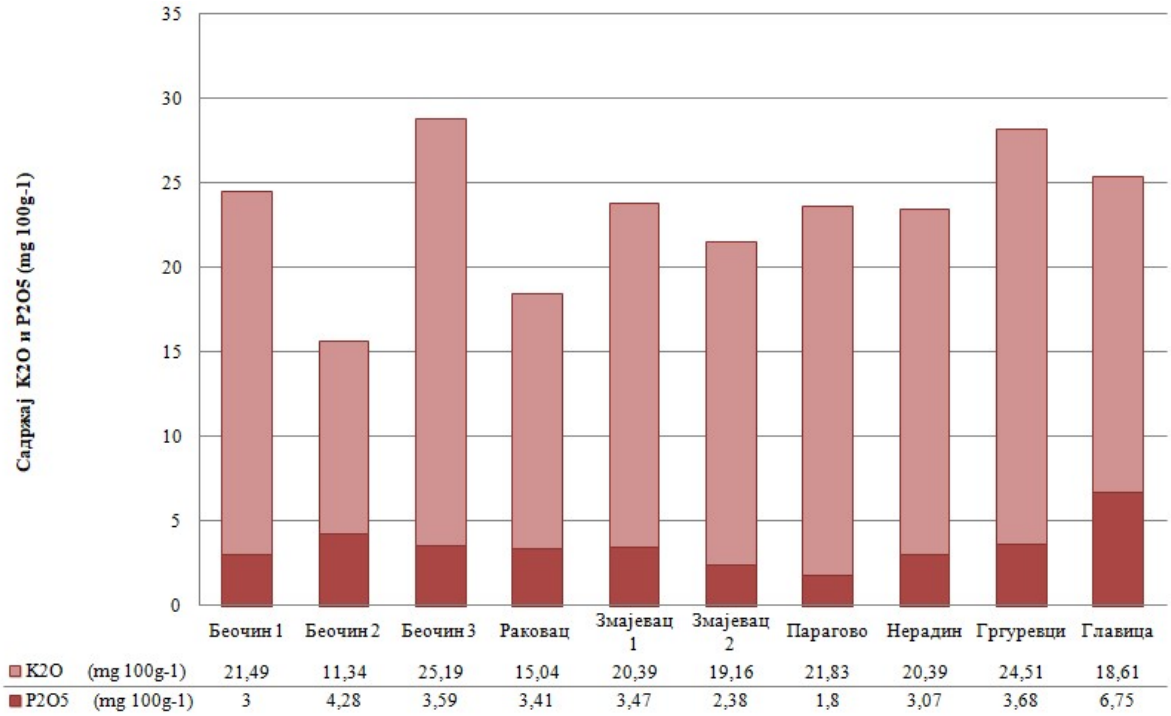
Графикон 8. Вредности активне pH земљишта измерене у H_2O и KCL



Графикон 9. Садржај $CaCO_3$ (%) у земљишту



Графикон 10. Садржај хумуса и азота у земљишту



Графикон 11. Садржај лакоприступачног калијума (K_2O) и фосфора (P_2O_5)

6.3. Асимбиотско клијање семена у *in vitro* условима

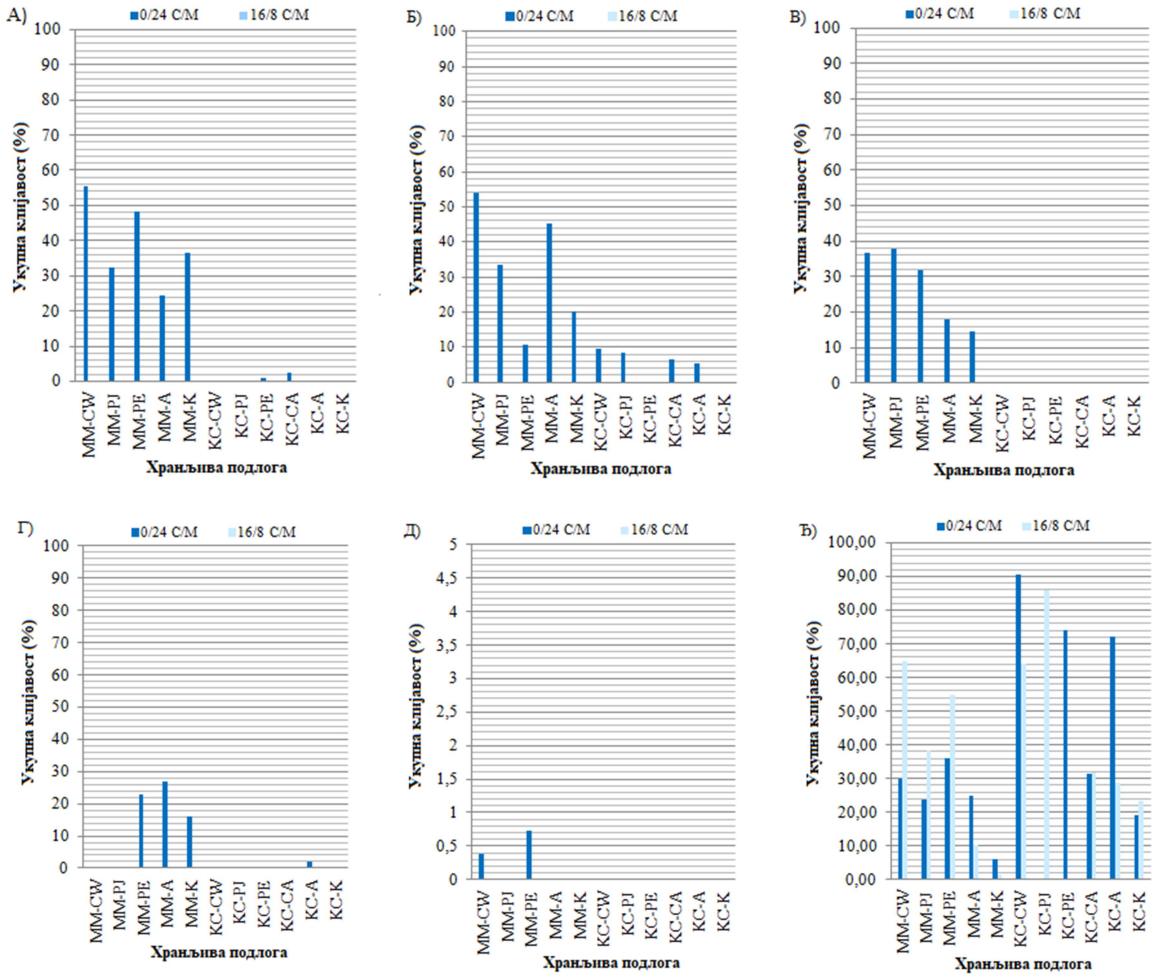
Добијени резултати указују на факторе који имају подстицајно, односно инхибиторно дејство на клијање семена у *in vitro* условима, и који ће даље бити употребљени за стварање протокола њиховог масовног умножавања за потребе конзервације са једне стране, и примене у хортикултури и пејзажној архитектури са друге стране.

Културом недозрелих семена обухваћене су врсте *A. pyramidalis*, *G. conopsea*, *G. odoratissima*, *S. spiralis* и *H. jankae*. Међутим, већина узорака у овој фази је била захваћена инфекцијом услед чега је дошло до великог губитка узорака и недостатка података неопходних за статистичку анализу. Такође, код семена које није било захваћено инфекцијом није дошло до клијања.

Велики део истраживања чиниле су културе зрелих семена чији резултати указују на позитиван утицај ММ хранљиве подлоге и органских адитива на клијање већине испитиваних врста орхидеја. Такође, све врсте, изузев *S. spiralis*, су клијале искључиво у условима пуног мрака, док су услови осветљења 16/8 С/М показали инхибиторно дејство.

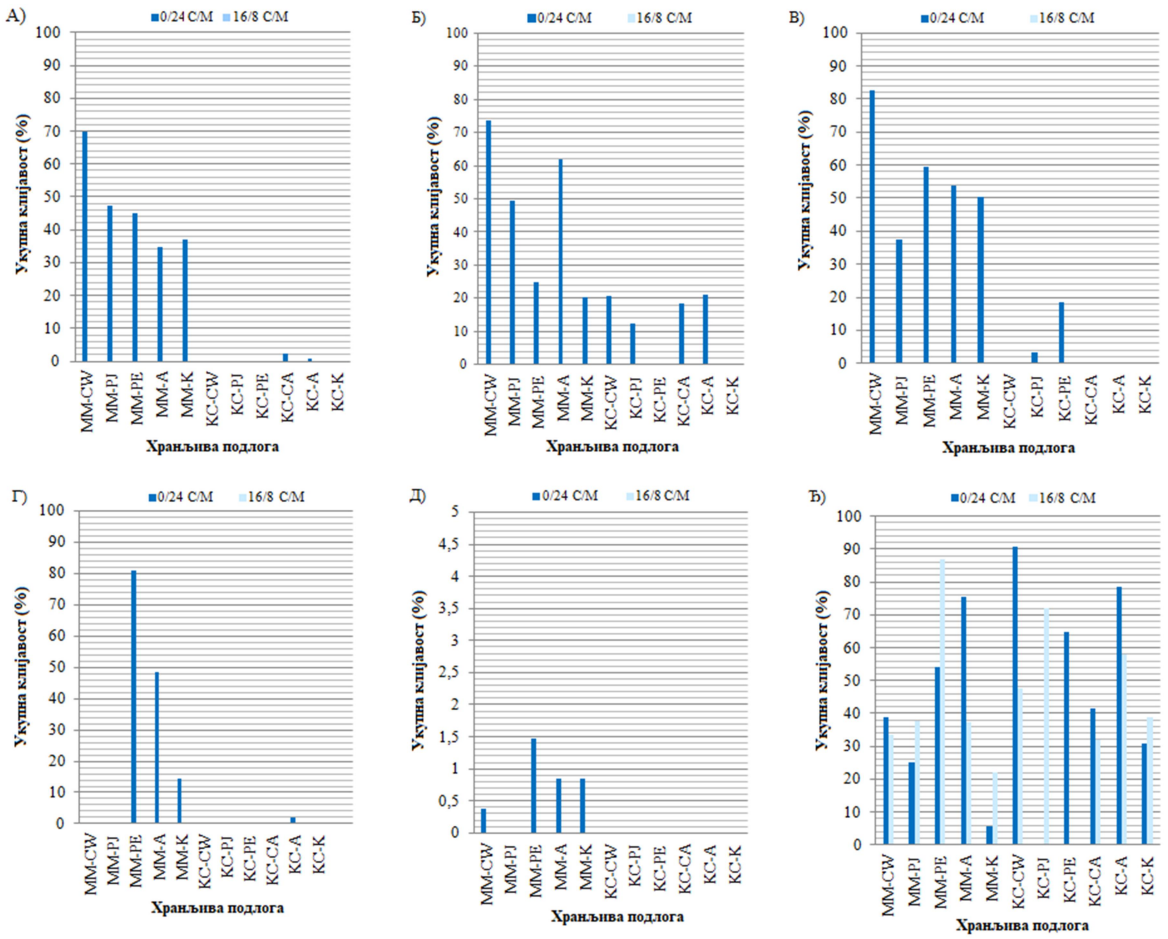
6.3.1. Укупна клијавост семена *in vitro*

Анализом резултата који представљају укупно клијање указују да су врсте *G. conopsea* и *A. pyramidalis* остварили најбољи резултат са 54,03% (Графикон 12 а) и 55,30% (Графикон 12 б) на хранљивој подлози ММ-CW, док је код врсте *O. militaris* забележен изузетно мало проценат клијавости од 0,72% на хранљивој подлози ММ-PE (Графикон 12 д). Код врсте *H. jankae* као најуспешније хранљиве подлоге истичу се ММ-PE и ММ-CW на којима је исклијало 37,70% и 36,63% од укупног броја посејаних семена (Графикон 12 в). Изузетак чини *S. spiralis* код кога је највећа укупна клијавост (90,66%) забележена на КС медијуму обогаћеном са CW (Графикон 12 ђ).



Графикон 12. Укупно клијање добијено 8 недеља након постављања огледа:
а) *A. pyramidalis*; б) *G. conopsea*; в) *H. jankae*; г) *O. sphegodes*; д) *O. militaris;* ђ) *S. spiralis*

Приликом другог мерења највећи проценат укупне клијавости забележен код врста *H. jankae* (87,57%, Графикон 13 в) и *O. sphegodes* (81,03%, Графикон 13 г) које су посејане на MM-CW и MM-PE медијум. Прате их *G. conopsea* и *A. pyramidalis* које су остариле 73,79% (Графикон 13 б) и 69,88% (Графикон 13 а) укупне клијавости на хранљивој подлози MMCW. Врста *O. militaris* није имала значајан напредак у односу на прво мерење те је највећа клијавост постигнута на MM-PE хранљивој подлози и износи 1,47% (Графикон 13 д), док код врста *O. mascula*, *O. scolpax* и *G. odoratissima* није успостављено клијање ни на једној хранљивој подлози. Врста *S. spiralis* је задржала најбољи резултат укупне клијавости (90,88%) на хранљивој подлози KC-CW (Графикон 13 ђ).



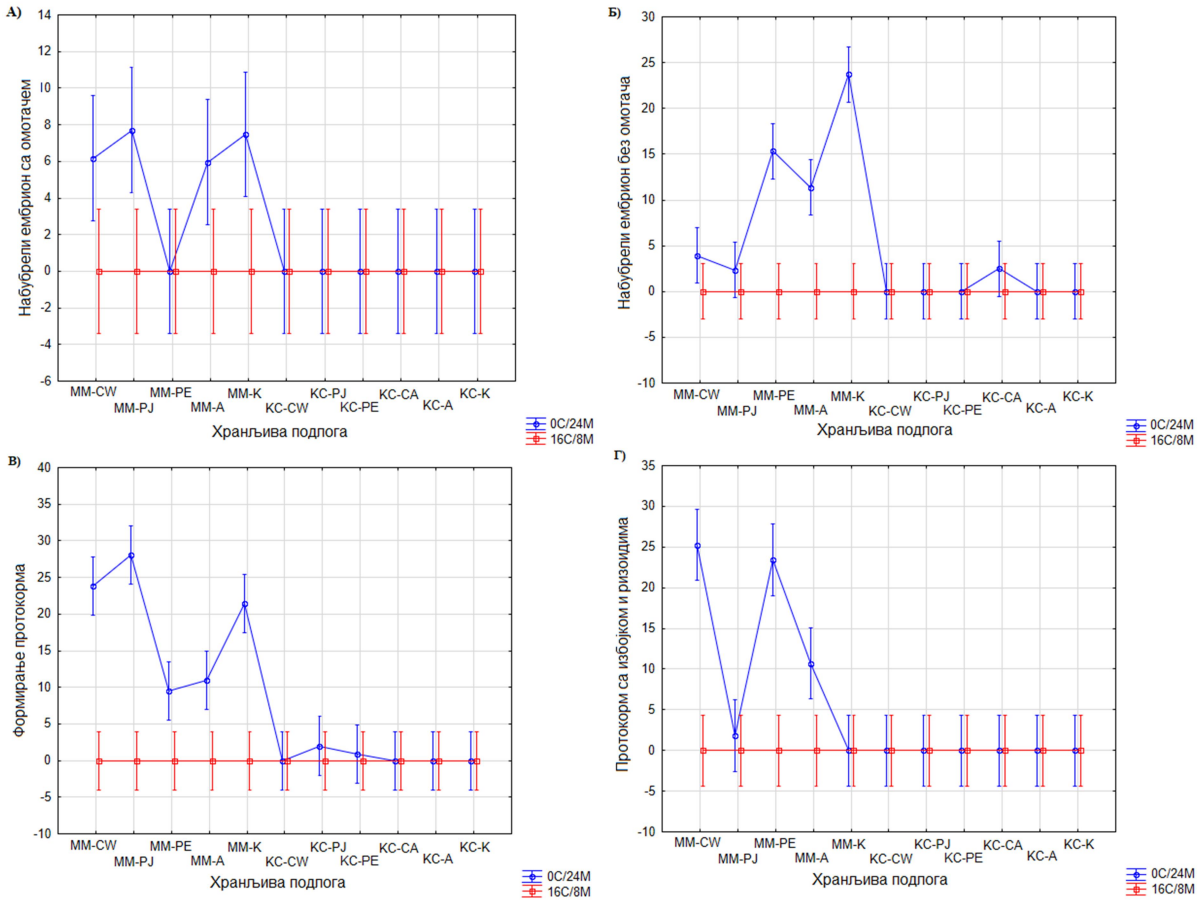
Графикон 13. Укупно клијање добијено 12 недеља након постављања огледа: а) *A. pyramidalis*; б) *G. conopsea*; в) *H. jankae*; г) O. *sphegodes*; д) *O. militaris*; ђ) *S.spiralis*

6.3.2. Клијање семена праћено кроз фазе развоја сејанца

Резултати који приказују степен, односно фазу развоја сејанца, указују на разлику између деловања медијума, суплемената и осветљења на брзину клијања код свих испитиваних врста. Фактор осветљење код свих испитиваних врста бележи позитивне резултате у условима потпуног мрака, док услови 16/8 C/M бележе позитивне резултате једино код врсте *S. spiralis.* Анализа варијансе испитиваних фаза потврђује веома значајне разлике међу испитиваним факторима код свих врста обухваћених овим огледом (Прилог 8-19).

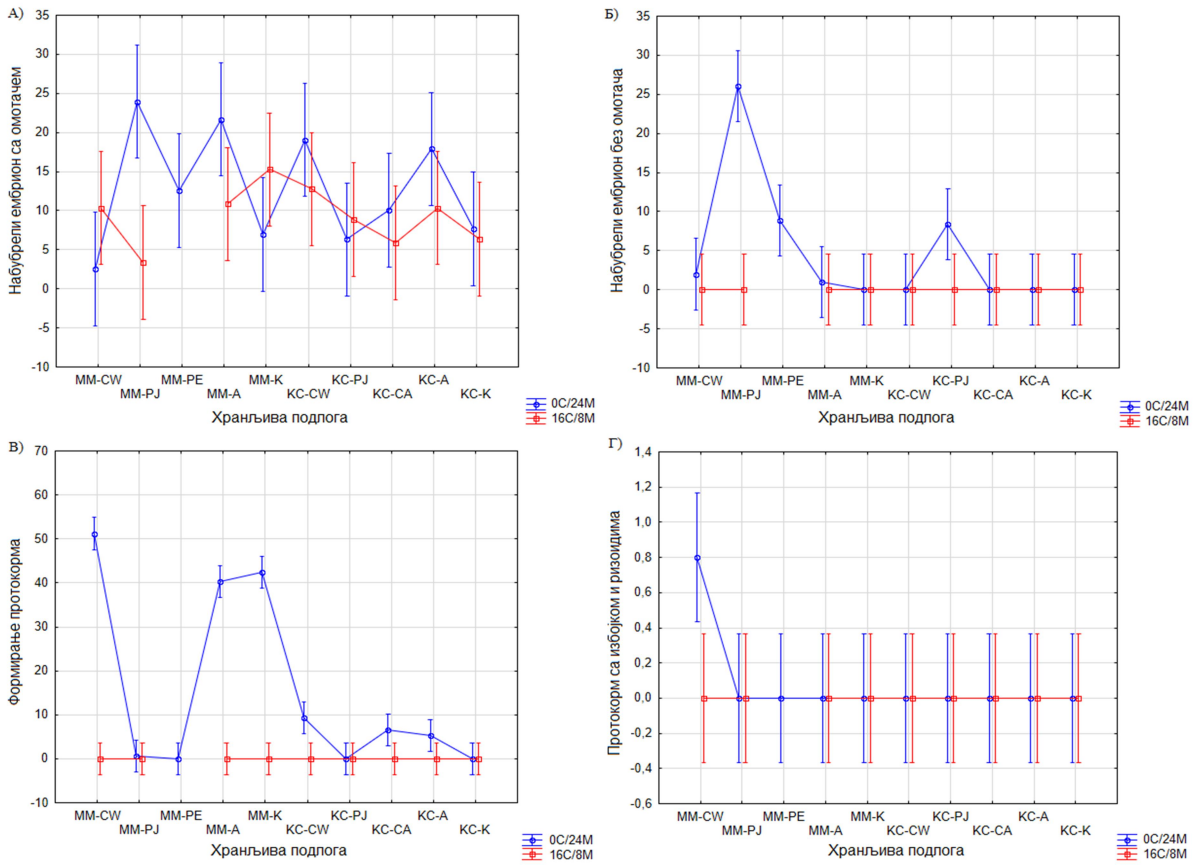
Приликом првог мерења код врсте *A. pyramidalis* уочене су значајне разлике између примењених фактора што је потврђено и Анализом варијансе (Прилог 8). Приказани резултати указују да је клијање семена успостављено само на MM медијуму у условима потпуног мрака и да је најинтензивније формирање протокорма остварено

на хранљивој подлози MM-PJ са 28,08% и MM-CW са 24,48%. Највиши степен развоја, односно формирање протокотма са ризоидима, постигнуто је на MMCW са 25,3% и MM-PE хранљивој подлози са 23,4% . Услови осветљења 16/8 C/M као и KC хранљива подлога нису иницирали клијање семена код ове врсте (Графикон 14)



Графикон 14. Утицај осветљења и хранљиве подлоге на клијање и формирање протокорма врсте *A. pyramidalis*: а) Набубрели ембрион са омотачем; б) Набубрели ембрион без омотача; в) Формирање протокорма; г) Протокорм са пупољчићем и ризоидима

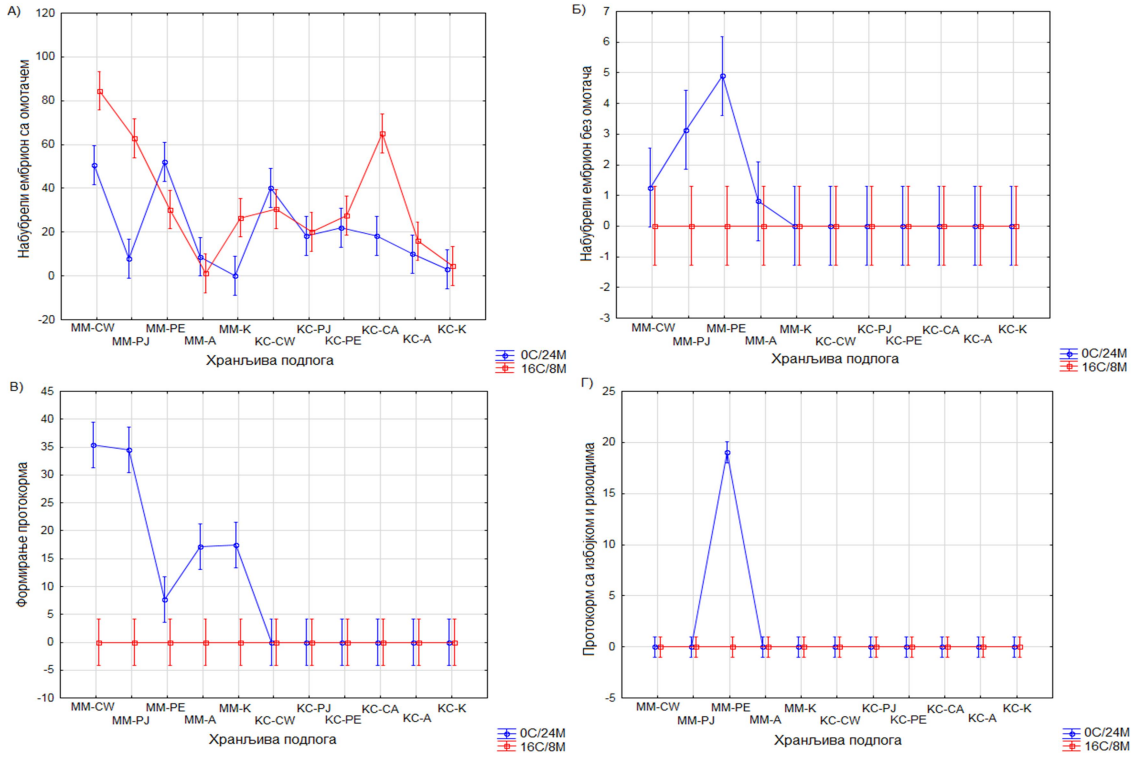
Код врсте *G. conopsea* запажен је позитиван утицај услова оветљења 16/8 C/M на нулту фазу клијања, односно на бубрење ембриона, међутим, у истим условима није настављен даљи развој ембриона, што подразумена пробијање семеног омотача и формирање протокорма (Графикон 15). Са друге стране, услови потпуног мрака су имали позитиван утицај на све фазе клијања у комбијацији са одговрајућом хранљивом подлогом, од којих се највише истичу MM-PJ где је 26,1% ембриона пробило семени омотач, и MM-CW где је 51,20% формирало протокорм и 0,8% формирало протокорм са пупољчићем и ризоидима.



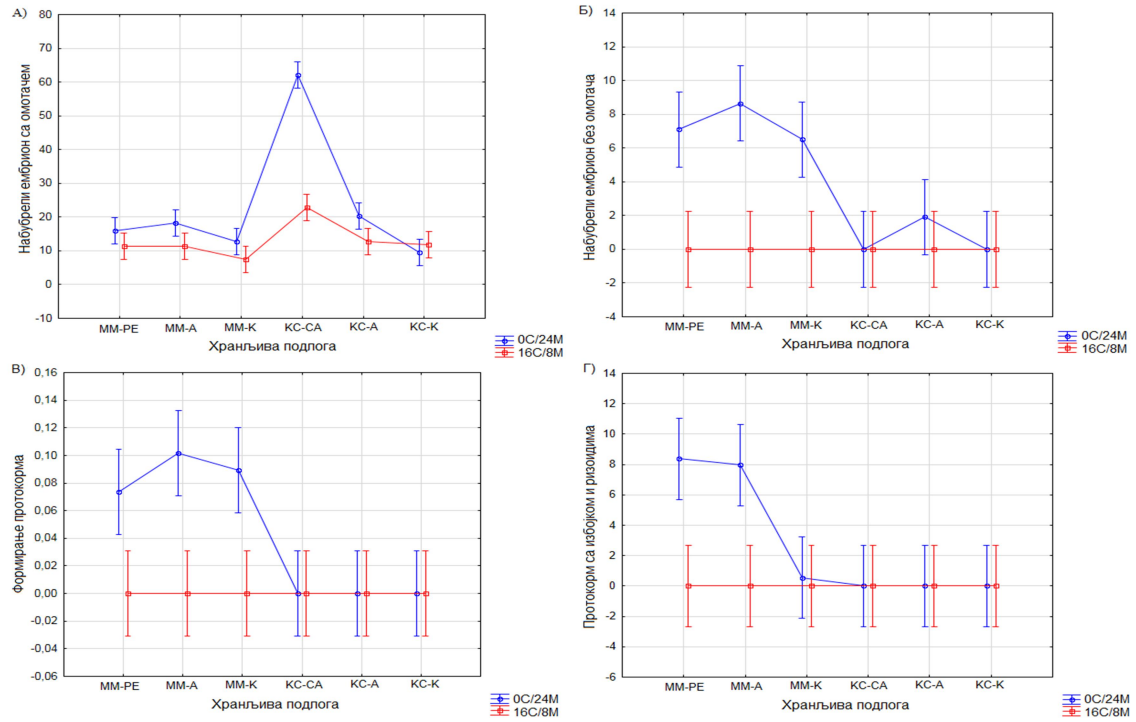
Графикон 15. Утицај осветљења и хранљиве подлоге на клијање и формирање протокорма врсте *G. conopsea*: а) Набубрели ембрион са омотачем; б) Набубрели ембрион без омотача; в) Формирање протокорма; г) Протокорм са пупољчићем и ризоидима

Услови осветљења 16/8 C/M су такође имали позитиван утицај на бубрење ембриона врсте *H. jankae,* међутим, није забележен даљи развој и пробијање семеног омотача у овим условима. У условима потпуног мрака, најинтензивније формирање протокорма добијено је на хранљивој подлози MM-CW са 35,4%, док је највећи проценат формирања протокорма са ризоидима постигнуто на MM-PE хранљивој подлози и износи 19% (Графикон 16).

Код врсте *O. sphegodes* дошло до велике појаве инфекције код хранљивих подлога MM-CW, MM-PJ, KC-CW, KC-PJ, KC-PE и KC-CA које су потом изостављене из огледа. Анализом резултата преосталих медијума утврђено је да је најбољи резултат постигнут на MM-PE хранљивој подлози где је 8,1% семена формирало протокорм са пупољчићем и ризоидима (Графикон 17).

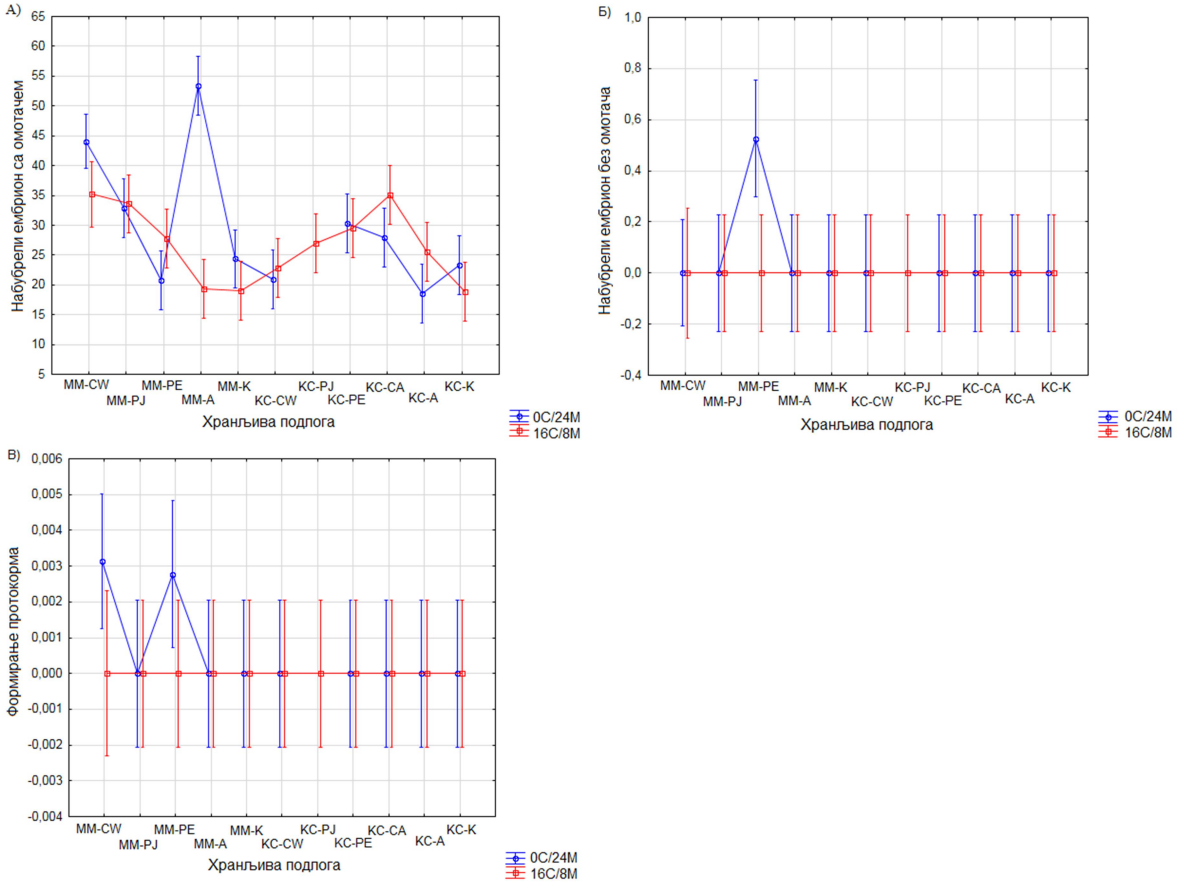


Графикон 16. Утицај осветљења и хранљиве подлоге на клијање и формирање протокорма врсте *H. jankae*: а) Набубрели ембрион са омотачем; б) Набубрели ембрион без омотача; в) Формирање протокорма; г) Протокорм са пупољчићем и ризоидима



Графикон 17. Утицај осветљења и хранљиве подлоге на клијање и формирање протокорма врсте *O. sphegodes*: а) Набубрели ембрион са омотачем; б) Набубрели ембрион без омотача; в) Формирање протокорма; г) Протокорм са пупољчићем и ризоидима

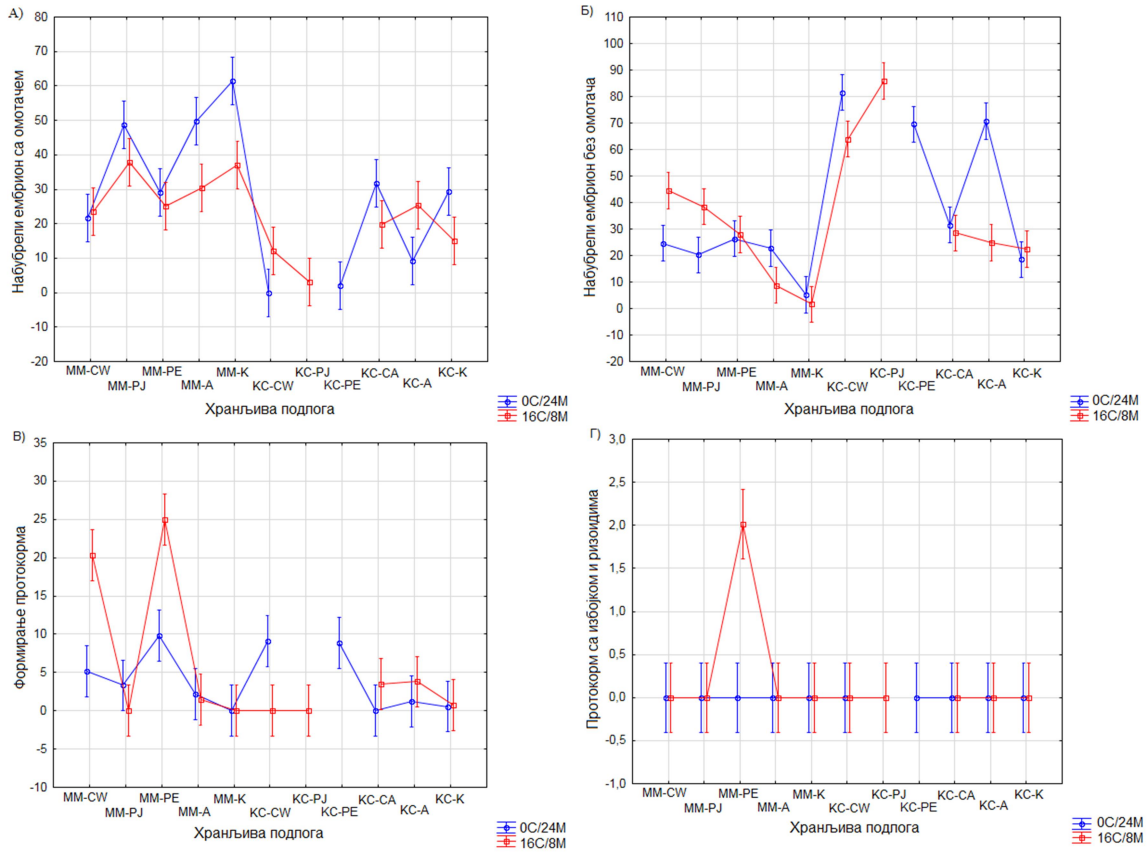
Врста *O. militaris* бележи најслабији резултат укупне клијавости, а самим тим и развој сејанца, где је примећен слаб проценат у свим фазама развоја (Графикон 18). У условима потпуног мрака, бубрење ебриона и пробијање семеног омотача постигнуто је на медијуму MM-PE и износи 0,52%, док је формирање протокорма у изузетно малом проценту забележено на хранљивој подлози MM-CW и MM-PE (0,003% и 0,003%). Фаза развоја Формирање протокорма са ризоидима није евидентирана ни на једној хранљивој подлози.



Графикон 18. Утицај осветљења и хранљиве подлоге на клијање и формирање протокорма врсте *O. militaris*: а) Набубрео ембрион са омотачем; б) Набубрели ембрион без омотача; в) Формирање протокорма

Иако је код врсте *S. spiralis* забележен највећи проценат укупне клијавости у условима потпуног мрака, развој сејанца се знатно брже одвијао у условима 16/8 C/M. У оквиру прве две фазе није забележена статистички значајна разлика утицаја осветљења на фазе развоја сејанца. Међутим, уколико се обрати пажња на даље фазе развоја, примећује се знатно бољи утицај услова 16/8 C/M где је 24,9% формирало

протокорм на хранљивој подлози MM-PE. Такође, једино у овим условима је дошло до формирања протокорма са пупољчићем и ризоидима (2%) (Графикон 19).

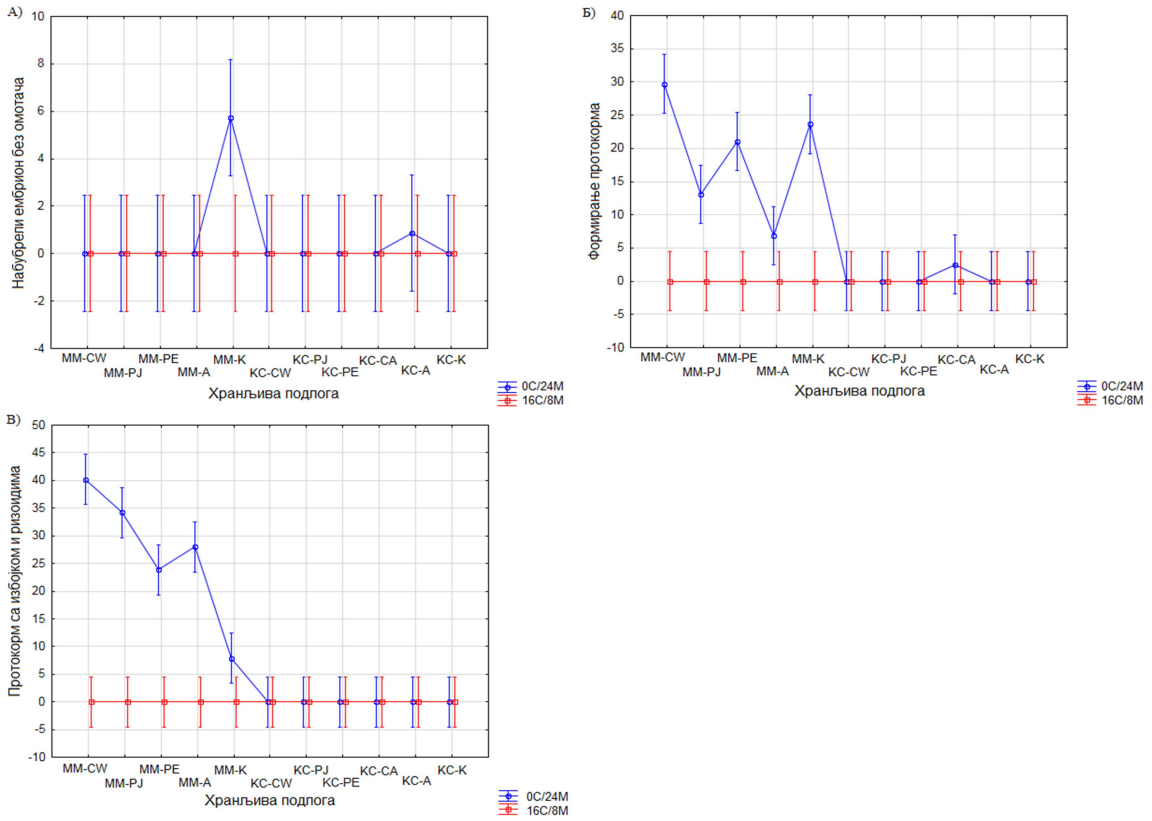


Графикон 19. Утицај осветљења и хранљиве подлоге на клијање и формирање протокорма врсте *S. spiralis*: а) Набубрео ембрион са омотачем; б) Набубрели ембрион без омотача; в) Формирање протокорма; г) Протокорм са пупољчићем и ризоидима

Резултати добијени приликом другог мерења указују на већи степен развоја сејанца код скоро свих испитиваних врста, изузев *O. mascula*, *O. scolpax* и *G. odoratissima* код којих није дошло до клијања семена. Анализом варијансе испитиваних фаза утврђене су веома значајне разлике међу испитиваним факторима код свих испитиваних врста (Прилози 9,11,13,15,17,19).

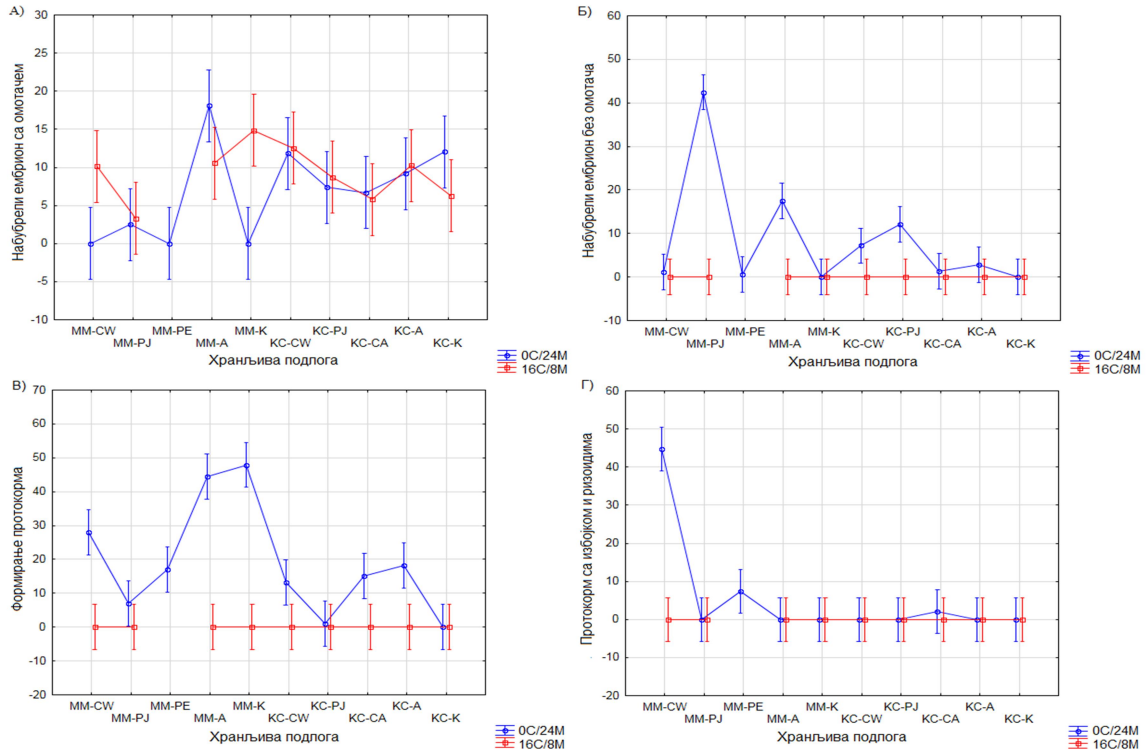
Врста *A. pyramidalis* бележи најбољи резултат на хранљивој подлози MM-CW и у условима потпуног мрака где је 29,72% формирало протокорм, а 40,15% формирало протокорм за ризоидима и пупољчићем (Графикон 20). Истовремено, код ове врсте није забележено присуство семена која су била у првој фази развоја, што указује да су семена, у периоду између два мерења, успешно наставила свој развој и достигла вишу

фазу на хранљивим подлогама које им одговарају, док је са друге стране дошло до потпуног сушења семена на медијуму који не одговара.



Графикон 20. Утицај осветљења и хранљиве подлоге на клијање и формирање протокорма врсте *A. pyramidalis*: а) Набубрели ембрион без омотача; б) Формирање протокорма; в) Протокорм са пупољчићем и ризоидима

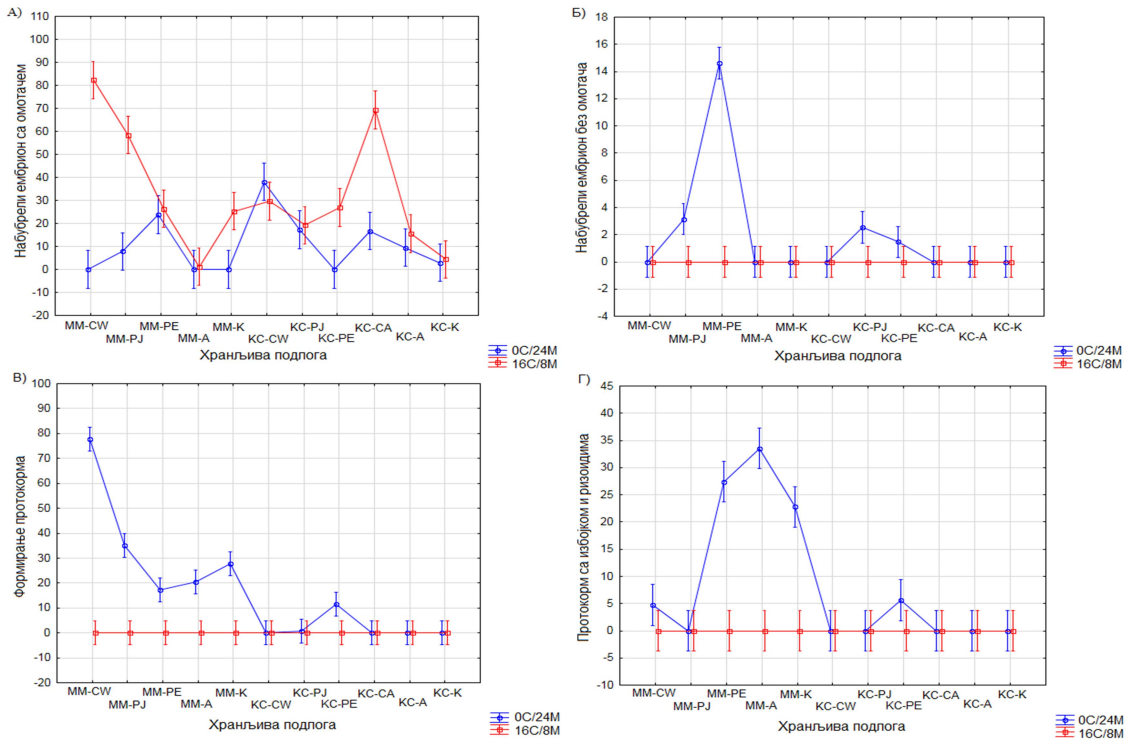
Код врсте *G. conopsea* услови 16/8 C/M имали су позитиван утицај само на нулту фазу развоја, док су услови потпуног мрака позитивно утицали на наставак развоја протокорма. Током другог мерења еавидентиран је мањи проценат формираних протокорма у односу на прво мерење (27,93%), међутим, приметан је знатно већи проценат развијених протокорма са пупољчићем и ризоидима (44,69) на медијуму MM-CW, што указује на позитиван утицај ове хранљиве подлоге на даљи развој сејанца у уловима потпуног мрака. Такође, од свих испитиваних медијума, формирање протокорма са пупољчићем и ризоидима, у оквиру ове врсте, евидентирано је једино још на MM-PE хранљивој подлози и износи 8% (Графикон 21). Анализа варијансе потврђује статистички значајну разлику фактора осветљења и хранљиве подлоге на све фазе развоја (Прилог 11).



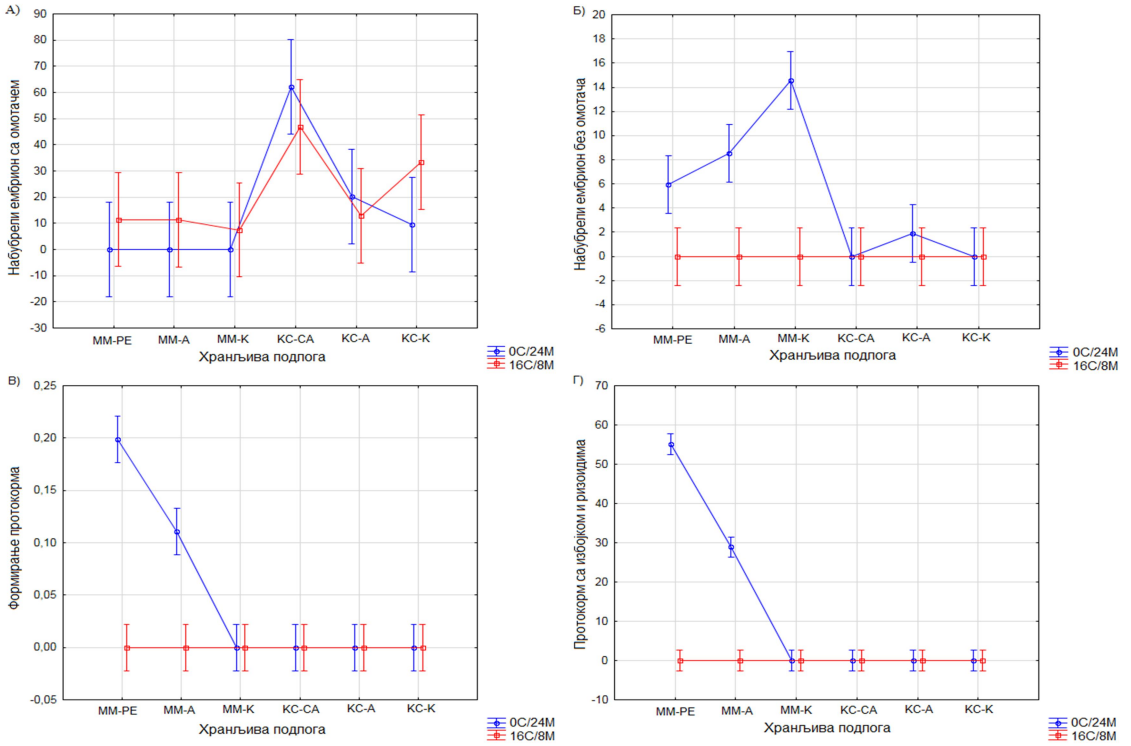
Графикон 21. Утицај осветљења и хранљиве подлоге на клијање и формирање протокорма врсте *G. conopsea*: а) Набубрели ембрион са омотачем; б) Набубрели ембрион без омотача; в) Формирање протокорма; г) Протокорм са пупољчићем и ризоидима

Код врсте *H. jankae* утврђене су статистички значајне разлике међу свим испитиваним факторима, у оквиру свих фаза. Током другог мерења евидентиран је позитиван утицај фактора Осветљење 16/8 C/M на нулту фазу развоја, док је код осталих фаза забележен позитиван утицај услова 0/24 C/M. Уколико се обрати пажња на утицај различитих хранљивих подлога на клијање, добијени резултат указује да је највећи проценат формирања протокорма остао на хранљивој подлози MM-CW (77,82%) док је највећи проценат формирања протокорма са пупољчићем и ризоидима забележен на хранљивој подлози MM-A (33,51%) и MM-PE (27,42%) (Графикон 22).

Током другог мерења, врста *O. sphegodes* бележи знатно мањи проценат формираних протокорма на хранљивој подлози MM-PE у условима потпуног мрака (0,19%) у односу на прво мерење. Међутим, у периоду између два мерења, исти услови су потенцирали интензиван развој сејанца што потврђује резултат да је 55,19% формирало протокорм са пупољчићем и ризоидима. Нешто слабији резултат је добијен на хранљивој подлози MM-A и износи 28,89% (Графикон 23).

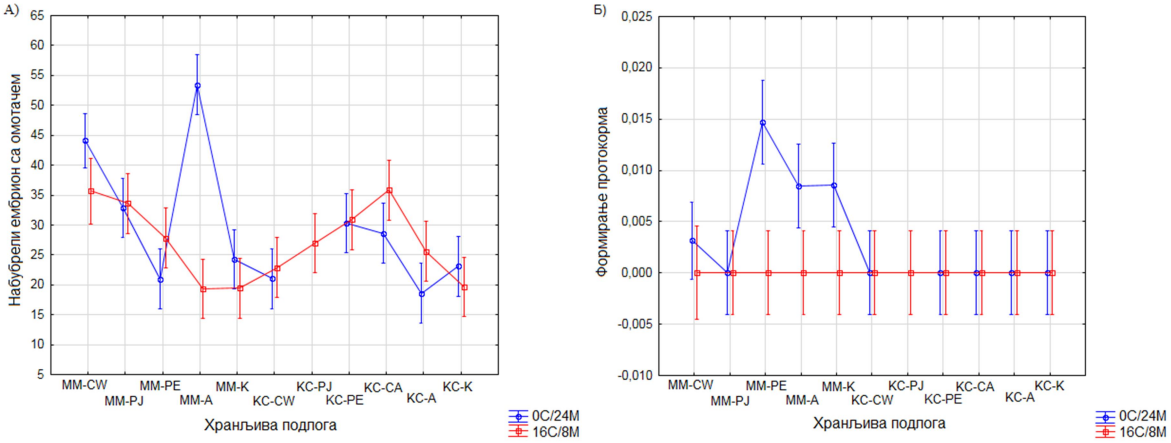


Графикон 22. Утицај осветљења и хранљиве подлоге на клијање и формирање протокорма врсте *H. jankae*: а) Набубрео ембрион са омотачем; б) Набубрели ембрион без омотача; в) Формирање протокорма; г) Протокорм са пупољчићем и ризоидима



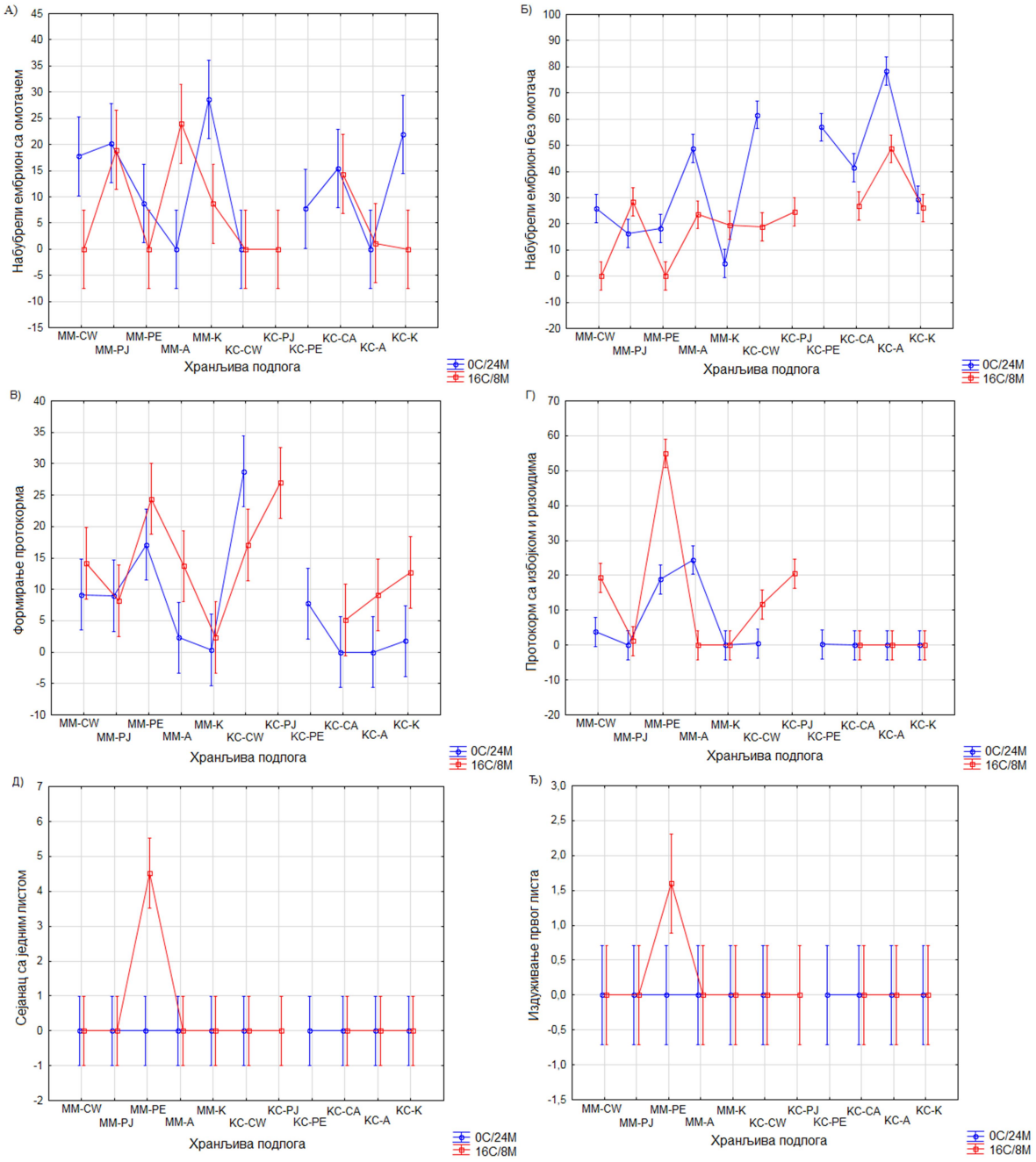
Графикон 23. Утицај осветљења и хранљиве подлоге на клијање и формирање протокорма врсте *O. sphegodes*: а) Набубрео ембрион са омотачем; б) Набубрели ембрион без омотача; в) Формирање протокорма; г) Протокорм са пупољчићем и ризоидима

Клијање семена врста *O. militaris* је изузетно слабо напредовало на испитиваним подлогама у периоду између два мерења. Приликом другог мерења, евидентиране су само две фазе развоја, семена која су имала набубрели ембрион без пробијеног омотача и семена која су превазишла прве фазе клијања и формирале протокорм. Хранљива подлога ММ-А и ММ-CW и услови потпуног мрака показали су најбољи утицај на бубрење ембриона са просечним вредностима 53,46% и 44,73%, док је фазу формирање протокорма достигао мали проценат семена (0,015%) на хранљивој подлози ММ-РЕ (Графикон 24).



Графикон 24. Утицај осветљења и хранљиве подлоге на клијање и формирање протокорма врсте *O. militaris*: а) Набубрео ембрион са омотачем; б) Формирање протокорма

Врста *S. spiralis* се истиче као врста која је постигла највећи степен развоја, и као врста код које је остварен бољи резултат у условима осветљења 16/8 С/М (Графикон 25). Током другог мерења уочен је бољи утицај услова потпуног мрака на прве две фазе развоја сејанца (Графикон 25 а, б). Код фазе Формирање протокорма (Графикон 25 в) уочен је мало бољи утицај фактора осветљење 16/8 С/М. Међутим, уколико се обрати пажња на даље фазе развоја, може се уочити знатно бољи утицај услова 16/8 С/М где је у комбинацији са одговарајућом подлогом дошло до формирања првих листова, што уједно представља највиши степен развоја сејанца (Графикон 25 г, д, ђ) Наиме, осветљење 16/8 С/М и хранљива подлога ММ-РЕ представљају услове у којима је 24,39% формирало протокорм, 54,96% формирало протокорм са ризоидима, 4,52 % формирало први лист и код 1,60% је дошло до издуживања првог листа. Са друге стране, услови потпуног мрака су остварили знатно мањи проценат формирања протокорма са ризоидима (ММ-А 24,43% и ММ-РЕ 18,89%) и није дошло до формирања листова.



Графикон 25. Утицај осветљења и хранљиве подлоге на клијање и формирање протокорма врсте *S. spiralis*: а) Набубрео ембрион са омотачем; б) Набубрели ембрион без омотача; в) Формирање протокорма; г) Протокорм са пупољчићем и ризоидима; д) Сејанац са једним листом; ђ) Издуживање првог листа

6.3.3. Морфометријске особина ембриона и протокорма

Резултати мерења морфометријских особина ембриона и протокорма (Табела 14-16) потврђују позитиван утицај услова потпуног мрака на клијање семена код свих испитиваних врста као и инхибиторно дејство услова 16/8 C/M на клијање семена већине врста, изузев код врсте *S. spiralis.* Уколико се обрати пажња на утицај хранљиве подлоге, најбољи резултати су постигнути на хранљивим подлогама MM-CW и MM-PE што потврђује и Данканов тест вишеструких интервала.

Приликом првог мерења, врста *A. pyramidalis* је најинтензивнији пораст постигла на медијумима MM-CW и MM-PE са просечном висином 0,90 mm и ширином 0,68 mm и висином пупољчића 0,13 mm у условима потпуног мрака, док је најслабији пораст евидентиран на KC-A и KC-K медијуму у условима 16/8 C/M са просечном висином 0,12 mm, ширином 0,08 mm и без формирања вршног пупољчића. (Табела 14)

Сличан резултат бележи и *G. conopsea* у условима пуног мрака са просечном постигнутом висином 0,91 mm и ширином 0,78 mm (MM-CW), док је најслабији резултат постигнут на KC-K медијуму са просечном висином 0,24 mm и ширином 0,18 mm (Табела14).

H. jankae је најбољи резултат постигла на MM-PE хранљивој подлози са просечном висином 0,77 mm, ширином 0,69 mm, висином вршног пупољчића 0,14 mm. Код ове врсте, најслабији резултат остварен је на KC хранљивој подлози, без разлике додавања адитива или услова осветљења. Добијени резултат се поклапа са резултатима који приказују укупну клијавост и фазе клијања, што указује на инхибиторно деловање KC хранљиве подлоге на клијање семена ове врсте (Табела 15)

Врста *S. spiralis* се истиче као једина врста која је показала боље резултате у условима 16/8 C/M што се поклапа са резултатима везаних за фазе развоја сејанца. Као најбоља комбинација хранљиве подлоге истиче се MM-PE где је измерена просечна висина 0,73 mm и ширина 0,40 mm, међутим, није дошло до формирања вршног пупољчића приликом првог мерења. Најслабији пораст је забележен на KC-K медијуму у условима потпуног мрака где је просечна висина ембриона/протокорма износила 0,11 mm, а ширина 0,06 mm (Табела15)

Код врсте *O. sphegodes* су забележене највеће вредности морфометријских особина протокорма на MM-PE хранљивој подлози, чија је просечна висина износила 0,70 mm, ширина 0,62 mm и висина вршног пупољчића 0,16 mm. Најмање вредности су забележене код ембриона/протокорма у условима осветљења 16/8 C/M на скоро свим

хранљивим подлогама, од којих се највише истичу вредности добијене на КСК хранљивој подлози – висина 0,15 mm и ширина 0,10 mm (Табела 16)

Врста *O. militaris* је показала најслабији степен клијавости у односу на остале врсте. Значајнији резултати постигнути су једино на MM-CW и MM-PE хранљивим подглогама у условим потпуног мрака, где су установљене висине протокорма 0,70 mm и 0,63 mm, и ширине протокорма 0,64 mm на првом медијуму, односно 0,50 mm на другом медијуму. На осталим хранљивим подлогама није забележен значајнији развој протокорма (Табела16).

Табела 14. Морфометријске особине ембриона/протокорма за врсте *Anacamptis pyramidalis* и *Gymnadenia conopsea* добијене 8 недеља након сетве

Осветљење светло/мрак	Медијум	*Anacamptis pyramidalis*				*Gymnadenia conopsea*			
		Висина (mm)	Ширина (mm)	Висина пупољчића (mm)	Број листова	Висина (mm)	Ширина (mm)	Висина пупољчића (mm)	Број листова
0/24	MM-CW	0,90±0,20^{a}	0,68±0,10^{a}	0,10±0,12^{ab}	0,00±0,00^{a}	0,91±0,14^{a}	0,78±0,16^{a}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	MM-PJ	0,77±0,15^{b}	0,60±0,07^{a}	0,04±0,02^{bcd}	0,00±0,00^{a}	0,41±0,07^{d}	0,34±0,06^{ef}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	MM-PE	0,80±0,14^{b}	0,67±0,12^{a}	0,13±0,20^{a}	0,00±0,00^{a}	0,62±0,17^{c}	0,47±0,10^{d}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	MM-A	0,74±0,13^{b}	0,58±0,11^{a}	0,06±0,13^{bc}	0,00±0,00^{a}	0,70±0,14^{bc}	0,59±0,12^{c}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	MM-K	0,40±0,16^{c}	0,35±0,13^{b}	0,02±0,06^{cd}	0,00±0,00^{a}	0,50±0,09^{d}	0,44±0,13^{de}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	KC-CW	0,20±0,01^{def}	0,12±0,01^{d}	0,00±0,00^{d}	0,00±0,00^{a}	0,97±0,08^{a}	0,63±0,03^{bc}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	KC-PJ	0,16±0,01^{defg}	0,25±0,31^{c}	0,00±0,00^{d}	0,00±0,00^{a}	0,80±0,30^{b}	0,69±0,29^{abc}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	KC-PE	0,21±0,07^{d}	0,12±0,06^{d}	0,00±0,00^{d}	0,00±0,00^{a}			-	-
	KC-CA	0,20±0,01^{de}	0,12±0,01^{d}	0,00±0,00^{d}	0,00±0,00^{a}	0,93±0,16^{a}	0,72±0,34^{ab}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	KC-A	0,13±0,02^{efg}	0,11±0,03^{d}	0,00±0,00^{d}	0,00±0,00^{a}	0,72±0,16^{bc}	0,63±0,15^{bc}	0,01±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	KC-K	0,17±0,01^{defg}	0,13±0,02^{d}	0,00±0,00^{d}	0,00±0,00^{a}	0,24±0,03^{e}	0,18±0,02^{g}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
16/8	MM-CW	0,22±0,02^{d}	0,13±0,02^{d}	0,00±0,00^{d}	0,00±0,00^{a}	0,49±0,04^{d}	0,32±0,01^{f}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	MM-PJ	0,11±0,01^{g}	0,08±0,03^{d}	0,00±0,00^{d}	0,00±0,00^{a}	0,46±0,05^{d}	0,34±0,06^{ef}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	MM-PE	0,39±0,05c	0,23±0,05^{c}	0,00±0,00^{d}	0,00±0,00^{a}			-	-
	MM-A	0,13±0,02^{efg}	0,09±0,04^{d}	0,00±0,00^{d}	0,00±0,00^{a}	0,45±0,07^{d}	0,32±0,04^{f}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	MM-K	0,12±0,01^{g}	0,09±0,01^{d}	0,00±0,00^{d}	0,00±0,00^{a}	0,45±0,09^{d}	0,33±0,07^{ef}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	KC-CW	0,11±0,01^{g}	0,09±0,01^{d}	0,00±0,00^{d}	0,00±0,00^{a}	0,50±0,05^{d}	0,34±0,07^{ef}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	KC-PJ	0,12±0,02^{fg}	0,08±0,01^{d}	0,00±0,00^{d}	0,00±0,00^{a}	0,49±0,07^{d}	0,36±0,06^{ef}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	KC-PE	0,11±0,03^{g}	0,10±0,01^{d}	0,00±0,00^{d}	0,00±0,00^{a}			-	-
	KC-CA	0,11±0,01^{g}	0,09±0,02^{d}	0,00±0,00^{d}	0,00±0,00^{a}	0,43±0,06^{d}	0,34±0,05^{ef}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	KC-A	0,12±0,01^{g}	0,08±0,01^{d}	0,00±0,00^{d}	0,00±0,00^{a}	0,47±0,06^{d}	0,37±0,06^{ef}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	KC-K	0,12±0,01^{g}	0,08±0,01^{d}	0,00±0,00^{d}	0,00±0,00^{a}	0,45±0,05^{d}	0,35±0,05^{ef}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}

* - Разлике између средњих вредности означених истим словом нису статистички значајне према Данкановом тесту за $p<0,05$

Табела 15. Морфометријске особине ембриона/протокорма за врсте *Himantoglosum jankae* и *Spiranthes spiralis* добијене 8 недеља након сетве

Осветљење светло/мрак	Медијум	*Himantoglossum jankae*				*Spiranthes spiralis*			
		Висина (mm)	Ширина (mm)	Висина пупољчића (mm)	Број листова	Висина (mm)	Ширина (mm)	Висина пупољчића (mm)	Број листова
0/24	MM-CW	0,61±0,14^{b}	0,56±0,12^{b}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}	0,61±0,14^{b}	0,56±0,12^{b}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	MM-PJ	0,40±0,09^{d}	0,36±0,07^{b}	0,00±0,00c	0,00±0,00^{a}	0,40±0,09^{d}	0,36±0,07^{b}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	MM-PE	0,77±0,09^{a}	0,69±0,16^{a}	0,14±0,19^{a}	0,00±0,00^{a}	0,77±0,09^{a}	0,69±0,16^{a}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	MM-A	0,54±0,09^{c}	0,44±0,07^{d}	0,03±0,19^{bc}	0,00±0,00^{a}	0,54±0,09^{c}	0,44±0,07^{d}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	MM-K	0,59±0,11^{bc}	0,49±0,12^{c}	0,01±0,01^{c}	0,00±0,00^{a}	0,59±0,11^{bc}	0,49±0,12^{c}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	KC-CW	0,13±0,012^{f}	0,08±0,01^{g}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}	0,13±0,012^{f}	0,08±0,01^{h}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	KC-PJ	0,13±0,02^{f}	0,07±0,01^{g}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}	-	-	-	-
	KC-PE	0,12±0,02^{f}	0,07±0,01^{g}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}	0,12±0,02^{f}	0,07±0,01^{h}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	KC-CA	0,12±0,02^{f}	0,08±0,01^{g}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}	0,12±0,02^{f}	0,08±0,01^{h}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	KC-A	0,12±0,02^{f}	0,07±0,01^{g}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}	0,12±0,02^{f}	0,07±0,01^{h}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	KC-K	0,11±0,01^{f}	0,06±0,01^{g}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}	0,11±0,01^{f}	0,06±0,01^{h}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
16/8	MM-CW	0,25±0,02^{e}	0,17±0,01^{f}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}	0,25±0,02^{e}	0,17±0,01^{g}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	MM-PJ	0,12±0,02^{f}	0,09±0,03^{g}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}	0,12±0,02^{f}	0,09±0,03^{h}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	MM-PE	0,40±0,04^{d}	0,26±0,05^{e}	0,06±0,01^{b}	0,00±0,00^{a}	0,40±0,04^{d}	0,26±0,05^{f}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	MM-A	0,15±0,02^{f}	0,09±0,04^{g}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}	0,15±0,02^{f}	0,09±0,04^{h}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	MM-K	0,11±0,01^{f}	0,09±0,01^{g}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}	0,11±0,01^{f}	0,09±0,01^{h}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	KC-CW	0,12±0,02^{f}	0,09±0,01^{g}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}	0,12±0,02^{f}	0,09±0,01^{h}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	KC-PJ	0,13±0,02^{f}	0,09±0,02^{g}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}	0,13±0,02^{f}	0,09±0,02^{h}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	KC-PE	0,11±0,04^{f}	0,10±0,01^{g}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}	-	-	-	-
	KC-CA	0,12±0,02^{f}	0,09±0,01^{g}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}	0,12±0,02^{f}	0,09±0,01^{h}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	KC-A	0,13±0,02^{f}	0,08±0,01^{g}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}	0,13±0,02^{f}	0,08±0,01^{h}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	KC-K	0,12±0,02^{f}	0,08±0,01^{g}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}	0,12±0,02^{f}	0,08±0,01^{h}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}

* - Разлике између средњих вредности означених истим словом нису статистички значајне према Данкановом тесту за $p<0,05$

Табела 16. Морфометријске особине ембриона/протокорма за врсте *Ophrys sphegodes* и *Orchis militaris* добијене 8 недеља након сетве

Осветљење светло/мрак	Медијум	*Ophrys sphegodes*				*Orchis militaris*			
		Висина (mm)	Ширина (mm)	Висина пупољчића (mm)	Број листова	Висина (mm)	Ширина (mm)	Висина пупољчића (mm)	Број листова
0/24	MM-CW	-	-	-	-	0,64±0,02^{b}	0,50±0,04^{b}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	MM-PJ	-	-	-	-	0,17±0,10^{c}	0,10±0,03^{c}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	MM-PE	0,70±0,02^{a}	0,62±0,06^{a}	0,16±0,10^{a}	0,00±0,00^{a}	0,70±0,02^{a}	0,63±0,03^{a}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	MM-A	0,64±0,10^{b}	0,56±0,05^{b}	0,14±0,10^{a}	0,00±0,00^{a}	0,16±0,10^{c}	0,10±0,03^{c}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	MM-K	0,58±0,06^{c}	0,51±0,05^{c}	0,06±0,07^{b}	0,00±0,00^{a}	0,13±0,05^{d}	0,10±0,04^{c}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	KC-CW	-	-	-	-	0,13±0,012^{d}	0,08±0,01^{c}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	KC-PJ	-	-	-	-	-	-	-	-
	KC-PE	-	-	-	-	0,12±0,02^{d}	0,07±0,01^{c}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	KC-CA	0,17±0,03^{d}	0,10±0,01^{d}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}	0,12±0,02^{d}	0,06±0,01^{c}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	KC-A	0,16±0,01^{d}	0,10±0,02^{d}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}	0,12±0,02^{d}	0,07±0,01^{c}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	KC-K	0,15±0,02^{d}	0,10±0,02^{d}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}	0,11±0,01^{d}	0,06±0,01^{c}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
16/8	MM-CW	-	-	-	-	0,13±0,012^{d}	0,08±0,01^{c}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	MM-PJ	-	-	-	-	0,11±0,01^{d}	0,06±0,01^{c}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	MM-PE	0,14±0,02^{d}	0,11±0,02^{d}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}	0,12±0,02^{d}	0,07±0,01^{c}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	MM-A	0,16±0,02^{d}	0,13±0,01^{d}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}	0,12±0,02^{d}	0,08±0,01^{c}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	MM-K	0,14±0,02^{d}	0,10±0,02^{d}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}	0,12±0,02^{d}	0,07±0,01^{c}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	KC-CW	-	-	-	-	0,11±0,01^{d}	0,06±0,01^{c}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	KC-PJ	-	-	-	-	0,12±0,02^{d}	0,07±0,01^{c}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	KC-PE	-	-	-	-	0,12±0,02^{d}	0,08±0,01^{c}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	KC-CA	0,17±0,02^{d}	0,11±0,03^{d}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}	0,12±0,02^{d}	0,07±0,01^{c}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	KC-A	0,15±0,01^{d}	0,10±,02^{d}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}	0,11±0,01^{d}	0,06±0,01^{c}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	KC-K	0,15±0,01^{d}	0,10±0,02^{d}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}	0,11±0,01^{d}	0,06±0,01^{c}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}

* - Разлике између средњих вредности означених истим словом нису статистички значајне према Данкановом тесту за $p<0,05$

Резултати добијени приликом другог мерења потврђују наставак развоја ембриона и протокорма на испитиваним медијумима (Табела 17-19). Иако су MM-CW и MM-PE хранљиве подлоге задржале најбољи резултат, хранљиве подлоге MM-A и MM-PJ се такође истичу као медијуми који подстичу клијање и развој сејанца код појединих врста. Фактор освељење је имао позитиван утицај на раст и развој протокорма у условима потпуног мрака, док су услови 16/8 C/M имали позитиван утицај само код врсте *S. spiralis*. Као највише вредности постигнуте код врсте *A. pyramidalis* истичу се 1,10 mm (MM-CW) за висину, 1,00 mm (MM-PE) за ширину и 0,57 mm (MM-PE) за висину пупољчића. Најслабији резултат забележен је на скоро свим медијумима који су чувани у условима 16/8 C/M са просечном висином протокорма 0,12 mm и 0,13 mm и ширином протокорма 0,08 mm (Табела 17).

Врста *G. conopsea* је задржала најбољи резултат на хранљивој подлози MM-CW са просечном висином протокорма 1,40 mm, ширином 1,21 mm и висином пупољчића 0,30 mm што представља велики напредак у односу на резултате добијене приликом првог мерења. Са друге стране, услови који не подстичу клијање семена су медијуми KC-K и KC-A и осветљење 16/8 C/M где је дошло до веома малог пораста ембриона у односу на прво мерење, и медијум KC-K и осветљење 0/24 C/M где је потпуно обустављено клијање семена (Табела 17).

Код врсте *H. jankae* дошло је до значајног развоја протокорма код семена у условима пуног мрака, која су посејана на хранљиву подлогу MM-A где је и остварена највиша вредност висине протокорма од 1,1 mm, ширине протокорма 0,97 mm, док је најбољи пораст вршног пупољчића остао на MM-PE хранљивој подлози и износи 0,29 mm. Најслабији резултат остварила су семена посејана на KC-K хранљиву подлогу са 0,12 mm просечном дужином и 0,07 mm просечном ширином ембриона (Табела 18).

Код врсте *S. spiralis* је забележен интензиван развој сејанца у периоду између два мерења. Значајан напредак развоја протокорма десио се на скоро свим хранљивим подлогама чуваним у условима 16/8 C/M, док се као најбоља хранљива подлога истиче MM-PE код које је дошло до формирања пупољчића чија је просечна висина износила 0,50 mm. Такође, ови услови су подстакли формирање листова што уједно истиче врсту *S. spiralis* као врсту која је постигла најдаљу фазу развоја од свих испитиваних врста. Са друге стране, семена посејана на MM-K хранљиву подлогу и чувана у условима потпуног мрака показала су најслабији разултат са просечном висином ембриона/протокорма од 0,35 mm и ширином 0,22 mm (Табела 18).

Димензије протокорма 0,81 mm за висину, 0,75 mm за ширину и 0,32 mm за висину вршног пупољчића указују да се хранљива подлога MM-PE показала као најбоља комбинација за клијање семена *O. sphegodes* (Табела 19).

Са друге стране, код *O. militaris* у периоду између два мерења није дошло до значајнијег напредовања у развоју сејанца ни на једној хранљивој подлози што потврђују и резултати приказани у Табели 19.

Табела 17. Морфометријске особине ембриона/протокорма за врсте *Anacamptis pyramidalis* и *Gymnadenia conopsea* добијене 12 недеља након сетве

Осветљење светло/мрак	Медијум	*Anacamptis pyramidalis*				*Gymnadenia conopsea*			
		Висина (mm)	Ширина (mm)	Висина пупољчића (mm)	Број листова	Висина (mm)	Ширина (mm)	Висина пупољчића (mm)	Број листова
0/24	MM-CW	1,10±0,10^{a}	0,88±0,17^{b}	0,47±0,10^{b}	0,00±0,00^{a}	1,40 ±0,30^{a}	1,21±0,16^{a}	0,30±0,21^{a}	0,00±0,00^{a}
	MM-PJ	1,03±0,20^{a}	0,87±0,14^{b}	0,20±0,18^{d}	0,00±0,00^{a}	0,40±0,06^{g}	0,38±0,04^{e}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}
	MM-PE	1,08±0,19^{a}	1,00±0,19^{a}	0,57±0,16^{a}	0,00±0,00^{a}	1,33±0,06^{a}	1,09±0,06^{b}	0,10±0,0b^{b}	0,00±0,00^{a}
	MM-A	1,08±0,25^{a}	0,88±0,09^{b}	0,38±0,13^{c}	0,00±0,00^{a}	0,83±0,21^{d}	0,67±0,06^{d}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}
	MM-K	0,81±0,24^{b}	0,68±0,17^{c}	0,06±0,12^{e}	0,00±0,00^{a}	0,63±0,08^{ef}	0,61±0,11^{d}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}
	KC-CW	0,44±0,11^{c}	0,24±0,13^{de}	0,00±0,00^{e}	0,00±0,00^{a}	0,98±0,08^{bc}	0,65±0,03^{d}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}
	KC-PJ	0,41±0,07^{cd}	0,23±0,08^{de}	0,00±0,00^{e}	0,00±0,00^{a}	0,75±0,11^{de}	0,66±0,06^{d}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}
	KC-PE	0,30±0,17^{def}	0,20±0,13^{def}	0,00±0,00^{e}	0,00±0,00^{a}	-	-	-	-
	KC-CA	0,31±0,16^{de}	0,21±0,13^{de}	0,00±0,00^{e}	0,00±0,00^{a}	1,01±0,08^{b}	0,80±0,21^{c}	0,04±0,04 ^{c}	0,00±0,00^{a}
	KC-A	0,18±0,01^{fg}	0,18±0,01^{defg}	0,00±0,00^{e}	0,00±0,00^{a}	0,85±0,43^{cd}	0,60±0,26^{d}	0,02±0,02 ^{c}	0,00±0,00^{a}
	KC-K	0,20±0,01^{efg}	0,18±0,02^{defg}	0,00±0,00^{e}	0,00±0,00^{a}	0,24±0,03^{h}	0,19±0,02^{f}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}
16/8	MM-CW	0,23±0,03^{efg}	0,15±0,02^{efg}	0,00±0,00^{e}	0,00±0,00^{a}	0,51±0,04^{fg}	0,35±0,02^{e}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}
	MM-PJ	0,12±0,02^{g}	0,10±0,05^{g}	0,00±0,00^{e}	0,00±0,00^{a}	0,50±0,05^{fg}	0,40±0,07^{e}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}
	MM-PE	0,40±0,05^{cd}	0,25±0,04^{d}	0,00±0,00^{e}	0,00±0,00^{a}	-	-	-	-
	MM-A	0,15±0,03^{g}	0,10±0,04^{g}	0,00±0,00^{e}	0,00±0,00^{a}	0,45±0,03^{g}	0,33±0,03 ^{e}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}
	MM-K	0,12±0,01^{g}	0,10±0,02^{g}	0,00±0,00^{e}	0,00±0,00^{a}	0,80±0,04^{de}	0,37±0,01 ^{e}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}
	KC-CW	0,12±0,01^{g}	0,10±0,01^{g}	0,00±0,00^{e}	0,00±0,00^{a}	0,51±0,04^{fg}	0,37±0,07 ^{e}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}
	KC-PJ	0,14±0,02^{g}	0,09±0,01^{g}	0,00±0,00^{e}	0,00±0,00^{a}	0,52±0,09^{fg}	0,38±0,06 ^{e}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}
	KC-PE	0,12±0,02^{g}	0,12±0,02^{fg}	0,00±0,00^{e}	0,00±0,00^{a}	-	-	-	-
	KC-CA	0,13±0,01^{g}	0,10±0,02^{g}	0,00±0,00^{e}	0,00±0,00^{a}	0,44±0,06^{g}	0,36±0,05 ^{e}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}
	KC-A	0,13±0,03^{g}	0,09±0,03^{g}	0,00±0,00^{e}	0,00±0,00^{a}	0,48±0,07^{fg}	0,40±0,06 ^{e}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}
	KC-K	0,13±0,02^{g}	0,09±0,02^{g}	0,00±0,00^{e}	0,00±0,00^{a}	0,47±0,06^{fg}	0,66±0,05 ^{e}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}

* - Разлике између средњих вредности означених истим словом нису статистички значајне према Данкановом тесту вишеструких интервала за $p<0,05$

Табела 18. Морфометријске особине ембриона/протокорма за врсте *Himantoglossum jankae* и *Spiranthes spiralis* добијене 12 недеља након сетве

Осветљење светло/мрак	Медијум	*Himantoglossum jankae*				*Spiranthes spiralis*			
		Висина (mm)	Ширина (mm)	Висина пупољчића (mm)	Број листова	Висина (mm)	Ширина (mm)	Висина пупољчића (mm)	Број листова
0/24	MM-CW	0,90±0,37^{b}	0,80±0,28^{b}	0,16±0,02^{c}	0,00±0,00^{a}	0,59±0,05^{efgh}	0,45±0,02^{bc}	0,00±0,00^{b}	0,00±0,00^{b}
	MM-PJ	0,51±0,10^{c}	0,48±0,06^{d}	0,23±0,13^{bc}	0,00±0,00^{a}	0,75±0,29^{cde}	0,39±0,11^{cd}	0,00±0,00^{b}	0,00±0,00^{b}
	MM-PE	0,89±0,10^{b}	0,80±0,14b^{c}	0,29±0,19^{a}	0,00±0,00^{a}	0,93±0,29^{bc}	0,63±0,30^{a}	0,03±0,06^{b}	0,00±0,00^{b}
	MM-A	1,1±0,35^{a}	0,97±0,31^{a}	0,25±0,18^{b}	0,00±0,00^{a}	0,67±0,17^{i}	0,35±0,05^{cde}	0,05±0,01^{b}	0,00±0,00^{b}
	MM-K	0,85±0,21^{b}	0,80±0,18^{bc}	0,10±0,02^{d}	0,00±0,00^{a}	0,35±0,17^{i}	0,22±0,08^{g}	0,00±0,00^{b}	0,00±0,00^{b}
	KC-CW	0,16±0,03^{d}	0,10±0,02^{e}	0,00±0,00^{e}	0,00±0,00^{a}	0,65±0,05^{defg}	0,42±0,03^{bc}	0,00±0,00^{b}	0,00±0,00^{b}
	KC-PJ	0,14±0,02^{d}	0,08±0,01^{e}	0,00±0,00^{e}	0,00±0,00^{a}	-	-	-	-
	KC-PE	0,88±0,35^{b}	0,68±0,38^{c}	0,10±0,04^{d}	0,00±0,00^{a}	0,66±0,18^{defg}	0,35±0,04^{cde}	0,03±0,05^{b}	0,00±0,00^{b}
	KC-CA	0,18±0,04^{d}	0,13±0,02^{e}	0,00±0,00^{e}	0,00±0,00^{a}	0,62±0,15^{defg}	0,30±0,04^{defg}	0,00±0,00^{b}	0,00±0,00^{b}
	KC-A	0,13±0,02^{d}	0,08±0,01^{e}	0,00±0,00^{e}	0,00±0,00^{a}	0,65±0,17^{defg}	0,34±0,03^{cdef}	0,00±0,00^{b}	0,00±0,00^{b}
	KC-K	0,12±0,01^{d}	0,07±0,01^{e}	0,00±0,00^{e}	0,00±0,00^{a}	0,54±0,03^{efghi}	0,35±0,04^{cde}	0,00±0,00^{b}	0,00±0,00^{b}
16/8	MM-CW	0,27±0,03^{d}	0,12±0,01^{e}	0,00±0,00^{e}	0,00±0,00^{a}	0,89±0,22^{bc}	0,41±0,13^{bcd}	0,00±0,00^{b}	0,00±0,00^{b}
	MM-PJ	0,18±0,03^{d}	0,12±0,02^{e}	0,00±0,00^{e}	0,00±0,00^{a}	1,03±0,48^{ab}	0,47±0,19^{b}	0,07±0,02^{b}	0,00±0,00^{b}
	MM-PE	0,28±0,06^{d}	0,11±0,02^{e}	0,12±0,05^{cd}	0,00±0,00^{a}	1,17±,03^{a}	0,66±0,22^{a}	0,50±0,40^{a}	0,20±0,63^{a}
	MM-A	0,20±0,02^{d}	0,12±0,02^{e}	0,00±0,00^{e}	0,00±0,00^{a}	0,44±0,15^{ghi}	0,26±0,05^{efg}	0,00±0,00^{b}	0,00±0,00^{b}
	MM-K	0,19±0,02^{d}	0,09±0,02^{e}	0,00±0,00^{e}	0,00±0,00^{a}	0,49±0,25^{fghi}	0,23±0,07^{g}	0,00±0,00^{b}	0,00±0,00^{b}
	KC-CW	0,19±0,02^{d}	0,11±0,02^{e}	0,00±0,00^{e}	0,00±0,00^{a}	0,84±0,32^{bcd}	0,42±0,13^{bcd}	0,03±0,07^{b}	0,00±0,00^{b}
	KC-PJ	0,24±0,05^{d}	0,17±0,02^{e}	0,00±0,00^{e}	0,00±0,00^{a}	0,41±0,10^{hi}	0,22±0,06^{g}	0,00±0,00^{b}	0,00±0,00^{b}
	KC-PE	0,25±0,05^{d}	0,13±0,03^{e}	0,00±0,00^{e}	0,00±0,00^{a}	-	-	-	-
	KC-CA	0,15±0,02^{d}	0,11±0,02^{e}	0,00±0,00^{e}	0,00±0,00^{a}	0,44±0,14^{ghi}	0,23±0,03^{fg}	0,00±0,00^{b}	0,00±0,00^{b}
	KC-A	0,16±0,03^{d}	0,12±0,03^{e}	0,00±0,00^{e}	0,00±0,00^{a}	0,50±0,09^{fghi}	0,30±0,05^{defg}	0,00±0,00^{b}	0,00±0,00^{b}
	KC-K	0,25±0,04^{d}	0,19±0,02^{e}	0,00±0,00^{e}	0,00±0,00^{a}	0,50±0,06^{fghi}	0,26±0,04^{efg}	0,00±0,00^{b}	0,00±0,00^{b}

* - Разлике између средњих вредности означених истим словом нису статистички значајне према Данкановом тесту вишеструких интервала за $p<0,05$

Табела 19. Морфометријске особине ембриона/протокорма за врсте *Ophrys sphegodes* и *Orchis militaris* добијене 8 недеља након сетве

Осветљење светло/мрак	Медијум	*Ophrys sphegodes*				*Orchis militaris*			
		Висина (mm)	Ширина (mm)	Висина пупољчића (mm)	Број листова	Висина (mm)	Ширина (mm)	Висина пупољчића (mm)	Број листова
0/24	MM-CW	-	-	-	-	0,60±0,02^{b}	0,45±0,04^{b}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	MM-PJ	-	-	-	-	0,17±0,10^{d}	0,10±0,03^{d}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	MM-PE	0,81±0,19^{a}	0,75±0,18^{a}	0,32±0,08^{a}	0,00±0,00^{a}	0,72±0,02^{a}	0,65±0,03^{a}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	MM-A	0,77±0,20^{a}	0,65±0,16^{b}	0,24±0,22^{a}	0,00±0,00^{a}	0,35±0,10^{c}	0,17±0,03^{c}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	MM-K	0,55±0,09^{b}	0,50±0,08^{c}	0,06±0,06^{b}	0,00±0,00^{a}	0,33±0,05^{c}	0,15±0,04^{c}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	KC-CW	-	-	-	-	0,13±0,012^{d}	0,08±0,01^{d}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	KC-PJ	-	-	-	-	-	-	-	-
	KC-PE	-	-	-	-	0,12±0,02^{de}	0,07±0,01^{d}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	KC-CA	0,17±0,02^{c}	0,11±0,01^{d}	0,00±0,00^{b}	0,00±0,00^{a}	0,12±0,02^{de}	0,06±0,01^{d}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	KC-A	0,16±0,02^{c}	0,10±0,02^{d}	0,00±0,00^{b}	0,00±0,00^{a}	0,12±0,02^{de}	0,07±0,01^{d}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	KC-K	0,16±0,01^{c}	0,10±0,02^{d}	0,00±0,00^{b}	0,00±0,00^{a}	0,11±0,01^{de}	0,06±0,01^{d}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
16/8	MM-CW	-	-	-	-	0,13±0,01^{de}	0,08±0,01^{d}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	MM-PJ	-	-	-	-	0,11±0,01^{de}	0,06±0,01^{d}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	MM-PE	0,14±0,02^{d}	0,11±0,02^{d}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}	0,12±0,02^{de}	0,07±0,01^{d}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	MM-A	0,16±0,02^{d}	0,13±0,01^{d}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}	0,12±0,02^{de}	0,08±0,01^{d}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	MM-K	0,14±0,02^{d}	0,10±0,02^{d}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}	0,12±0,02^{de}	0,07±0,01^{d}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	KC-CW	-	-	-	-	0,11±0,01^{de}	0,06±0,01^{d}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	KC-PJ	-	-	-	-	0,12±0,02^{de}	0,07±0,01^{d}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	KC-PE	-	-	-	-	0,12±0,02^{de}	0,08±0,01^{d}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	KC-CA	0,17±0,02^{d}	0,11±0,03^{d}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}	0,12±0,02^{de}	0,07±0,01^{d}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	KC-A	0,15±0,01^{d}	0,10±,02^{d}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}	0,11±0,01^{de}	0,06±0,01^{d}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}
	KC-K	0,15±0,01^{d}	0,10±0,02^{d}	0,00±0,00^{c}	0,00±0,00^{a}	0,11±0,01^{de}	0,06±0,01^{d}	0,00±0,00^{a}	0,00±0,00^{a}

* - Разлике између средњих вредности означених истим словом нису статистички значајне према Данкановом тесту вишеструких интервала за $p<0,05$

6.4. Изолација и морфолошка идентификација гљива

Укупно 12 изолата микоризних гљива је изоловано из кореновог система терестричних орхидеја и то 4 изолата из *G. conopsea*, 5 изолата из G. *odoratissima*, и по 1 изолат из *A. pyramidalis, E. microphylla* и *O. sphegodes* (Табела 20).

Након 72 h проведених на PDA подлози и на температури од 26˚C, дошло је до образовања зачетка мицелије. Промене у обојености и конзистенцији култура уочене су након 7 дана. Две недеље након постављања огледа приступило се проучавању њихових морфолошких карактеристика приликом чега су добијени подаци о изгледу испитиваних колонија, одликама хифа и формирању монилиоидних ћелија. Једине особине које су заједничке код свих изолата јесу величина колоније (гигантска), облик (округли), боја ваздушне мицелије (бела) и септиране хифе. Остале особине се разликују како између врста са којих су изоловане гљиве, тако и унутар једне врсте.

6.4.1. Гљиве изоловане из врсте *Gymnadenia conopsea*

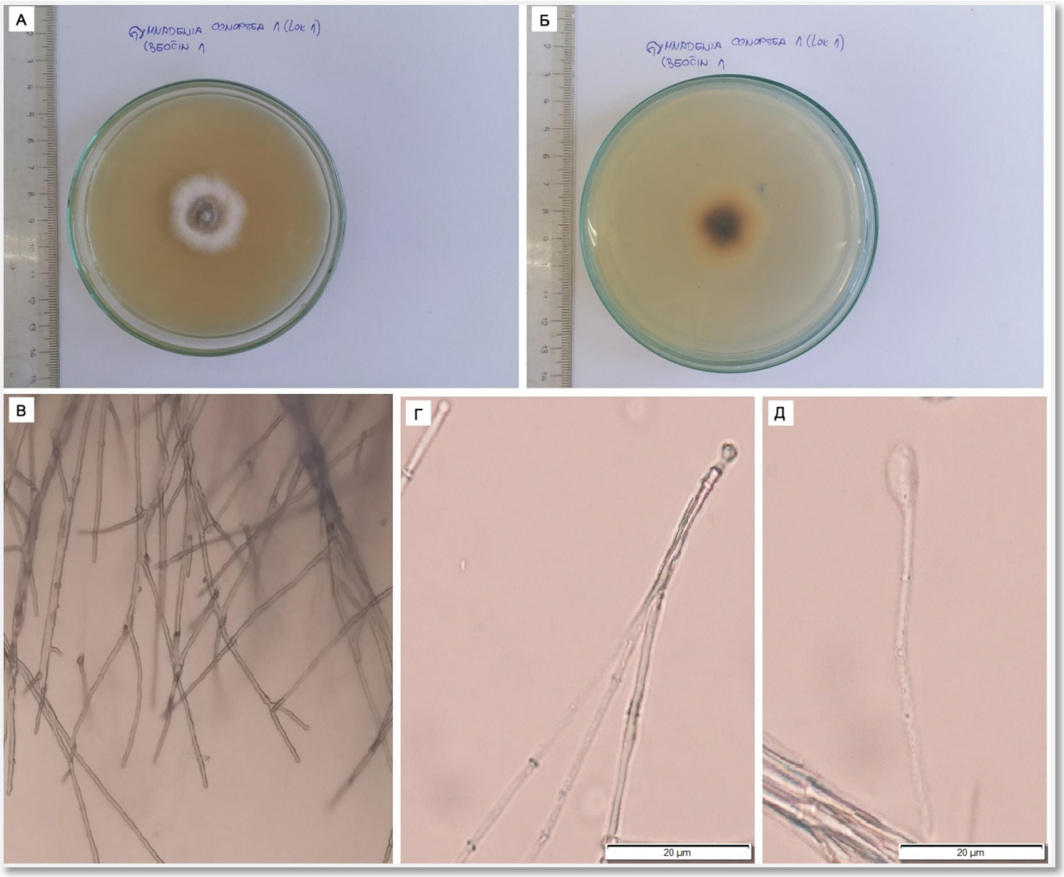
У оквиру ове врсте, са 3 јединке, изоловано је 4 изолата код којих су уочене разлике у морфологији вегетативних органа. Иако изоловане гљиве припадају роду *Rhizoctionia,* морфолошке разлике их сврставају у различите групе. Разлике између изолованих гљива се пре свега односе на боју мицелије, затим појаву ексудата и формирање монилиоидних ћелија.

Код прве јединке (Gc R 1) изолована је гљива чија је боја надсупстратне мицелије бела, а супстратна жута, не формира ексудате, хифа је широка, септирана и уочено је формирање монилиоидних ћелија елипсастог облика (Слика 10). Гљиву карактерише и спорији развој колоније у односу на остале изолате. Старењем културе постају тамније, боја супстратне и надсупстратне мицелије је постала црна и присутно је формирање склероција, карактеристичног мириса (шампињони).

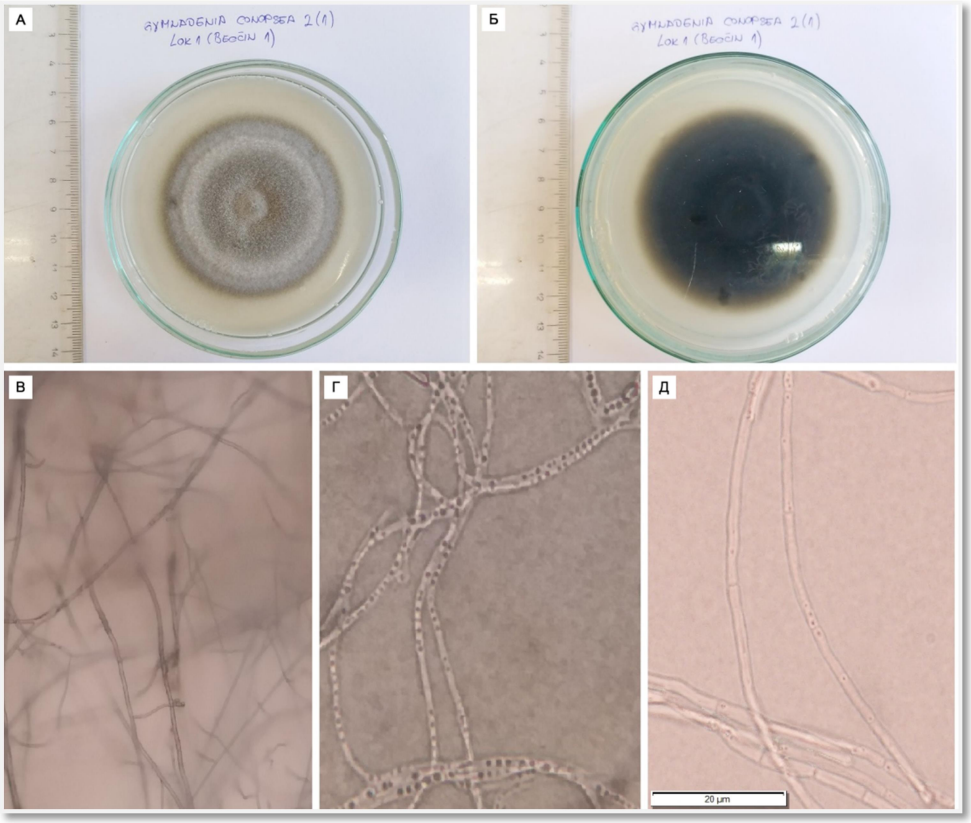
Код друге јединке која је узоркована са истог локалитета уочене су 2 морфолошки различите гљиве (Gc R 2(1) и Gc R 2(2)). Главна разлика између изолованих гљива огледа се у боји супстратне и надсупстратне мицелије. Први изолат (Gc R 2(1)) имао је сиво-зелену боју надсупстратне мицелије и црну боју супстратне мицелије (Слика 11), док је други изолат (Gc R 2(1)) имао сиво розе боју надсупстратне мицелије и црно браон боју супстратне мицелије (Слика 12). Код оба изолата примећено је формирање

ексудата као и септиране вишеједарне хифе, без формирања монилиоидних ћелија. Након 6 недеља, код оба изолата су се формирале склероције. Поред морфолошког изгледа мицелије, изолати се разликују и по мирису, први изолат (Gc R 2(1) каракртерише врло непријатан мирис (стајњак) док је код изолата Gc R 2(2) присутан мирис шампињона.

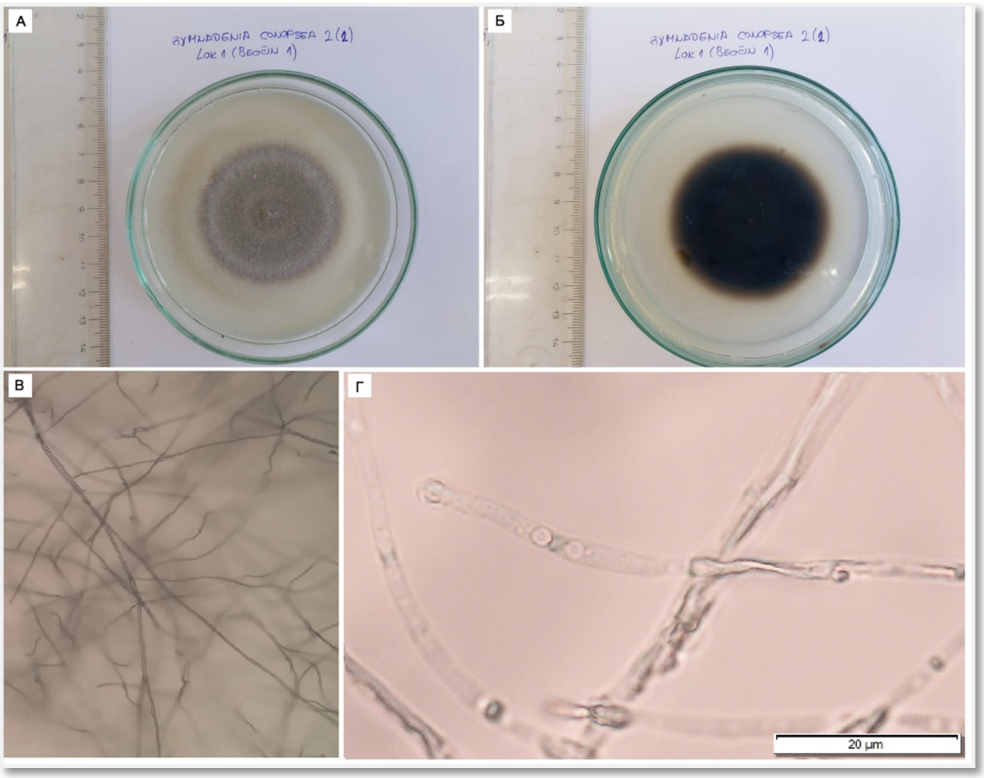
Гљиву изоловану из корена треће јединке (Gc R 4) карактерише сиво-зелена боја надсупстратне мицелије, црнозелена боја супстратне мицелије и формирање ексудата. Анализом микроскопског препарата утврђено је да гљива има септиране двоједарне и релативно широке хифе и као и формиране монилиоидне ћелије лоптастог облика (Слика 13). Старењем култура је потамнела те је боја супстратне мицелије постала тамно браон, карактеристичног мириса на шампињоне. Такође на површини изолата је примећено присуство склероција.



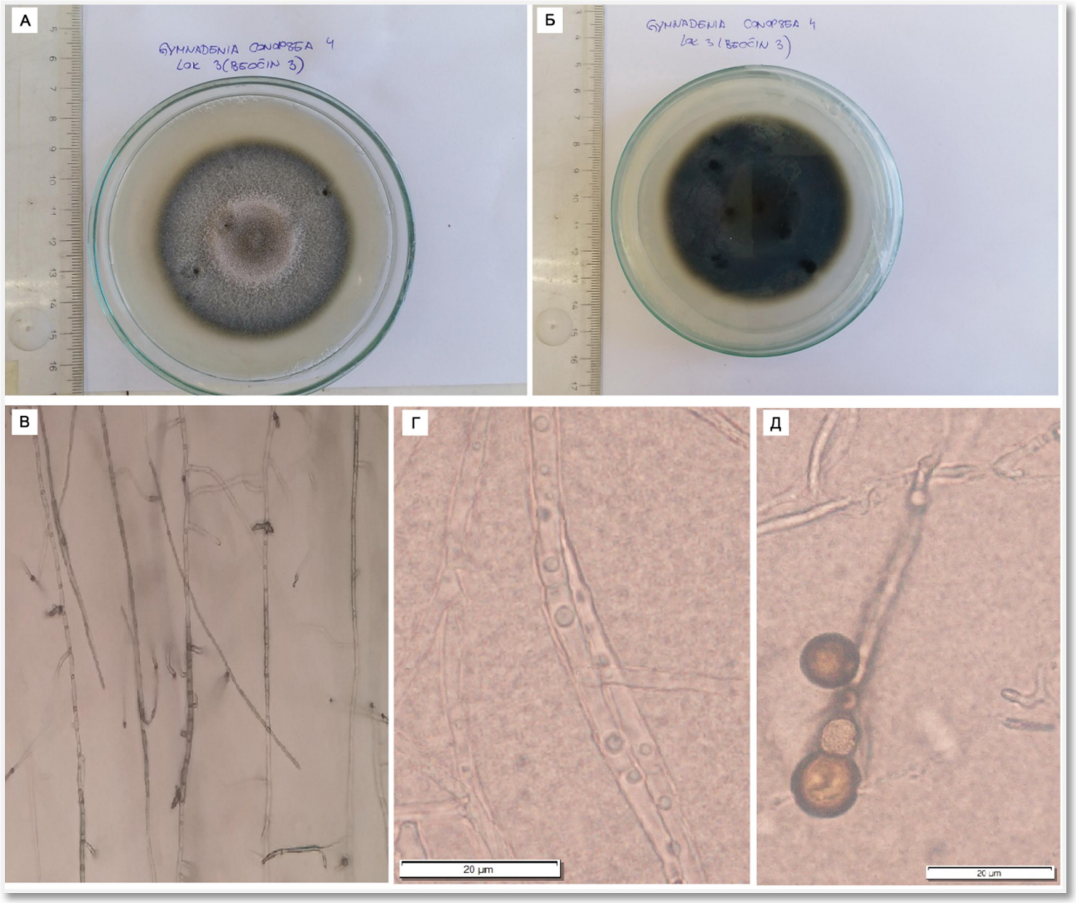
Слика 10. Морфолошке карактеристике изолата Gc R 1: а) Надсупстратна мицелија; б) Супстратна мицелија; в) Ивица и структура; г) Септирана хифа; д) Монилиоидна ћелија



Слика 11. Морфолошке карактеристике изолата Gc R 2(1): а) Надсупстратна мицелија; б) Супстратна мицелија; в) Ивица и структура; г); Хифе; д) Септирана хифа



Слика 12. Морфолошке карактеристике изолата Gc R 2 (2): а) Надсупстратна мицелија; б) Супстратна мицелија; в) Ивица и структура; г) Септиране двоједарне хифе



Слика 13. Морфолошке карактеристике изолата Gc R 4: а) Надсупстратна мицелија; б) Супстратна мицелија; в) Ивица и структура; г) Септиране двоједарне хифе; д) Монилиоидне ћелије.

6.4.2. Гљиве изоловане из кореновог система врсте *Gymnadenia odoratissima*

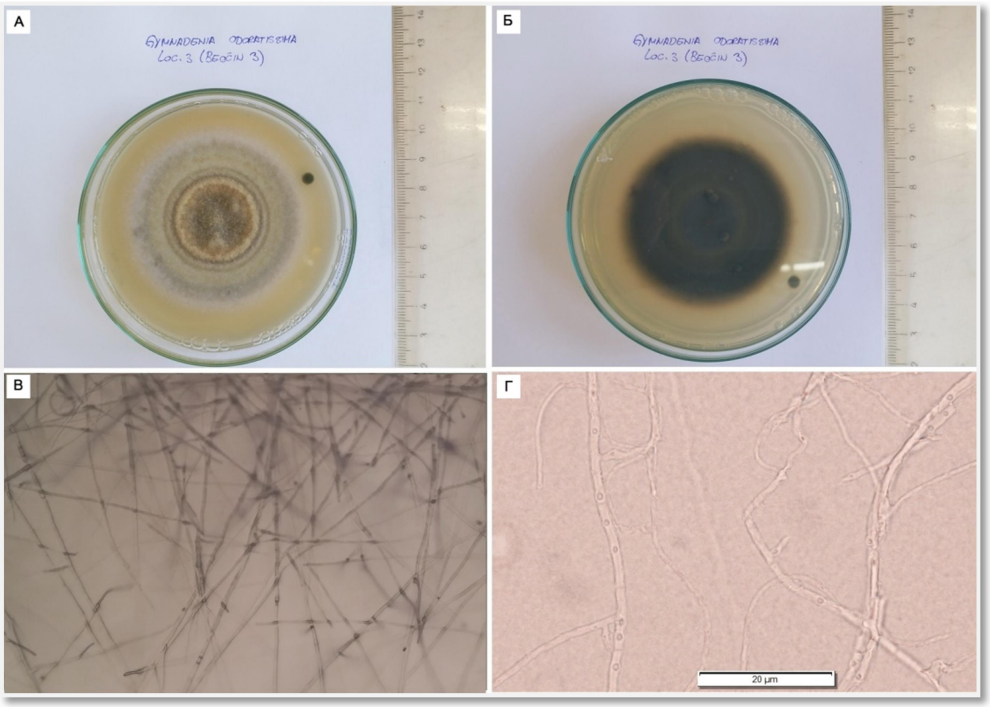
Из кореновог система врсте *G. odoratissima* изоловано је 5 колонија гљива (GoR 1, Go R 4 (1), Go R 4 (2); Go R 5 (1), Go R 5 (2)). Морфолошке особине вегетативних органа указују на разлике између изолата од којих се највише истиче боја надсуспратне мицелије. Микроскопским прегледом отисних препарата уочено је да нема значајнијих разлика између изолата. Код свих је уочена септирана двоједарна хифа, док је формирање монилиоидних ћелија две недеље након пресејавања примећено само код два изолата – Go R 4 (1), Go R 4 (2).

Први изолат (Go R 1) карактерише жуто-браон боја надсупстратне мицелије са појавом ексудата и црно зелена боја супстратне мицелије, интензивног мириса који подсећа на шампињоне (Слика 14). Старењем колоније дошло је до промене боје

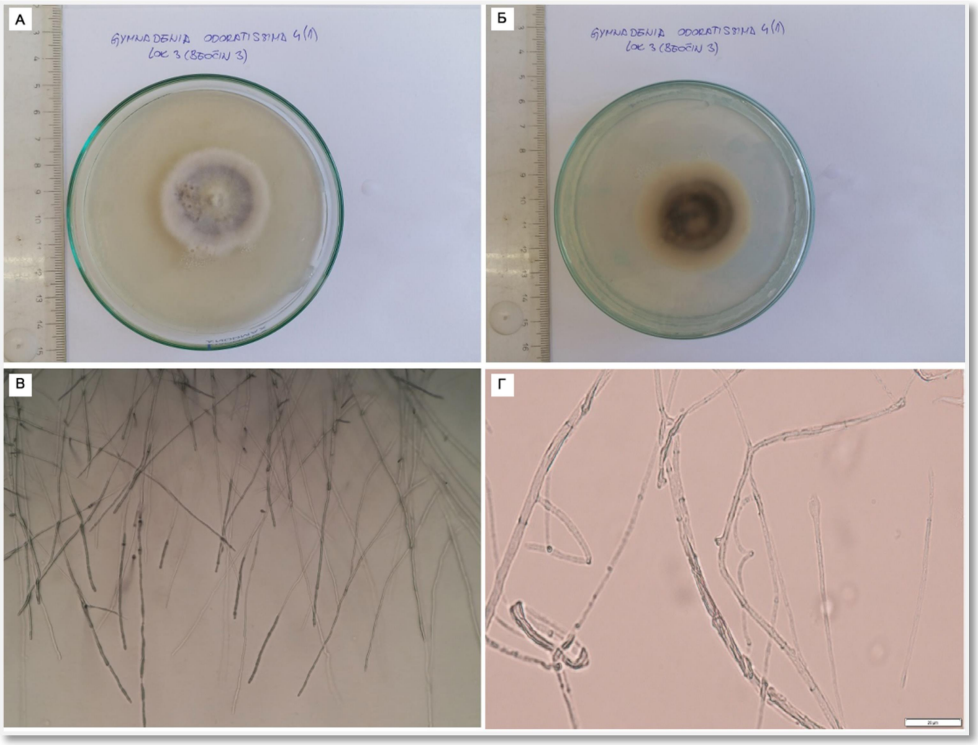
супстратне мицелије у црвенкасту боју као и до формирања склероција на површини изолата.

Иако су други и трећи изолат изоловани са исте јединке, разликују се у боји мицелије и у неуједначеном порасту колоније. Други изолат (Go R 4 (1)) карактерише сиво-бела боја надсупстратне мицелије и жута боја супстратне мицелије (Слика 15). Са друге стране, трећи изолат (Go R 4 (2)) је имао сиво-роза боју надсупстратне мицелије и црну боју супстратне мицелије (Слика 16). Раст колоније се брже одвијао код Go R 4 (2) изолата. Оба изолата су непријатног мириса који асоцира на стајско ђубриво.

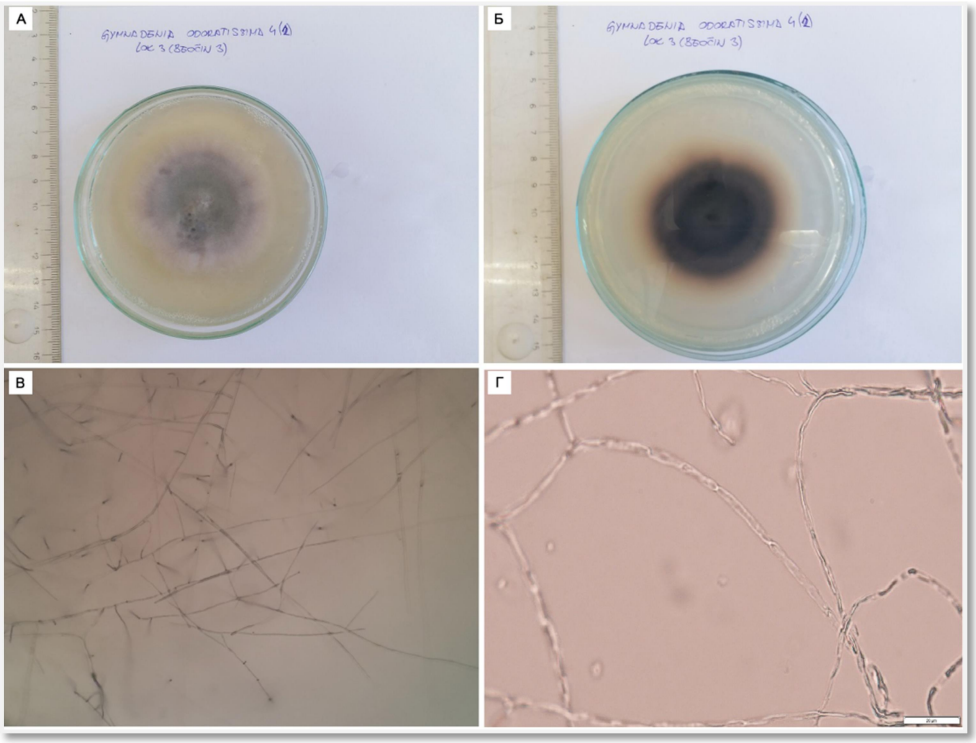
Четврти и пети изолат (Go R 5 (1), Go R 5 (2)) су такође изоловани са исте јединке али се због морфолошких особина вегетативних органа не могу сврстати у исту групу. Четврти изолат је имао беличасту боју надсупстратне мицелије, браон боју супстратне мицелије и није дошло до појаве формирања ексудата, уз присутан мирис налик на шампињоне (Слика 17). Код петог изолата примећен је знатно бржи развој колоније, тамно сива боја надсупстратне мицелије уз присуство ексудата у виду капљица, и црна боја супстратне мицелије (Слика 18). Анализом морфолошких особина колоније 6 недеља након пресејавања код оба изолата је уочено је да је дошло до формирања склероција код оба изолата.



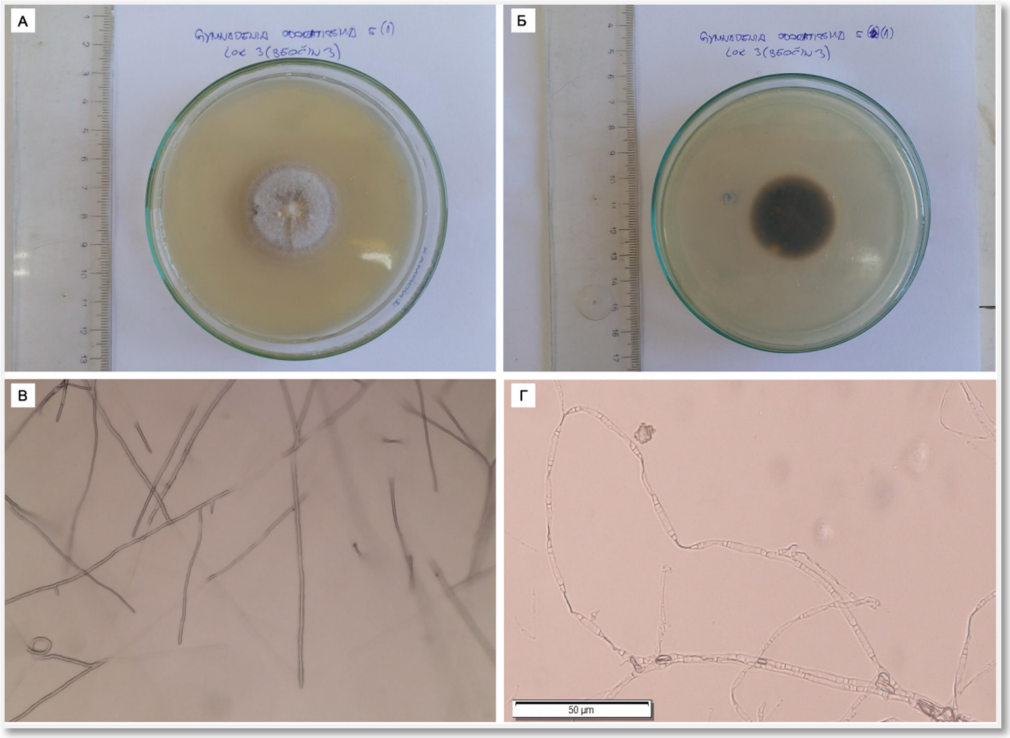
Слика 14. Морфолошке карактеристике изолата изоловане из Go R 1: а) Надсупстратна мицелија; б) Супстратна мицелија; в) Ивица и структура; г) Септиране двоједарне хифе



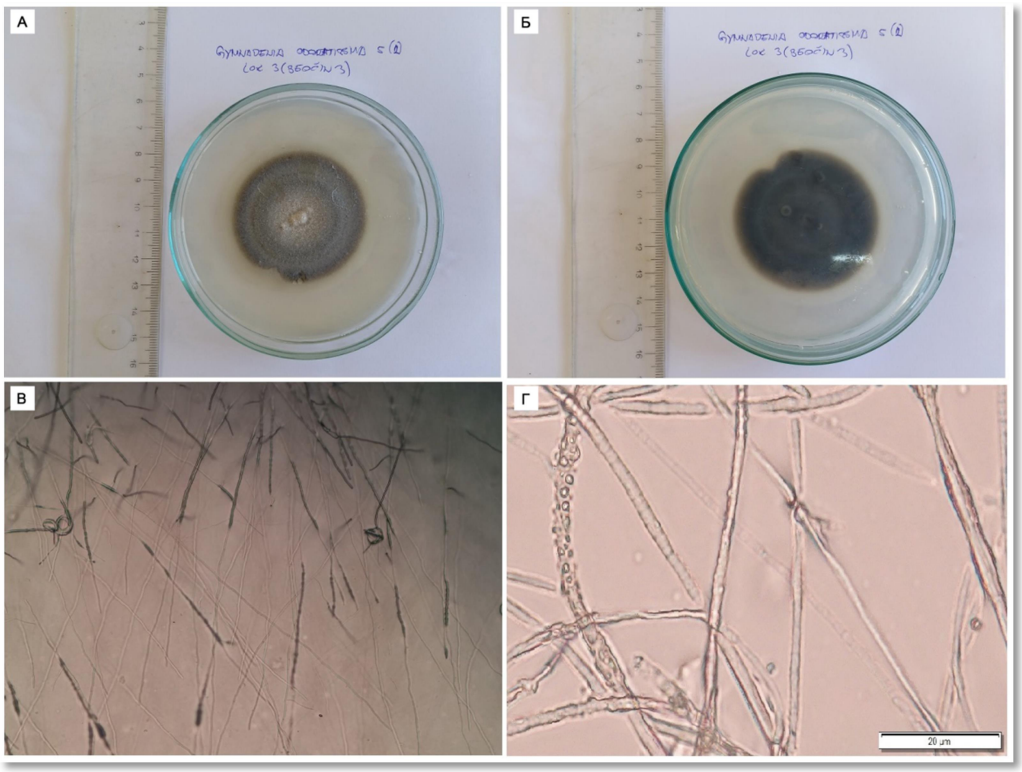
Слика 15. Морфолошке карактеристике изолата изоловане из Go R 4 (1): а) Надсупстратна мицелија; б) Супстратна мицелија; б) Ивица и структура; г) Септиране двоједарне хифе



Слика 16. Морфолошке карактеристике изолата изоловане из Go R 4 (2): а) Надсупстратна мицелија; б) Супстратна мицелија; в) Ивица и структура; г) Септиране двоједарне хифе



Слика 17. Морфолошке карактеристике изолата изоловане из Go R 5 (1): а) Надсупстратна мицелија; б) Супстратна мицелија; в) Ивица и структура; г) Септиране двоједарне хифе



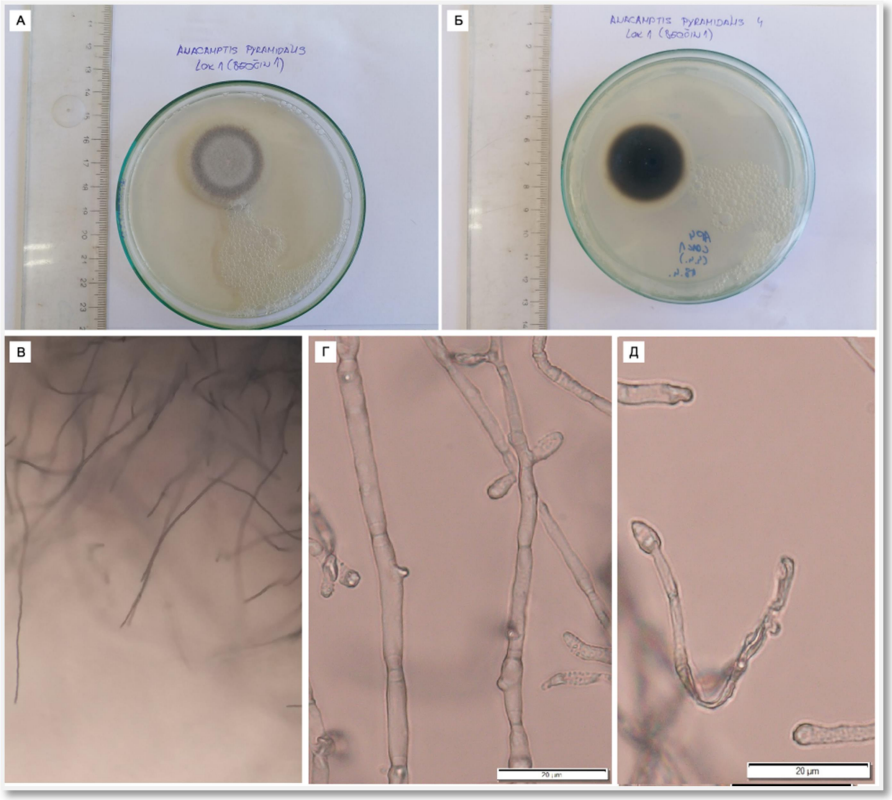
Слика 18. Морфолошке карактеристике изолата изоловане из Go R 5 (2): а) Надсупстратна мицелија; б) Супстратна мицелија; в) Ивица и структура; г) Септиране двоједарне хифе

6.4.3. Гљиве изоловане из кореновог система врста *Anacamptis pyramidalis*, *Ophrys sphegodes*, *Epipactis microphylla*

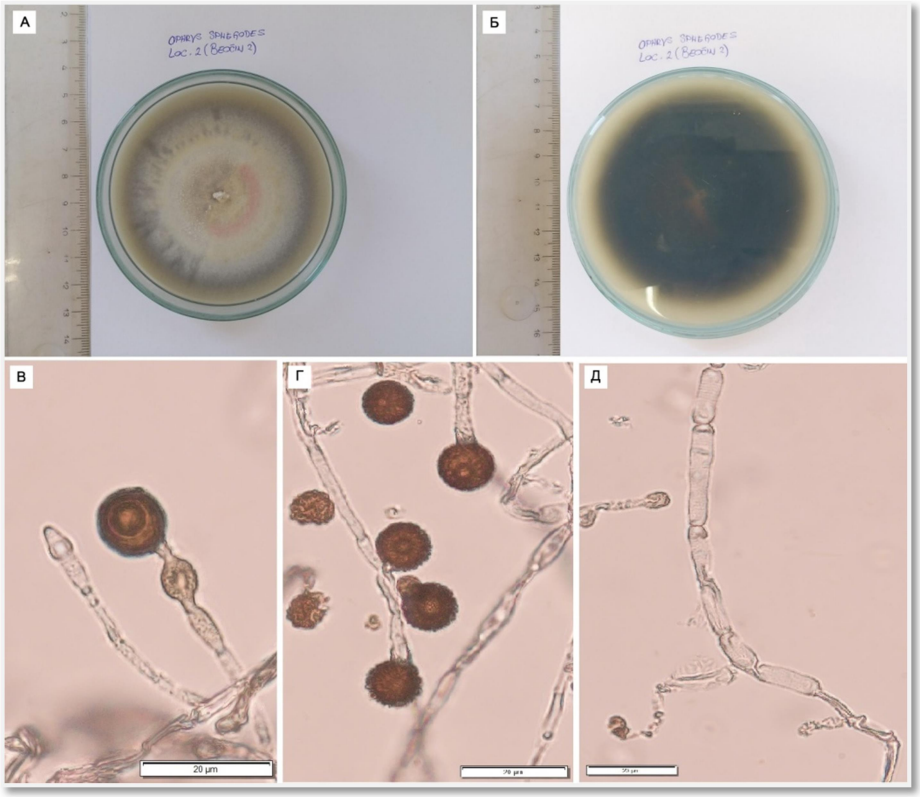
Колонија изолована из корена *A. pyramidalis* (Ap R) има сиву боју надсупстратне мицелије без формирања ексудата и црну боју супстратне мицелије, интензивног мириса (квасци) (Слика 19). Анализом микроскопског препарата уочене су разгранате септиране хифе заобљеног врха и присуство монилиоидних ћелија елипсастог облика. Старењем колоније није дошло до промена изгледа мицелија.

Изолат добијен из корена *O. sphegodes* (Os R) карактерише сиво-жута боја надсупстратне мицелије уз појаву светло роза нијанси, појаве ексудата у виду капљица, и црна боја супстратног мицелија, карактеристичнох мириса (шампињони) (Слика 20). Уочене су септиране хифе заобљеног врха и присуство монилиоидних ћелија које у почетку развоја имају елипсаст облик а касније попримају лоптасту форму. Старењем културе дошло је до формирања склероција.

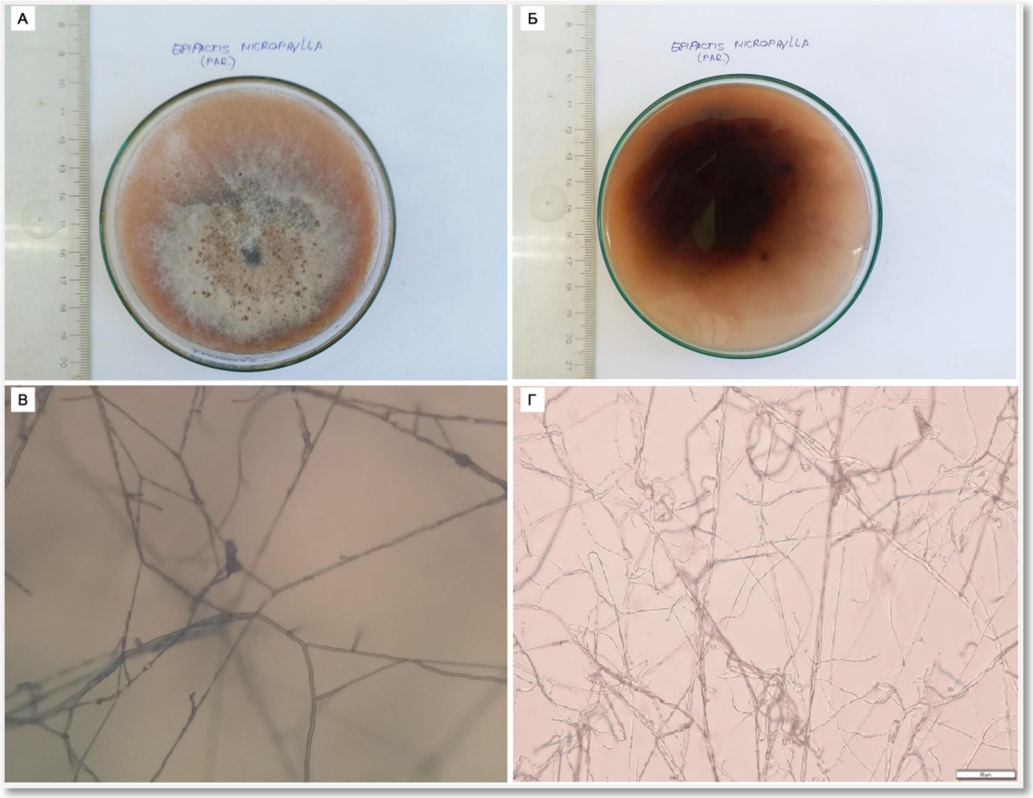
Код изолата добијеног из корена *E. microphylla* (Em R) уочене су значајне разлике мофолошких особина у односу на остале изолате. То се првенствено односи на период неопходан за почетак формирања мицелије. Док је код осталих изолата било потребно 72ч за образовање зачетка мицелије, код изолата Em R је уочено након 12 дана. Међутим, даљи пораст колоније се одвијао знатно брже него код осталих изолата. Боја надсупстратне мицелије на самом почетку је била беличаста, међутим, већ након пар дана дошло је до промене боје надсупстратне и супстратне мицелије у црвену (Слика 21). Мицелију карактерише интензиван мирис на шампињоне. Анализом микроскопског препарата уочене су разгранате, септиране танке и дугачке хифе са заобљеним врхом. Старењем културе дошло је до формирања склероција на површини изолата.



Слика 19. Морфолошке карактеристике изолата Ар R: а) Надсупстратна мицелија; б) Супстратна мицелија; в) Ивица и структура; г) Изглед хифе (х100); д) Монилиоидне ћелије



Слика 20. Морфолошке карактеристике изолата Os R: а) Надсупстратна мицелија; б) Супстратна мицелија; в-г) Монилиоидне ћелије; д) Изглед хифе (х100)



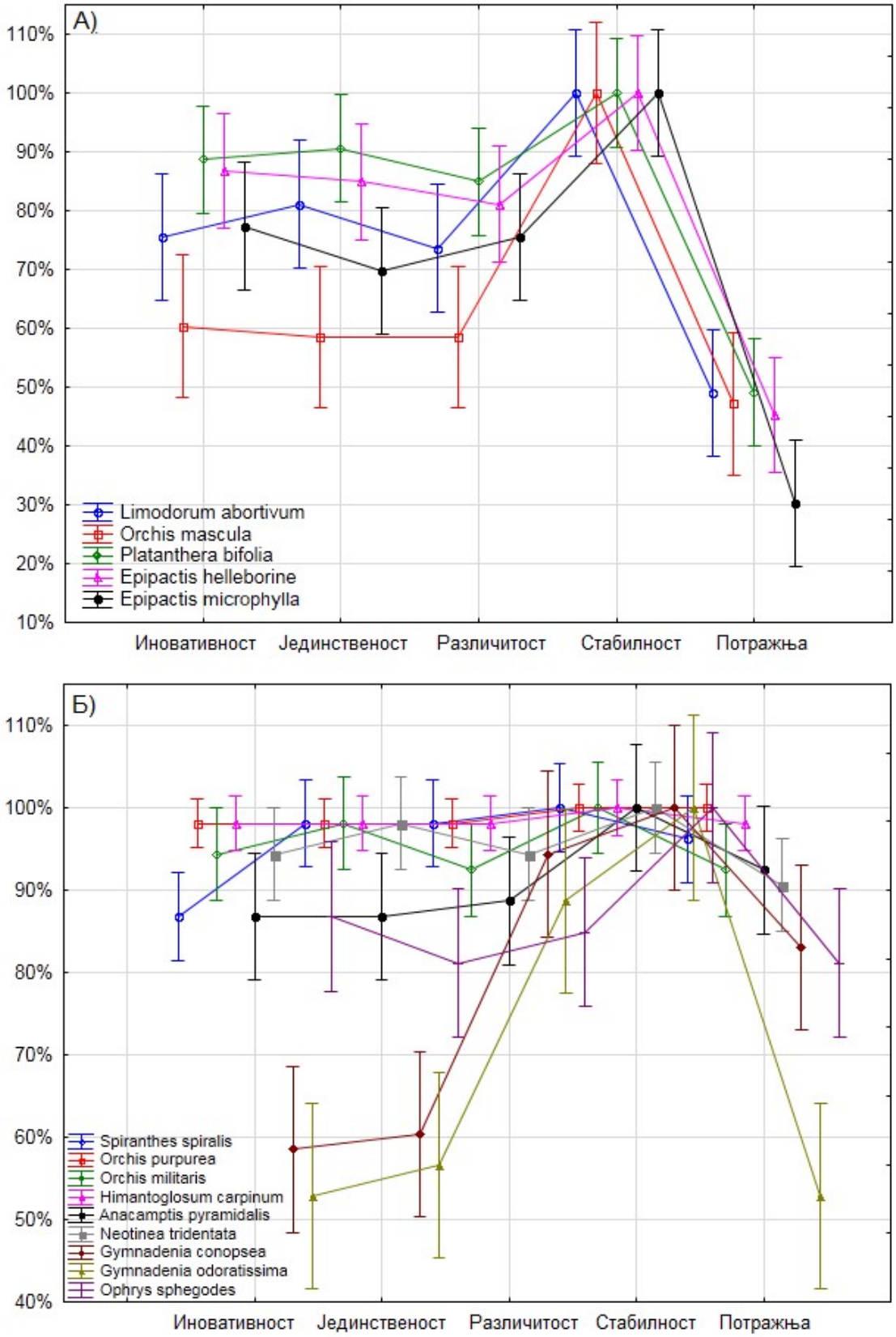
Слика 21. Морфолошке карактеристике изолата Em R: а) Надсупстратна мицелија; б) Супстратна мицелија; в) Ивица и структура; г) Изглед хифе

Табела 20. Приказ морфометријских карактеристика изолата који припадају групи микоризних гљива *Rhizoctonia*

		1. Група	2. Група	3. Група	4. Група	5. Група	6. Група	7. Група	8. Група	9. Група	10. Група	11. Група
Боја	Надсупстратна	Жуто - браон	Сиво - розе	Сиво -жута	Бела	Сиво - зелена	Сиво - црвена	Сива	Црвена	Сиво -бела	Беличаста	Жуто - браон
	Супстратна	Црно – зелена	Црна	Црно - браон	Жута	Црна	Црно - браон	Црна	Црвена	Жута	Браон	Црно – зелена
	Ваздушна	Бела	Бела	Бела	Бела	Бела	Бела	Бела	Бела	Бела	Бела	Бела
Величина		Гигантска	Гигантска	Гигантска	Гигантска	Гигантска	Гигантска	Гигантска	Гигантска	Гигантска	Гигантска	Гигантска
Мирис		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Формирање ексудата		Има	Има	Има	Нема	Има	Има	Има	Нема	Нема	Нема	Има
Облик		Округли	Округли	Округли	Округли	Округли	Округли	Округли	Округли	Округли	Округли	Округли
Присуство монилиоидних ћелија		Има	Присутне	Присутне	Присутне	Нема	Нема	Присутне				Нема
Облик монилиоидних ћелија		Елиптичне	Елиптичне	Елиптичне	Елиптичне	-	-	Округле	-	Елиптичне	Округле	-
Септираност хифе		Присутна	Присутна	Присутна	Присутна	Присутна	Присутна	Присутна	Присутна	Присутна	Присутна	Присутна
Број једара		Двоједарне	Двоједарна	Двоједарна	Доједарна	Двоједарна	Двоједарна	Двоједарна	-	-	Двоједарна	Двоједарне
Изолат		Os R	Go R 4(2)	Go R 5(2)	Gc R 1	Gc R 2(1) Gc R 4	GcR 2(2)	Ap R	EmR	GoR 4(1)	GoR 5(1)	Go R1

6.5. Оцењивање пронађених врста према декоративности

Анкета заснована према методологији „Пет тачака успеха“ (Five points to success) која је спроведена међу испитаницима указује да испитиване врсте терестричних орхидеја могу имати велики потенцијал као нови производ на тржишту. Свака представљена биљна врста је имала више од три позитивне оцене што указује на високу потенцијалну декоративност, а самим тим и заитересованост привреде и потрошача за овим орнаменталним биљним материјалом на тржишту (Графикон 26). Оно што је заједничко за све врсте јесу оцене које показују стабилност, односно потврда да све врсте могу успешно да се гаје у педо-климатским условима Републике Србије и суседних региона. Уколико се упореде резултати између ливадских и шумских врста за остале категорије, испитаници су показали већу заинтересованост за ливадске врсте пре свега због интересантног хабитуса, цветања и обојености цветова. Овакав резултат се посебно истиче код врсте *S. spiralis* коју карактерише интересантан облик цвасти, период цветања (септембар) као и способност да расте на сиромашним земљиштима, која су слабо снабдевена фосфором. Врсте *O. purpurea*, *O. militaris* и *H. jankae* као и A. *pyramidalis* и *N. tridentata* су привукле пажњу испитаника својом висином, атрактивним изгледом и могућности да расту на сувим до релативно влажним теренима док је већина испитаника нагласила да би примену ових врста нашла у баштама и перењацима на јавним површинама. Две врсте које припадају роду *Gymnadenia*, су показале нешто слабији резултат у односу на остале ливадске врсте. Наиме, *G. conopsea* и *G. odoratissima* су добиле високе оцене за изглед цвасти и интензиван и пријатан мирис, међутим, добиле су нешто ниже оцене за атрактивност што их чини мање јединственим на тржишту. За врсте које расту у пределима прекривене шумском вегетацијом (*L. abortivum, O. mascula, P. bifolia, E. helleborine, E. microphylla*), четири од пет критеријума је позитивно оцењено, али са мањим процентом афирмативних одговора за тржишну иновативност, јединственост и различитост (дистинктивност) која варира између 58% и 91%. Такође, шумске врсте су оцењене са знатно нижим степеном атрактивности, што је директно утицало на резултат који указује на ниске потенцијалне потребе тржишта за овим биљним врстама (30 - 49% позитивних одговора).



Графикон 26. Рангирање тржишног потенцијала: а) врсте мапиране у шумској фитоценози; б) врсте мапиране на ливадама и обронцима шума

7. ДИСКУСИЈА

7.1. Биодиверзитет терестричних орхидеја Фрушке горе, морфологија и цитологија испитиваних врста

Фамилија Orchidaceae је разнолика и широко распрострањена породица цветница, које имају велику вредност у хортикултурним, медицинским, конзервационим и еволутивним истраживањима.

Фрушка гора представља природно станиште великог броја терестричних орхидеја и због тога је од изузетне важности утврдити биодиверзитет, услове окружења и евентуалне недостатке у *in situ* популацијама, који могу бити од значаја за њихову конзервацију, као и укључивање истих у програме оплемењивања. Велики број врста који је евидентиран током трогодишњег истраживања указује на велики диверзитет облика, величина и боја листова и цветова које представљају широку лепезу за селекцију орнаменталних карактеристика које имају изузетну комерцијалну вредност. Међутим, уочени су и бројни недостаци који се огледају у величини и фрагментацији популација као и високом степену угрожености. Иако је већина популација ливадских врста окарактерисана као стабилна, локалитети на којима су настањене ове врсте налазе се ван граница Националног парка. Самим тим, ови локалитети су изложени различитим негативним антропогеним факторима, што се директно одражава на дистрибуцију и распрострањеност популација. Са друге стране, популације шумских врста се састоје од малог броја јединки, одликују се великом удаљеношћу од осталих популација што према наводима Jacquemyn et al. (2006) доводи до смањене могућности опрашивања, а самим тим и до смањене могућности оплодње. Током трогодишњег истраживања, врсте *E. microphylla*, *P. bifolia*, *H. jankae*, *L. abortivum* и *O. mascula* евидентиране су само на једном локалитету, те су због веома малог броја јединки, популације ових врста оцењене катерогијом „Близу изумирања“. Слично стање је уочено и код вста *O. purpurea* и *E. helleborine* чије су мале и фрагментисане популације мапиране на неколико локалитета. Према наводима Lienert (2004) мале популације имају повећан ризик од изумирања пре свега због различитих типова генетичког дрифта, као и због инбридинга, што се може негативно одразити на опстанак јединке, али и целе популације. Поред тога, инбридинг ерозија и смањена генетичка дивергентност између популација утичу на недовољан проток (размену) гена између

популација и на тај начин смањују потенцијал опстанка популације (Young et al. 1996; Honnay and Jacquemyn 2007; Aguilar et al. 2008). Такође, код ових малих и фрагментисаних популација (изузев код врсте *H. jankae*), био је приметан знатно мањи број формираних чаура, док је из истих установљен низак проценат виабилног семена. Овај резултат указује да се величина популација и инбридинг депресија негативно одражавају на виабилност и клијавост семена. Слично запажање је установљено и код врста *Platanthera integrilabia, Platanthera clavelatta, Dactylorhiza sambucina* и *Calopogen tuberosus* (Zettler and McInnis, 1992; Zettler and Hoffer, 1998; Kauth et al. 2008).

Укупан генофонд који се налази у склопу евидентираних врста представља квалитетну основу за укључивање терестричних орхидеја у програме оплемењивања. Врсте обухваћене овом дисертацијом показале су велику разноликост како на станишту које настањују тако и по морфолошким особинама од којих се највише истичу особине листа и цвета, као и особине које дефинишу хабитус. Применом одговарајућих статистичких анализа, као што су анализа главних компоненти и кластер анализа, јасно може да се добије стварни морфолошки и генетички диверзитет унутар и између популација (Aremu 2017). Анализом главних компоненти утврђено је да прве три компоненте објашњавају преко 60% варијабилности. Као најзначајније особине издвојиле су се особине ширина листа, облик листа, боја листа, дужина листа, број боја спољашњег круга цветног омотача, облик листића унутрашњег круга цветног омотача, висина стабла, дужина цвасти, положај цветне дршке.

Квантитативне особине цвета показале су да постоје значајне разлике између врста, међутим, нису уочене статистички значајне разлике између популација унутар исте врсте. Овакав резултат је потврдила и мултивариациона дискриминантна анализа што указује да су карактеристике цвета, најважније орнаменталне особине, биле фактор раздвајања између врста. Популације *L. abortivum* и *H. jankae* су показале велику хетерогеност и високо варирање својстава што их чини удаљеним од свих група. Овакав резултат се објашњава морфометријским особинама цвета (висина, ширина), имајући у виду да су поменуте две врсте имале знатно већу ширину цвета (*L. abortivum*) и висину цвета (*H. jankae*). Такође, анализом је установљено груписање популација према особинама цвета у оквиру истих врста (*G. conopsea*, *A. pyramidalis*, *O. militaris*, *O. purpurea*) што потврђује стабилност ових особина.

Класификација врста на основу цитолошких особина урађена је помоћу мултивариационе кластер анализе, и том приликом је дошло до јасног груписања врста унутар истих родова *Gymnadenia* (*G. conopsea*, G. *odoratissima*) и *Orchis* (*O. militaris*, *O.*

purpurea). Иако не припадају истим родовима, чак ни истим потфамилијама, врсте *O. mascula*, *E. microphylla* и *A. pyramidalis* су груписане у исти кластер због врло сличних цитолошких особина, односно величине генома. Слично групуписање је забележено и код врста *O. sphegodes*, *N. ustulata*, *P. bifolia* и *S. spiralis*. Код већине врста приликом мерења величине генома дошло је до мултиплипликовања пикова (Прилог 8-19) што према наводима Travnicek et al. (2015) може бити последица ендорепликације која је карактеристична за фамилију *Orchidaceae*. Ендорепликација се најчешће одвија у ткивима за магационирање и апсорпцију хране (корен и лист) и на тај начин доприноси повећању површине за апсорпцију воде (Kondorosi et al., 2000).

Резултати који представљају плоидност и бројност хромозома у оквиру пронађених врста приказују да су скоро све пронађене врсте диплоиди. Изузетак чине *C. longifolia* за коју није успешно изведено утврђивање броја хромозома, али према наводима Moscone et al. (2007) закључује се да се ради о тетраплоиду, и врста *L. abortivum* код које у плоднику утврђен хаплоидан број хромозома n=24. Према наводима Marhold et al. (2005) и Hedren et al. (2000) код врста *G. conopsea* и *G. odoratisima* су пронађене популације са диплоидним, тетраплоидним и октаплоидним јединкама. Међутим, резултати добијени у овим истраживањима указују да је у популацијама ових врста присутан само диплоидни број хромозома (2n=40). Такође, D'emerico et al. (1993) су код врсте *A. pyramidalis* утврдила диплоидне, триплоидне и тетрапллоидне јединке код којих је доказано да полиплоидност утиче на боју цвета. Овај резултат се поклапа и са резултатима добијених током ових истраживања, где је установљен диплоидан број хромозома (2n=36) код популација са љубичастим цветом. Иако је утврђена иста плоидност код већине испитиваних врста, јасно је уочена разлика у броју хромозома између врста. Тако је код врста из рода *Gymnadenia* установљено да имају 2n=40, затим *A. pyramidalis* и O. *sphegodes* 2n=36, *O. mascula*, *O. purpurea*, *O. militaris*, *N. ustulata* и *P. bifolia* 2n=42.

7.2. Едафске особине станишта испитиваних врста

Како терестричне орхидеје припадају групи биљака које расту и на земљишту, анализирањем геолошке подлоге као и испитивањем педолошког састава земљишта, добијена је јасна слика карактеристика станишта терестричних орхидеја и смернице потенцијалне примене на стаништима у урбаним срединама. Геолошка подлога и хемијска анализа земљишта ($CaCO_3$ и pH реакција земљишта) јасно разграничавају станишта и заступљеност терестричних орхидеја. Према наводима Rasmussen (1995) реакција земљишта утиче на распростањеност орхидеја из умереног климата. Централним делом Фрушке горе, а у оквиру којег се налазе локалитети Змајевац 1, Змајевац 2 и Раковац доминирају метаморфне, магматске и седиментне стене. Супротно њима, локалитети који се налазе на северним обронцима планине (Беочин 1, Беочин 2, Беочин 3, Главица и Парагово), а које настањују *A. pyramidalis*, *G. conopsea*, *G. odoratissima*, *O. militaris*, *O. purpurea*, *N. tridentata*, *O. sphegodes*, *O. scolopax*, *N. ustulata*, *H. jankae* и *E. microphylla,* чине далеко млађе седиментне стене у чијој грађи у великом проценту учествују карбонати. Овај резултат је потврђен и кроз хемијску анализу земљишта, односно кроз садржај карбоната у земљишном раствору. У оквиру ових локалитета утврђен је висок садржај $CaCO_3$ и неутрална до благо алкална реакција земљишта. Према наводима Belić et al. (2014) садржај $CaCO_3$ у земљишту утиче на pH реакцију земљишта тако што изазива благо алкалну реакцију, што објашњава повезаност добијених резултата. Са друге стране, у земљишту узоркованом са локалитета Змајевац 1, Змајевац 2 и Раковац није забележено присуство карбоната, што се такође одразило на киселост земљишта. Ови локалитети представљају природно станиште врста *E. helleborine*, *P. bifolia*, *C. longifolia*, *L. abortivum* и *O. mascula.* Добијени резултат се поклапа са наводима Robatsch (1983) и Harp and Harp (2005) да врсте *E. helleborine* и *P. bifolia* настањују земљишта киселе до неутралне реакције док преостале три врсте могу да поднесу киселу до алкалну средину (Summerhayes 1951; Rackham 2003; Harp and Harp 2005).

Добра обезбеђеност земљишта хумусом настаје као последица распадања биљних и животињских остатака Belić et al. (2014). Висок садржај хумуса у земљишту се одразио и на висок садржај азота. Иако према наводима групе аутора (Harp and Harp 2005; Rossi, 2002) већина испитиваних врста има способност да расте на сиромашним земљиштима, резултати приказани у овој дисертацији показују да сви локалитети имају висок садржај хумуса и азота што указује на добру обезбеђеност органском материјом.

Чињеница да је узорковање земљишта вршено из површинских слојева земљишта, те да су сви локалитети били прекривени бујном вегетацијом (шумска или ливадска), објашњава резултат добре обезбеђености земљишта органском материјом.

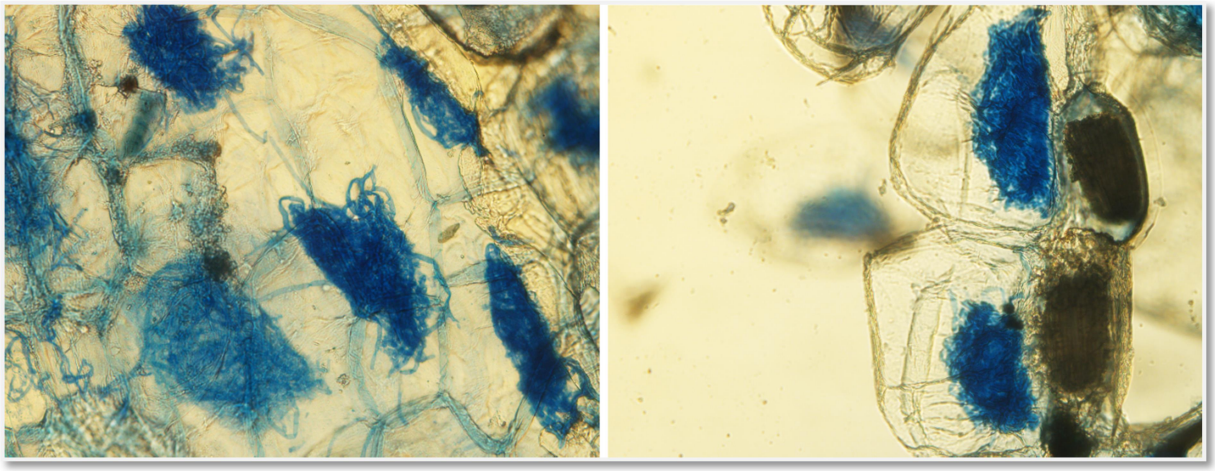
7.3. Изолација и морфолошка карактеризација микоризних гљива

Микоризна асоцијација има многе бенефите на врсте које припадају фамилији орхидеја. Веза између гљиве и орихдеја развија се у најранијем стадијуму животног циклуса, пре клијања семена, снабдева семе са изворима угљеника и азота и иницира формирање протокорма, а касније и сејанца. Међутим, неке врсте орхидеја живе у симбиози током целог животног циклуса (Abadie et al., 2006; Rasmussen and Rasmussen, 2007).

Изолација гљива из кореновог система обухватила је 7 врста терестричних орхидеја. Успешна изолација је успостављена из 5 врста из којих је изоловано 12 изолата, које су на основу морфолошке карактеризације груписани у 11 група. Присуство гљива у кореновом систему је утврђено код врста *G. conopsea* (4 изолата), *G. odoratissima* (5 изолата), *A. pyramidalis* (1 изолат) *E. mycrophyla* (1 изолат) и *O. sphegodes* (1 изолат). Особине које су заједничке код свих изолата јесу величина колоније (гигантска), облик (округли) и боја ваздушне колоније (бела). Такође, код свих изолата, изузев *E. mycrophyla*, уочено је да имају широке, двоједарне, септиране хифе, што су према наводима Snech et al. (1991) и Rasmussen (1995) најчешће карактеристике рода *Rhizoctonia* која живи у симбиози са орхидејама.

Из кореновог система врста које припадају роду *Gymnadenia* изолован је највећи број изолата, који се највише разликују по боји мицелије и присуству монилиоидних ћелија. Монилиоидне ћелије, чије се присуство проверавало две недеље након пресејавања чисте културе, су евидентиране код изолата Gc R1, Gc R4, Go R4(1) и Go R5(2) док се боја мицелије разликовала код сваког изолата. Иако се за врсте *G. conopsea* и *G. odoratissima* сматра да су аутотрофне, према наводима Rasmussen (1995) врсте из овог рода задржавају асоцијацију са микоризним гљивама са којима су успоставиле симбиозу пре клијања. Такође, група аутора Stark et al. (2009) наводе да врсте врста *G. conopsea* може остварити симбиозу са различитим групама гљива укључујући базидомицете (*Tulansella, Ceratobasidium, Thanatephorus, Sebacina*), затим ектомикоризу са групом која пропада реду *Pezizales* (*Peziza, Terfezia, Morchela, Geopyxis* и *Wilcoxina*) и ендофитним аскомицетама (*Exophiala, Fusarium, Leptodontium* и

Tetacladium). Резултати морфолошке карактеризације изолата добијених у овој дисерацији указују да изоловане гљиве припадају само роду *Rhizoctonia* (Слика 22) међутим, за прецизнију идентификацију је неопходно урадити молекуларну карактеризацију изолата.



Слика 22. Колонизација ендофитних гљива из рода *Rhizoctonia* у ћелијама корена *G. conopsea* евидентирана на микроскопу Olimpus BX-50

Такође, на основу анализе морфологије културе и микроскопских препарата установљено је да изолати изоловани из врсте *O. sphegodes* (Os R) и *A. pyramidalis* (Ap R) припадају групи *Rhizoctonia.* Код обе културе је евидентирано присуство септиране хифе и монилиоидних ћелија, као и формирање склероција. Према наводима Rasmussen (1995), код врсте *A. pyramidalis* није евидентирано присуство ендофитних гљива. Међутим, студије новијег датума (Girlanda et al., 2011) указују да врсте из овог рода често живе у симбиози са гљивама из рода *Rhizoctonia* (*Tulanselaceae* и *Ceratobasidaceae*) што се поклапа са резултатима добијеним у овој дисертацији. Резултати добијени у овом истраживању као и наведена литература указују да иако су ове врсте аутотрофне и способне да врше фотосинтезу стварајући себи на тај начин храну, истовремено се снадбевају и угљеником који усвајају помоћу посредника – ендомикоризе. На основу свега наведеног, може се претпоставити да је реч о миксотрофним врстама, међутим, даља истраживања из ове области су неопходна.

Супротно овим изолатима се издваја изолат из корена *E. microphylla* који се значајно разликовао према фенотипским карактеристикама мицелије од осталих изолата. Анализом микроскопског препарата су установљене септиране хифе значајно тање од осталих изолата. На основу морфолошких особина није могуће утврдити да ли

изолована гљива припада роду *Rhizoctonia* или неком другом типу микоризе. За разлику од осталих врста, према наводима Selosse et al. (2004) гљиве које живе у симбиози са овом врстом не припадају групи ендомикоризе (*Rhizoctonia*) него групи ектомикоризе, што на неки начин објашњава различитост између изолата.

7.4. Асимбиотско клијање семена

Клијање семена представља један од најважнијих тренутака у животном циклусу сваке биљне врсте и директно је зависно од утицаја спољашње средине. Како би се успешно успоставило асимбиотско клијање семена у *in vitro* условима, потребно је свакој врсти орхидеја прилагодити услове и кроз хранљиву подлогу им обезбедити све нутријетне неопходне за подстицање физиолошких процеса за клијање, а који се у природним условима одвијају само уз помоћ симбиозе са микоризним гљивама. *In vitro* клијање семена испитиваних врста било је условљено и од стране хранљиве подлоге и од стране осветљења.

Огледом је обухваћено наклијавање семена узоркованог у две различите фазе зрелости, недозрело и зрело семе. Резултати добијени у овом истраживању су показали да је за асимбиотско *in vitro* клијање семена погодније зрело семе, поготово ако су у питању мале популације и ограничена количина семена. Током огледа је дошло до великог развоја инфекције у склопу огледа који је обухватао недозрела семена. Овакав резултат је супротан наводима Light and MacConaill (1998) који тврде да се применом недозрелог семена појава инфекције смањује на минимум. Такође, код преосталог семена које није било захваћено инфекцијом није успостављено клијање семена. Изостанак клијања семена се јавља уколико се чаура са семенима убере пре него што се ембрион довољно развије и оспособи за клијање. Због тога је неопходно редовно пратити фенологију развитка плодова и за сваку врсту одредити оптимални временски период који је потребан да прође од оплодње до скидања чауре. Овакав поступак није погодан уколико је реч о малим популацијама и ограниченим количинама плодова, услед могуће ерозије генетичких ресурса датих популација и врста. Са друге стране, одређивање периода сакупљања зрелог семена се врши на основу морфолошког изгледа чауре, односно онда када чаура добије браон боју. Сакупљено семе може да се складишти дужи временски период на ниским температурама приликом чега се прекида физиолошка дормантност семена. Одабиром одговарајућих хемикалија за

стерилизацију и стањивањем семењаче, успешно је превазиђена и морфолошка дорматност, што је основни услов за подстицање клијања семена. Овакав резултат се поклапа са Van Waes and Debergh (1986) и Valletta et al. (2008) који су постигли знатно бољи проценат клијавости код семена која су третирана агенсима на бази хипохлорита.

Снабдевање минералима преко хранљиве подлоге представља најважнији тренутак у култури ткива. Због тога је од изузетне важности одредити нутријенте који погодују органогнези, односно у овом случају клијању семена и формирању клице и коренка. Према наводима групе аутора (Znaniecka and Lojkowska, 2004; Mahendran et al., 2013; Dulić et al., 2019) не постоји хранљива подлога која погодује свим врстама терестричних орхидеја, већ се свакој врсти морају прилагодити одговарајући нутријенти. У овом истраживању, хранљиве подлоге које су коришћене као основа, састоје се од сличних основних компоненти, односно, садрже макроелементе, микроелементе, угљене хидрате и гелирајући агенс. Међутим, основна разлика се огледа у саставу и садржају макроелемената, микроелемената, витамина, од којих се највише истиче садржај приступачних облика азота. Наиме, ММ хранљива подлога садржи органски азот у облику глицина и казеин хидролизата, док КС медијум садржи неорганski, односно амонијачни и нитратни облик азота. Анализом резултата запажа се да је код већине врста (*A. pyramidalis*, *G. conopsea*, *H. jankae*, O. *sphegodes* и *O. militaris*) клијавост успостављена на медијуму који садржи органске облика азота. Уколико се упореде резултати клијања на медијумима који нису били обогаћени суплементима (контрола) може се запазити да је клијавост код свих поменутих врста успостављена само на ММ-К медијуму, док код семена посејаних на КС-К није дошло до клијања. Добијени резултат указује на позитиван утицај органских облика азота, односно инхибиторни утицај амонијачног и нитратног облика азота на клијање семена наведених врста.

Додавањем органских суплемената постигнут је знатно већи проценат клијања док је временски период потребан за формирање протокорма и развитак сејанца скраћен. Тако се од свих испитиваних комбинација највише истичу ММ хранљива подлога обогаћена са PE (за врсте *O. sphegodes*, *O. militaris*, *H. jankae*), CW (*A. pyramidalis*, *G. conopsea*, *H. jankae*, *O. sphegodes*) или А (*H. jankae*, O. *sphegodes*). Група аутора Kitsaki *et al*. (2004) су у својој студији приказала сличан резултат где је највећи проценат клијања врста које припадају роду *Ophrys* постигнут на ММ-CW медијуму.

Позитиван утицај органских суплемената (кокосова вода и казеин) на клијање утврђен је и код врста *Cypripedium macroanthos*, *Eulophia nuda*, *Rhynchostylis retusa*,

Cymbidium elegans, Paphiopedilum liemianum (Kumar et al. 2002; Nanekar et al., 2014; Utami et al., 2015; Huh et al., 2016). Како су сви истакнути суплементи извори органског облика азота са високим садржајем амино киселина, може се претпоставити да је клијање поменутих врста зависно од аминокиселина. Супротно овим резултатима истичу се резултати добијени на KC медијуму где није забележено клијање семена код врста *O. sphegodes*, *O. militaris* и *A. pyramidalis*, док је код врста *G. conopsea* и *H. jankae* постигнут веома мали проценат клијања на истом медијуму обогаћеног са суплементима. Инхибиторно деловање KC хранљиве подлоге може се објаснити садржајем неорганских облика азота који према Ponert et al. (2013) спречава клијање семена врсте *Pseudorchis albida*. Сличан утицај је установљен и код врсте *Limodorum abortivum* где није успостављено клијање семена на медијуму који садржи амонијачне и нитратне соли (Sgarbi et al. 2009), што указује на негативни утицај ових једињења на клијање семена терестричних орхидеја. Присуство неорганских облика азота има инхибиторно дејство на клијање семена највероватније као последица слабе активности нитратне редуктазе током клијања семена и раног развоја протокорма (Malmgren 1992; Raghavan and Torrey 1964; Van Waes and Debergh 1986).

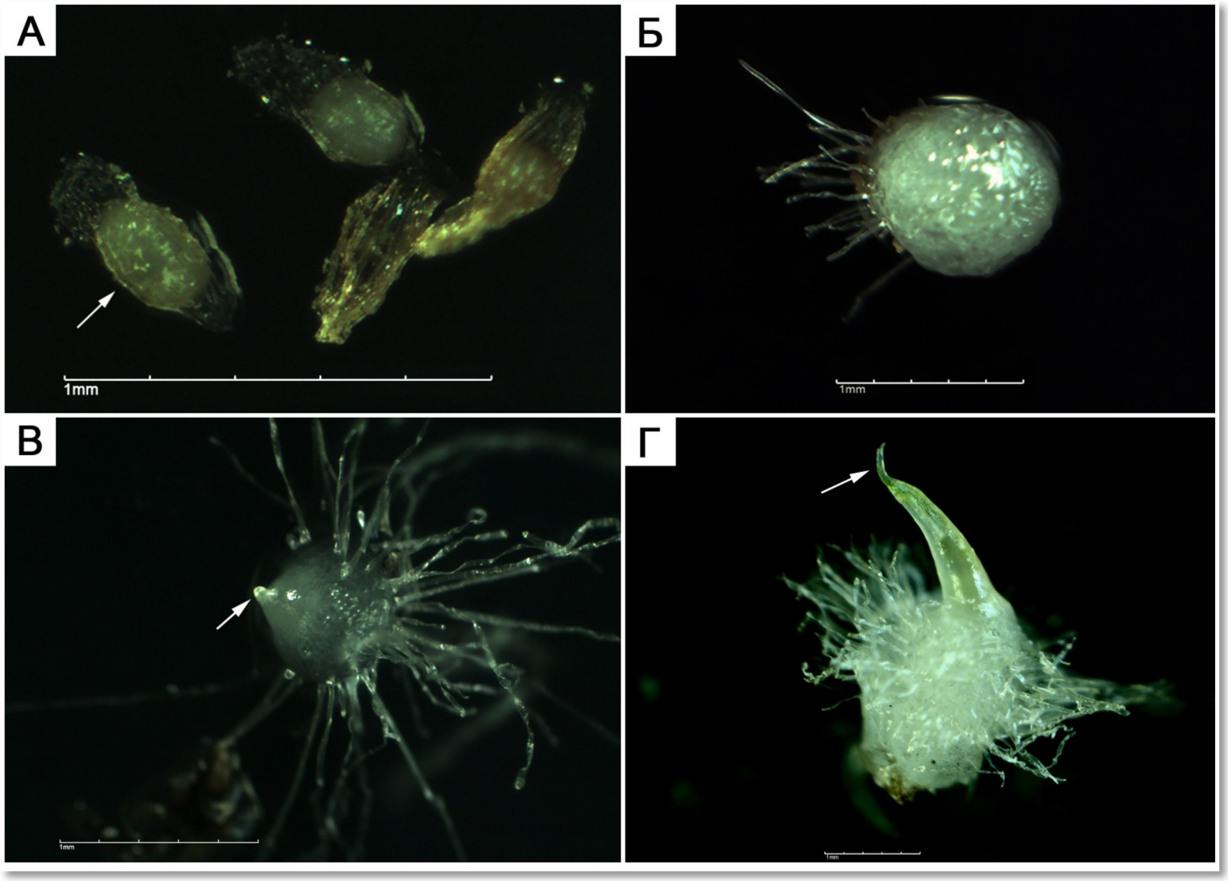
Међутим, постоје врсте терестричних орхидеја код којих присуство неорганских облика азота у хранљивој подлози нема инхибиторно дејство на клијање и постиже се једнако добра, или чак боља клијавост него на медијуму који садржи аминокиселине. Међу њих спадају *Encyclia boothiana* var. *erythronioides*, *Calopogon tuberosus* и *Blatia purpurela* (Stenberg and Kane 1998; Kauth et al., 2006; Dutra et al., 2008). Анализом резултата *S. spiralis* се истиче као врста која је показала способност да клија на обе хранљиве подлоге, односно, почетак клијања и формирање протокорма се интензивније одвијало на KC-CW медијуму, док је за даљи развитак сејанца више погодовала MM-PE хранљива подлога. Поједини аутори висок проценат клијавости на KC хранљивој подлози објашњавају високим садржајем амонијум јона у односу на нитратне јоне, који могу бити искоришћени од стране семена на самом почетку клијања (Spoerl and Curtis 1948; Stenberg and Kane 1998; Kauth et al. 2006). KC хранљива подлога обогаћена са CW иницирала је висок степен клијања што се може објаснити садржајем и саставом кокосове воде. Наиме, поред високог садржаја аминокиселина, једна од најважнијих и најкориснијих компоненти кокосове воде јесу цитокинини који подстичу деобу ћелије и на тај начин подстичу бржи раст и развој (Kende and Zeevaart, 1997; Yong et al, 2009). Сличан резултат су добили и Huh *et al*. (2016) наклијавањем семена врсте *Cypripedium macranthos* Sw. на MS хранљивој подлози која у свом основном

саставу такође садржи неорганске облике азота, где је највиши проценат клијавости као и формирања протокорма постигнут на медијуму који је обогаћен са CW. Ови резултати указују да КС хранљива подлога обогаћена са одговарајућим органским суплементом може представљати најпогодније окружење за клијање семена *S. spiralis*.

Средином XX века је примећено да семена појединих врста не могу да клијају уколико се не осветле, и поред тога што су сви остали услови неопходни за клијање обезбеђени (Nešković et al., 2010). Осветљење представља абиотички фактор који није довољно истражен када су у питању терестричне орхидеје. Док већина аутора сматра да услови потпуног мрака иницирају клијање семена терестричних орхидеја умереног климата (Rasmussen and Rasmussen 1991; Fukai *et al*. 1997; Stewart and Kane 2006; Godo *et al*. 2010), постоје литературни наводи који тврде да се потребе семена за осветљењем разликују од врсте до врсте (Arditti et al., 1981). Повезаност клијања и осветљења често није добро сагледана у научним радовима те због тога није до краја објашњена. Због тога су потребна даља истраживања на ову тему као и утврђивање и прилагођавање услова осветљења свакој биљној врсти. Резултати добијени током овог истраживања показују да услови осветљења немају велики утицај на нулту фазу клијања семена већине испитиваних врста. Међутим, даље фазе развоја, као што су формирање протокорма, ризоида и вршног пупољчића, су успешно успостављене у условима потпуног мрака код врста *H. jankae* (Слика 23)*, O. militaris, G. conopsea, A. pyramidalis и O. sphegodes*. Са друге стране, услови осветљења 16/8 C/M имали су позитиван утицај на клијање семена врсте *S. spiralis.* Краћи временски период потребан за формирање протокорма, већи проценат формирања ризоида и пупољчића као и формирње првог и другог листа представљају главне показатеље повољног утицаја осветљења на клијање семена ове врсте. Добијени резултати се поклапају са претходно објављеним наводима Arditti et al. (1981) и Kauth et al. (2008), потврђујући да се потребе семена за осветљењем током клијања разликују од врсте до врсте.

Различити услови осветљења који погодују герминацији семена испитиваних врста могу се довести у везу са њиховим природним стаништем односно вегетацијом којом су окружене као и физиолошким особинама семена саме врсте. Врсте *H. jankae, O. militaris, G. conopsea, A. pyramidalis* и *O. sphegodes* настањују полусеновита подручја као што су обронци шума, површине прекривене жбунастом вегетацијом и ливаде (Harp and Harp, 2005; Molnár et al., 2012; Jacquemyn et al., 2015; Stroh, 2016; Shang et al., 2017). Врсте које су заступљене на овим локалитетима углавном су изложене великим количинама далеке инфрацрвене светлости. Семена која су изложена далекој

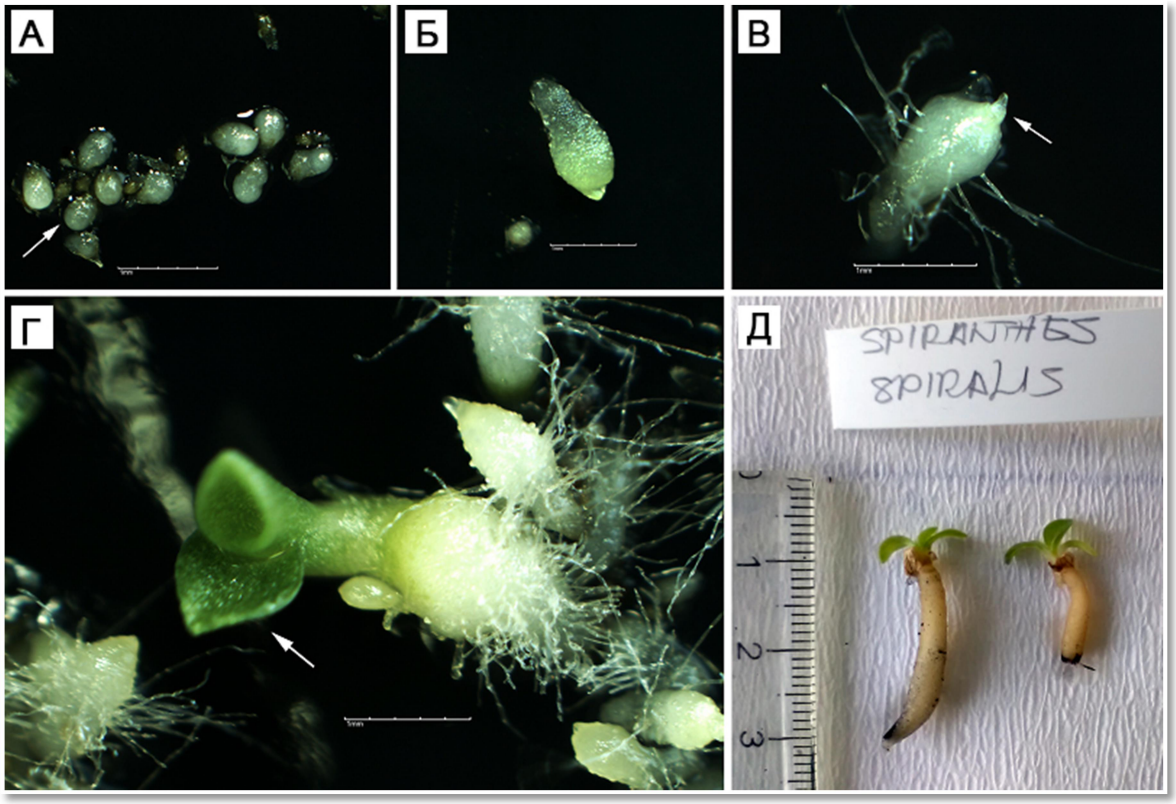
инфрацрвеној светлости конвертују фитохром у Pr облик и на тај начин инхибирају клијање (Rasmussen and Rasmussen 1991; Anjah *et al*. 2003). Прекривањем површинским слојем земљишта, семена избегавају инхибиторни ефекат сунчеве светлости и постижу топлотну стабилност погодну за клијање. Имајући у виду да су у лабораторијским *in vitro* условима семена изложене светлости флуоресцентних лампи које емитују велике количине црвеног спектра (Toole 1963), као и да у датим условима није успостављено клијање семена, може се извести закључак да врсте *H. jankae, O. militaris, G. conopsea, A. pyramidalis* и *O. sphegodes* имају негативно фотобластично семе.



Слика 23. Развојни циклус сејанца врсте *Himantoglossum jankae* од ембриона до формирања лисног пупољчића успостављен у условима потпуног мрака: а) Бубрење ембриона; б) Формиран протокорм са ризоидима; в) Формирање вршног пупољчића; г) Зачетак листа (Dulić et al., 2019)

За разлику од осталих врста, семе *S. spiralis* је показало да има способност да исклија у оба режима осветљења (0/24 C/M и 16/8 C/M) (Слика 24). Сличан резултат је објавила група аутора Kauth *et al*. (2006) за врсту *C. tuberosus* код које је приближно

једнако клијање успостављено и током светле и током тамне инкубације. Способност семена да клија у свим условима осветљења објашњено је од стране америчког ботаничара Stoutamire (1964, 1974) који је утврдио да семена врста које настањују неосенчена подручја могу у кратком временском периоду постати фотосинтетичка под флуоресцентним осветљењем. Имајући у виду да је природно станиште врсте *S. spiralis* ограничено на осунчане ливаде које настањује ниска и не тако бујна вегетација, (Rasmussen, 1995; Jacquemyn and Hutchings, 2010) семена су изложена директном утицају црвеног осветљења. Како црвено светло, емитовано од стране флуресцентних лампи, нема инхибиторни утицај на клијање семена ове врсте, а исто тако семе успешно клија у условима мрака, долази се до закључка да ова врста има неофотобластично семе.



Слика 24. Развојни циклус сејанца врсте *Spiranthes spiralis* од ембриона до формирања лисног пупољчића успостављен у условима осветљења 16/8 С/М: а) Набубрели ембрион без семеног омотача; б) Формирање протокорма; в) Формирање ризоида и вршног пупољчића; г) Добро развијени први и други лист; д) Биполарни сејанац (Dulić et al., 2019)

7.5. Потребе тржишта за терестричним орхидејама

Резултати добијени у овој дисертацији указују да већина пронађених врста расте на карбонатним земљиштима неутралне pH реакције и има способност да расте на сиромашним до средње обезбеђеним земљиштима азотом (Savić, 1998). Ниске потребе за органском материјом као и толералнтост на висок садржај карбоната у земљишту их чини погодним за примену у различитим категоријама јавног и приватног урбаног зеленила. Морфолошке анализе потврђују да терестричне орхидеје које настањују Фрушку гору поседују велики дијапазон висина, боја и времена цветања и као такве могу понудити већи број нових производа на хортикултурном тржишту. Такође, анкета у оквиру које је спроведено оцењивање пронађених врста према декоративности указује на велику заинтересованост потрошача за врстама које припадају овој групи орхидеја. Према наводима Nau (2007), систем рангирања "Five Points of Success" представља одговарајући приступ за процену вредности нових врста и култивара. На основу резултата добијених из ове анкете, може се закључити да терестричне орхидеје које расту на Фрушкој гори имају велики потенцијал као нов производ на тржишту. Ово се посебно односи на врсте *S. spiralis*, *O. purpurea*, *O. militaris* и *H. jankae* као и *A. pyramidalis* и *N. tridentata* због веома атрактивног цвета и способности да расту на сиромашним земљиштима (Sinker et al. 1985; Rossi 2002; Willems 2006). Иако су врсте *P. bifolia*, *L. abortivum*, *O. mascula*, *E. helleborine* и посебно *E. mycrophila* оцењене нешто слабијом оценом из категорије атрактивност, позитивне оцене у свим осталим категоријама их и даље чине погодним да буду представљене као нов производ на тржишту. Такође, увођењем врста терестричних орхидеја у програме оплемењивања, што подразумева хибридизацију и рекомбинацију својстава, било би могуће превазићи одређене недостатке код појединих врста. Иако резултати и представљена литература указују на велики диверзитет у бројности хромозома испитиваних врста, према наводима Hossain et al. (2013) орхидеје имају слабу репродуктивну баријеру те су веома погодне за стварање нових хибрида. У прилог овоме иде и чињеница да је у природним условима пронађено више међуврсних хибрида од којих су најчешћи *Gymnadenia* × *Dactylorhiza* (Stace, 1975; Preston et al., 2002; Stace 2010), *Gymnadenia* × *Anacamptis* (Stace 1975) *Gymnadenia* × *Pseudoarchis (*Sell and Murrell, 1996), *Anacamptis* × *Orhis*, *Anacamptis* × *Platanthera* (Savić, 1998), као и унутарврсних хибрида унутар родова *Anacamptis*, *Orchis*, *Ophrys*, *Gymnadenia*, *Neotinea* (Savić, 1998, Đorđević et al., 2002; Radak et al., 2019).

Потребе тржишта могу бити диктиране на сасвим два различита начина. Захтеви за новим производима, у овом случају цветним културама, долазе услед нових или измењених преференци потрошача, затим услед засићења тржишта дуготрајном и униформном понудом, или услед нових трендова у другим сферама живота. Тако потрошачи директно или индиректно диктирају какав ће нов или побољшан производ бити предмет трговине. Неретко међутим и произвођачи као друга карика овог ланца, а нарочито оплемењивачке куће, лансирањем новог производа усмеравају потражњу ка својим производима. Потрошачи често могу бити необавештени о култиварима или понуди, те су анкете међу свим интересним групама, попут спроведене у овом истраживању, неопходне како би се подигла свест и усмерила пажња ка цветним културама које раније нису биле предмет трговине. Управо овакве свеобухватне студије – рад на очувању, умножавању, унапређењу и популатизацији – отварају врата потенцијалних тржишта и препознатљивости терестричних орхидеја као цветних култура за потребе хортикултуре и пејзажне архитектуре.

7.6. SWOT АНАЛИЗА ГЕНЕТИЧКОГ ДИВЕРЗИТЕТА ТЕРЕСТРИЧНИХ ОРХИДЕЈА СА ВИШЕСТРУКОМ ПОТЕНЦИЈАЛНОМ УПОТРЕБОМ У ХОРТИКУЛТУРИ

SWOT анализа представља корисно средство за сагледавање проблема и могућности. Мада је настала за потребе маркетинга и тржишта, ова анализа се увелико користи у свим пољима научноистраживачког рада (Miller, 2006; Bolton et al., 2009). Представљена анализа је изведена на основу свих резултата добијених у оквиру ове дисертације и јасно истиче све позитивне и негативне унутрашње и спољашње факторе који имају утицај на одрживост популација као и на формирање одрживе ген-банке терестричних орхидеја.

Strengths - Снаге (предности)	Weaknesses - Слабости
✓ Велики диверзитет који стоји на располагању за даља истраживања ✓ Атрактивне карактеристике цветова и листова (боја, облик, висина, величина) ✓ Способност да живе на различитим типовима земљишта ✓ Дуг период цветања од маја до октобра	✓ Мале и фрагментисане популације ✓ Слаба виабилност семена ✓ Код неких врста је установљено тешко и споро наклијавање семена у *in vitro* условима ✓ Неопходна симбиоза са ендофитним гљивама код одраслих јединки ✓ Слаба оплодња код малих популација

Opportunities - Могућности	Threats - Опасности
✓ Иновативни производ ✓ Позитивна оцена која одређује тржишни потенцијал ✓ Стварање интерспециес и интраспециес хибрида ✓ Примена на различитим категоријама јавног и приватног зеленила	✓ Климатске промене ✓ Негативни утицај антропогених фактора ✓ Станишта већине пронађених врста налазе се мимо граница заштићеног подручја Националног парка ✓ Висока вегетација , испаша стоке

7.7. ИЗГРАДЊА МОДЕЛА СОРТЕ

Према Borojeviću (1981), није довољно моделирати изглед фенотипа, већ је неопходно разрадити генетску структуру тога фенотипа и дефинисати услове средине за које се култивар ствара. Изградња идеотипа заснована је на концепту својства, што подразумева избор родитељских парова за укрштање на бази својстава која се желе комбиновати, под претпоставком да ће се остварити такве комбинације позитивних својстава какве желимо у новим генотиповима (Borojević 1981). На основу добијених резултата и свега наведеног у дискусији изграђен је модел сорте терестричних орхидеја, које имају висок потенцијал за ширу примену у хортикултури и пејзажној архитектури, односно на различитим типовима јавног и приватног зеленила.

ГЕНОТИП		⇨	**ФЕНОТИП**	⇦	**СПОЉАШЊА СРЕДИНА**
Својство за	**Извор наследне особине**				
➢ Велику моћ накупљања хранљивих материја у подземном стаблу за складиштење	- *Orchis militaris* - *Gymnadenia conopsea* - *Ophrys sphegodes* - *Anacamptis pyramidalis*	⇨	➢ Цветање сваке године ➢ Адаптабилност на различите услове средине	⇦	➢ Велика инсолација ➢ Високе температуре ➢ Слаба до умерена обезбеђеност водом
➢ Висину биљке од 50 до 80 cm ➢ Крупни, шарени листови дужине од 10 cm до 13 cm ➢ Дуго цветање од Маја до краја Јула ➢ Велика цваст од 12 cm до	- *Orchis purpurea* - *Orchis mascula* - *Orchis militaris* - *Himantoglossum jankae*		➢ Атрактивна висока биљка, шарених листова, дугог цветања и велике цвасти. ➢ Видљиви симптоми недостатка влаге у земљишту		➢ Добра обезбеђеност водом, систем за наводњавање ➢ Умерена до слаба инсолација

18 cm ➢ Формирања плитког површинског кореновог система			
➢ Толерантност на присуство високих вредности карбоната у супстрату	- *Gymnadenia odoratissima* - *Ophrys sphegodes*	➢ Здраво стабло и листови без симптома хлорозе	➢ Благо алкална до алкална земљишта (супстрати), урбисол
➢ Адаптација на супстрате сиромашне органским материјама	- *Anacamptis pyramidalis* - *Spiranthes spiralis* - *Neotinea tridentata*	➢ Виталне биљке, одговарајућег хабитуса и доброг укорењавања	➢Земљишта/супстрати сиромашни хумусом и другим материјала органског порекла
➢ Толерантност на смањен ниво осветљења ➢Гени за сциофитност	- *Cephalanthera longifolia* - *Limodorum abortivum* - *Epipactis microphylla* - *Epipactis helleborine* - *Orchis purpurea*	➢ Виталне биљке без симптома етиолације или задржавања у порасту	➢ Делимична до потпуна сенка

⇩

Терестричне орхидеје погодне за примену на различитим типовима јавних и приватних зеленила

8. ЗАКЉУЧАК

Резултати морфолошких и цитолошких анализа потврђују претходно постављену хипотезу да је диверзитет терестричних орхидеја Фрушке горе богат и недовољно искоришћен. Морфолошка карактеризација је указала на велики диверзитет облика, величина и боја листова и цветова који представљају добру основу за селекцију орнаменталних карактеристика јединствене високе комерцијалне вредности.

Анализа главних компоненти заснована на квантитативним и квалитативним подацима, јасно је истакла особине које су носиоци највећег степена варијабилности (ширина листа, боја листа, облик листа, дужина листа, број боја спољашњег круга цветног омотача, облик листића унутрашњег круга цветног омотача, висина биљке, положај цветне дршке и дужина цвасти). Цитолошка карактеризација је показала да су већина популација диплоиди, као и да је присутна велика различитост у бројности хромозома између врста. За врсте из рода *Gymnadenia* је установљено да имају 2n=40, *A. pyramidalis* и O.*sphegodes* 2n=36, *O. mascula*, *O. purpurea*, *O. militaris*, *N. ustulata* и *P. bifolia* 2n=42.

Геолошка и педолошка анализа приказале су јасну слику стања земљишта које настањују терестричне орхидеје, као и да испитивани фактори утичу на њихову дистрибуцију. Фактори чији се утицај највише истиче су присуство карбоната и pH реакција земљишта. Такође, приказани резултати су довели до закључка да су ови фактори уско везани за подлогом на којој су настали.

Иако се све евидентиране врсте терестричних орхидеја (изузев врста из рода *Epipactis* и *Limodorum*) сматрају аутотрофним организмима, присуство ендомикоризних гљива из групе *Rhizoctonia* у кореновом систему указује да испитиване врсте одржавају симбиозу током целог свог животног циклуса.

Развијен је протокол за асимбиотско наклијавање семена 6 врста терестричних орхидеја. Применом одговарајућих суплемената и услова средине могуће је успешно успоставити клијање семена без посредства гљива у контролисаним *in vitro* условима. Култура незрелог семена показала се као неодговарајућа метода уколико су у питању мале количине семена. Са друге стране, третмани зрелог семена калцијум-хипохлоритом успешно су стањили семени омотач и на тај начин уклонили механичку баријеру која ограничава клијање.

На основу резултата који приказују утицај хранљиве подлоге на асимбиотско клијање семена може се закључити да је клијање семена у уској вези са присуством органских и неорганских облика азота. Док семена врста *A. pyramidalis*, *G. conopsea*, *O. sphegodes* и *H. jankae* нису клијала на медијуму који садржи неорганski облик азота (КС), код семена *S. spiralis* је успешно успостављено клијање на обе хранљиве подлоге. Додавањем суплемената у виду кокосове воде, пептона и L-глутамина постиже се знатно већи степен клијавости свих врста које су обухваћене огледом. На основу свега наведеног може се закључити да је клијање семена терестричних орхидеја зависно од присуства аминокиселина.

Утицај осветљења показало је инхибиторно дејство на клијање семена *A. pyramidalis*, *G. conopsea*, *O. Sphegodes, O. militaris* и *H. jankae*, што указује да поменуте врсте имају негативно фотобластично семе. Код врсте *S. spiralis* је успешно успостављено клијање семена и у условима потпуног мрака и у условима 16/8 С/М. На основу овог резултата може се закључити да ова врста има неофотобластично семе.

Представљеним протоколом превазишле су се баријере које стоје на путу масовној продукцији и употреби терестричних орхидеја као цветних врста различитих намена. Значај приказаних резултата огледа се и у чињеници да добијени протоколи за *in vitro* умножавање могу наћи своју примену у *ex situ* конзервацији најугроженијих врста, као и да умножени материјал може бити искориштен за реинтродукцију, рестаурацију и одржавање стабилних популација *in situ*.

Вишегодиње праћење стања популација терестричних орхидеја указало је на висок степен угрожености. Добијени резултати указују да се величина популације и инбридинг депресија негативно одражавају на вијабилност семена. Имајући у виду да се све врсте налазе на црвеној листи угрожених врста флоре Републике Србије, као и да се поједини локалитети налазе на самој граници Националног парка, проширење граница заштите би знатно допринело очувању популација пронађених врста.

Напредак и нов приступ истраживању представља употреба SWOT анализе свих позитивних и негативних унутрашњих и спољашњих фактора у сврху формирања одрживе ген-банке и правилне употребе и очувања генофонда терестричних орхидеја. Прецизном SWOT анализом јасно су представљене предности, недостаци, опасности али и могућности представљеног диверзитета у програмима оплемењивања. На основу свега наведеног може се закључити да пронађене врсте заслужују виши конзервациони статус односно степен заштите, као и већу заступљеност на тржишту.

Мултидисциплинарни и свеобухватни приступ истраживању доводи до закључка да врсте обухваћене овом докторском дисертацијом представљају иновативан, препознатљив и јединствен производ које могу имати високу употребну вредност на тржишту хортикултуре. Висок степен атрактивности, могућност презимљавања подземних органа за магационирање у спољашњим условима као и способност врста да расту на сиромашном и карбонатном земљишту, чини ову групу орхидеја веома погодним за примену у различитим типовима јавног и приватног зеленила нарочито на типу земљишта које одговара урбисолу. Од њих се највиђе истичу *S. spiralis*, *O. purpurea*, *O. militaris H. jankae*, *A. pyramidalis* и *N. tridentata,* док врсте *P. bifolia*, *L. abortivum*, *O. mascula*, *E. helleborine* могу бити употребљене за озелењавање мање осветљених парцела са вишим садржајем влаге у земљишту.

9. ЛИТЕРАТУРА

1. Abadie J.C., Puttsepp U., Gebauer G., Faccio A., Bonfanate P., Selosse M.A. (2006) *Cephalanthera longifolia* is mixotrophic: a comparative study between green and non-photosynthetic individuals. Canadian Journal of Botany. 84: 1462-1477.
2. Aguilar R., Quesada M., Ashworth L., Herrerias-Diego Y., Lobo J. (2008) Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. Molecular Ecology. 17: 5177–5188.
3. Aina A.T., Salau A.T. (1992) The challenges of sustainable development in Nigeria. Nigerian Environmental Study/Action Team (NEST). Rio-DeJaneiro Brazil. 8-16.
4. Anjah G.M., Focho D.S., Annih M.G., Kum C.K. (2003) Effect of regulating the red/far-red light ratios by shading on seedlings of *Milicia excelsa* and *Naulcea diderrichii.* Journal of Biology. 8:4.
5. Arditti J. (1967) Factors affecting the germination of orchid seeds. Botanical Review. 33: 1-97
6. Arditti J. (1992) Fundamentals of orchid biology (reprinted, 2007 by Zip Publising, 1313 Chesapeake Ave, Columbus, Ohio 43212, USA.) Wiley. New York.
7. Arditti J. (1994) Micropropagation of Orchids. Biological conservation.
8. Arditti J., Michaud J.D., Oliva A.P. (1982) Practical germination of North American and related orchids: *Epipactis atrorubens*, *E. gigantea* and *E. helleborine*. American Orchid Society Bulletin. 51: 162–171.
9. Arditti J., Michaud J.D., Olivia A.P. (1981) Seed germination of North America orchids. I. Native California and related species of *Calypso*, *Epipacti*s, *Goodyera*, *Pipierita*, and *Platanthera*. Botanical Gazette. 142: 442-453.
10. Arditti J., Ernst R. (1993) Micropropagation of orchids. Wiley. New York, NY
11. Aremu C.O. (2017) Genetic diversity: a review for need and measurements for intraspecies crop improvement. Journal of Microbiology and Biotechnology Research. 1: 80-85.
12. Artwood J.T. (1986) The size of the orchidaceae and the systematic distribution of Epiphytic Orchids. Selbyana. 9(1): 177-186.

13. Averyanov L.V., Averyanova E.L., Lavrenko A.N. (1982) Karyosystematic study of orchids (Orchidaceae) on the territory of the Komi ASSR. Botanicheskii Zhurnal. 67: 1491–1499.
14. Baskin C.C., Baskin J.M. (2001) Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination. Academic Press. San Diego, CA, pp 665.
15. Baskin C.C., Baskin J.M. (2014) Seeds: Ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination. 2nd ed. San diego, CA: Elsevier/Academic Press.
16. Bateman R. M., Smith R. J., Fay M. F. (2008) Morphometric and population genetic analyses elucidate the origin, evolutionary significance and conservation implications of *Orchis angusticruris* (*O. purpurea* × *O. simia*), a hybrid orchid new to Britain. Botanical Journal of the Linnean Society. 157: 687–711.
17. Bateman R.M. (2006) She's no Lady! A hybrid orchid new to the British Isles. Orchid Review 115: 282–287.
18. Bateman R.M., Molnár A.V., Sramko G (2017) *In situ* morphometric survey elucidates the evolutionary systematics of the Eurasian *Himantoglossum clade* (Orchidaceae: Orchidinae). Peer J DOI 10.7717/peerj.2893
19. Bektas E., Cuce M., Sokmen A. (2013) *In vitro* germination, protocorm formation, and plantlend development of *Orchis coriophora* (Orchidaceae), a naturally growing orchid species in Turkey. Turkish Journal of Botany. 37: 336-342.
20. Belić M., Nešić Lj., Ćirić V. (2014) Praktikum iz pedologije. Poljoprivredni fakultet Novi Sad.
21. Bernard N. (1909) L'evolution dans la symbiose, les orchidees et leurs champignons commensaux. Annales des Sciences Naturalles - Botanique 9: 1-196
22. Bernardos S., Amich F. (2002) Karyological, taxonomic and chorological notes on the Orchidaceae of the central-western Iberian Peninsula. 135(1-2): 76-87.
23. Bhattacharyya P., Kumar V., Van Staden J. (2017) Assessment of genetic stability amongst micropropagated Ansellia Africana, a vulnerable medicinal orchid species of Africa using SCoTmarkers. South African Journal of Botany. 108: 294-302.
24. Bianco P., D'Emerico D., Medagli P., Ruggiero L. (1989) Karyological studies of some taxa of the genus *Ophrys* (Orchidaceae) from Apulia (Italy). Caryologia. 42: 57–63.
25. Bolton J.J., Robertson-Andersson D.V., Shuuluka D., Kandjengo L. (2009) Growing Ulva (Chlorophyta) in integrated systems as a commercial crop for

abalone feed in South Africa: a SWOT analysis. Journal of Applied Phycology. 21:575–583

26. Borojević S. (1981) Principi i metodi oplemenjivanja biljaka. Novi Sad, Ćirpanov.
27. Bournérias M., Prat D. (eds). (2005) Les Orchidées de France, Belgique et Luxembourg, 2ème édition. pp. 504. Biotope, Mèze.
28. Brundrett M.C. (2007) Scientific approaches to Australian temperate terrestrial orchid conservation. Australia Journal of Botany. 55: 293-307.
29. Burgeff H. (1936) Samenkeimung der Orchideen. G. Fisher, Verlag, Jena.
30. Butcher D., Marlow S.A. (1989) Asymbiotic germination of epiphytic and terrestrial orchids. In: Pritchard HW, editor. Modern methods in orchid conservation. Cambridge: Campridge University Press. pp. 31-38.
31. Cafasso D., Widmer A., Cozzolino S. (2005) Chloroplast DNA inheritance in the orchid *Anacamptis palustris* using singleseed polymerase chain reaction. Journal of Heredity 96: 66–70.
32. Campbell D. R., Waser N. M., Mele´ndez-Ackerman E. J. (1997) Analyzing pollinator-mediated selection in a plant hybrid zone: hummingbird visitation patterns on three spatial scales. American Naturalist 142:295–315.
33. Chand K. (1991) Green Pod Culture and Regeneration Potential of some Indian Orchids: A Study In Vitro. PhD Thesis. Panjab University, Chandigarh.
34. Chase W.M., Cameron M.K., Barrett L.R., Freudenstein V.J. (2003) DNA data and *Orchidaceae* systematics: a new phylogenetic classification. In: Dixon KW, Kell SP, Barrett RL, Cribb PJ (Eds), Orchid Conservation. Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah, pp. 69–89.
35. Chen Y., Goodale U., Fan H.L., Gao J.Y. (2015) Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Paphiopedilum spicerianum*: An orchid with an extremely small population in China. Global Ecology and Conservation. 3: 367-378.
36. CITES (2013) Numbers of species listed in the CITES Appendices as of October 2013. The Convention on the International Trade in Endangered Species of Flora and Fauna.
37. Corriveau J.L., Coleman A.W. (1988) Rapid screening method to detect potential biparental inheritance of plastid DNA and results for over 200 angiosperm species. American Journal of Botany 75**:** 1443–1458.

38. Cox A.V., Abdelnour G.J., Bennett M.D. and Leitch I.J. (1998) Genome size and karyotype evolution in the slipper orchids (Cypripedioideae: Orchidaceae). American Journal of Botany. 85: 681-687.
39. Cozzolino S., D'Emerico S., Widmer, A. (2004) Evidence for reproductive isolate selection in Mediterranean orchids: karyotype differences compensate for the lack of pollinator specificity. Proceedings of the Royal Society B. 271: 259–262.
40. Cribb P.J., Kell S.P., Dixon K.W. and Barrett R.L. (2003) Orchid Conservation: A Global Perspective. In K.W. Dixon, S.P. Kelly, R.L. Barrett, & P.J. Cribb (Eds). Orchid Conservation. Natural History Publications: Kota Kinabalu, Borno, pp. 1-24.
41. Currah R.S., Sigler L., Hambleton S. (1987) New records and new taxa of fungi from the mycorrhizae of terrestrical orchids of Alberta. Canadian Journal of Botany. 65: 2473-2482.
42. Currah R.S., Smreciu E.A., Hambleton S. (1989) Mycorrhizae and mycorrhizal fungi of boreal species of *Platanthera* and *Coeloglossum* (Orchidaceae). Canadian Journal of Botany 68: 1171-1181.
43. Currah R.S., Zelmer C.D., Hambleton S., Richardson K.A. (1997) Fungi from orchid mycorrhizas. In: Arditti J., Pridgeon A.M., eds. Orchid biology-reviews and perspectives VII. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 117 - 170.
44. Curtis J. (1939) The relationship between specificity of orchid mycorrhizal fungi to the problem of symbiosis. American Journal of Botany. 26:390-399.
45. D'Emerico S., Bianco P., Medagli P. (1993) Cytological and karyological studies on Orchidaceae. Caryologia. 46(4): 309-319.
46. D'Emerico S., Bianco P., Medagli P., Ruggiero L. (1990) Karyological studies of some taxa of the genera *Himantoglossum*, *Orchis*, *Serapias* and *Spiranthes* (Orchidaceae) from Apulia, Italy. Caryologia. 43: 267–276.
47. D'Emerico S., Grünanger P., Scrugli A. and Pignone D. (1999): Karyomorphological parameters and C-bands distribution suggest phyletic relationship within the subtribe Limodorinae Bentham (Orchidaceae). Plant Systematics and Evolution. 217: 147-161.

48. D'Emerico S., Pignone D. and Scrugli A. (2000): Karyomorphology and evolution in italian populations of three *Neottieae* species (Orchidaceae). Cytologia. 65: 189-195.
49. Decruse S.W., Gangaprasad A., Seeni S., Menon V.S. (2003) Micropropagation and ecorestoration of *Vanda spathulata*, an exquisite orchid. Plant cell, Tissue and Organ culture. 72(2): 199-202.
50. Decruse S.W., Reny N., Shylajakumari S., Krishnan P.N. (2013) *In vitro* propagation and field establishment of *Eulophia cullenii* (Wight) Bl., a critically endangered orchid of Western Ghats, India through culture of seeds and axenic seedling-derived rhizomes. In vitro Cell and Developmental Biology – Plant. 49(5): 520-528.
51. Delforge P. (1995) Orchids of Britain and Europe. Delachaux et Niestlé SA, Lausanne.
52. Delforge P. (2006) "Orchids of Europe, North Africa and the Middle East." A&C Black: London.
53. DePauw M.A., Remphrey W.R. (1993) *In vitro* germination of three *Cypripedium* species in relation to time of seed collection, media, and cold treatment. Canadian Journal of Botany 71: 879–885.
54. Diklić N. (1976) Familija Orchidaceae Lindl. In: Josifović M, editor. Flora of Serbia 10. Belgrade, SANU. Pp 36-116.
55. Diklić N. (1976) Familija Orchidaceae Lindl. In: Josifović M, editor. (1970-1986) Flora of Serbia 10. Belgrade. SANU.
56. Dixon K.W., Kell S.P., Barrett R.L., Cribb P.J. (2003) Orchid conservation. Natural History Publications (Borneo), Kota Kinabalu, Sabah. 2003:1-24.
57. Doležel J., Greilhuber J., Lucretti S., Meister A., Lysak M.A., Nardi L., Obermayer R. (1998) Plant genome size estimationby flow cytometry: inter-laboratory comparison. Annals of Botany. 82 (Suppl. A): 17-26.
58. Đorđević V., Tomović G., Lakušić D. (2010) *Epipactis purpurata* Sm. (Orchidaceae) – A new species in the flora of Serbia. Archive of Biological Sciences. 62: 1175–1180.
59. Đorđević V., Tsiftsis S., Jakovljević K., Šinžar-Sekulić J., Vukojičiž S. (2002) First record of a natural hybrid *Neotinea* × *dietrichiana* (*Orchidaceae*) in Serbia. Phytologia Balcanica. 18(2): 163-171.

60. Dressler R.L. (1981) The Orchids Natural History and Classification. Harvard University Press. ISBN: 0-674-87525-7
61. Dressler R.L. (1993) Phylogeny and Classification of the Orchid family. Press Syndicate of the university of Cambrige, Moulburne, Australia, 33pp
62. Dulić J., Ljubojević M., Ognjanov V., Barać G., Dulić T. (2019) *In vitro* germination and seedling development of two European orchid species, *Himantoglossum jankae* Somlyay, Kreutz & Óvári and *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall. In vitro cellular and developmental biology – Plant. 55(4): 380-391. https://doi.org/10.1007/s11627-019-09997-z
63. Dutra D., Johnson T.R., Kauth P.J, Stewart S.L., Kane M.E., Richardson L. (2008) Asymbiotic seed germination, *in vitro* seedling development and greenhouse acclimatization of the threatened terrestrial orchid *Bletia purpurea*. Plant cell, tissue and organ culture. 94:11-21.
64. Falk D.A. (1990) Integrated strategies for conserving plant genetic diversity. Annals of the Missouri Botanical Garden 77: 38–47.
65. Fay M.F. (1994) In what situations is *in vitro* culture appropriate to plant conservations? Biodiversity and Conservation. 3: 176-183.
66. Felix L.P, Guerra M. (2005) Basic chromosome numbers of terrestrial orchids. Plant System Evolution. 254: 131-148.
67. Felix L.P., Guerra M. (1998) Cytological studies on species of Habenaria Wild. (Orchidaceae-Orchidoideae) occurring in the Northeast of Brazil. Lindleyana. 13:224-230.
68. Fukai S., Fujiwara K., Okamoto O., Hasegawa A., Goi M. (1997) Effects of red and blue light on germination and protocorm growth of *Calanthe Satsuma*. Lindleyana 12:169-171.
69. Galbraith DW., Lambert GM., Macas J., Dolžel J. (1998) Analisys of nuclear DNA content and ploidy in higher plants. In: Robinson J.P., Drazynkiewicz Z., Dean P.N., Dressler L.G., Orfao A., Rabinovitch P.S., Stewart C.C., Tanke H.J., Wheeless L.L., eds. Current protocols in cytometry. New york: John Wiley and Sons, 7.6.1-7.6.22.
70. Gardes M. (2002) An orchid-fungus marriage: physical promiscuity, conflict and cheating. New Phytologist. 154: 4–7.
71. Gezgin Y., EltemR. (2009) Diversity of endophytic fungi from various Aegean and Mediterranean orchids (saleps). Turkish journal of Botany. 33: 439-445.

72. Ghorbani A., Gravendeel B., Selliah S., Zarré S., de Boer H. (2017) DNA barcoding of tuberous Orchidoideae: a resource for identification of orchids used in Salep. Molecular Ecology Resources 17: 342–352.
73. Ghorbani A., Zarre S., Gravendeel B., de Boer H. (2014) Illegal wild collection and international trade of CITES-listed terrestrial orchid tubers in Iran. Traffic Bulletin 26: 52–58.
74. Girlanda M., Selosse M.A., Cafasso D., Brilli F., Delfine S., Fabbian R., Ghignone S., Pinelli P., Segreto R., loreto F., Cozzolino S., Perotto S. (2006) Inefficient photosynthesis in the Mediterranean orchid *Limodorum abortivum* is mirrored by specific association to ectomycorrhizal Russulaceae. Molecular Ecology. 15:491-504.
75. Girlanda M., Sergeto R., Cafasso D., Liebel H., Rodda M., Ercole E., Cozzolino S., Gebauer G., Perotto S. (2011) Photosynthetic mediterranean meadow orchids Feature partial mycoheterotrophy and specific mycorrhizal associations. American Journal of Botany. 98(7): 1148-1163.
76. GIROS (2009) Orchidee d'Italia – Guida alle orchidee spontanee.Cornaredo: Il Castello.
77. Giuseppina B., Brullo C., Pulvirenti S., Scrugli A., Terrasi M.C., D'Emerico S. (2010) Advances in chromosomal studies in *Neottiae* (Orchidaceae): constitutive heterochromatin, chromosomal rearrangements and speciation. Caryologia, 63(2): 184-191
78. Gladkova N.V. (1982) The Order Orchidales. In: Takhtajan (A) (ed) Zhizn' rastenii (Plant life). Prosveshchenie, Moscow. 6. Pp. 248-275.
79. Godo T., Komori M., Nakaoki., Yukawa T., Miyoshy K. (2010) Germination of mature seeds of *Calanthe tricarinata* Lindl., an endangered terrestrial orchid, by asymbiotic culture in vitro. In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant. 46:323-328.
80. Gravandeel B., Smithson A., Slik F.J., Schuiteman A. (2004) Epiphytism and pollination specialization: Drivers for orchid diversity? Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Bilogical Sciences. 359(1450): 1523-1535.
81. Gupta A. (2016) Asymbiotic Seed Germination in Orchids: Role of Organic Additives. Interantional Advanced Research in Science. Engineering and Technology. 3: 143–147.

82. Hadley G. (1970) Non-specificity of symbotic infection in orchid mycorrhiza. New Phytologist. 69(4): 1015-1023.
83. Hadley G. (1982) Orchid mycorrhiza. In J. Arditti [ed.], Orchid biology: Reviews and perspectives, II, 85 – 118. Cornell University Press, Ithaca, New York, USA.
84. Hagsater E, Dumont V (Eds.) (1996) Orchids: Status, Survey and Conservation Action Plan. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK
85. Harley J.L. (1950) Recent progress in the study of endotrophic mycorrhiza. New Phytologist. 49: 213-247.
86. Harp A., Harp S. (2005) Orchids of Britain and Ireland. A&C Black Publishers Ltd. London, UK
87. Hedren M., Klein E., Herwig T. (2000) Evolution of Polyploids in the European Orchid Genus Nigritella: Evidence from Allozyme Data. Phyton. 40(2): 239-275.
88. Hicks A.J. (2006) Asymbiotic technique of orchid seed germination. The Orchid Seedbank Project, Chandler, Arizona, USA.
89. Hietela A.M., Vahala J., Hantula J. (2001) Molecular evidence suggests that Cesatobasidium bicorne has an anamorph known as a conifer pathogen. Mycological Research 105: 555-562.
90. Hopper SD 1997. An Australian perspective on plant conservation biology in practice. In: Fiedler PL, Kareiva PM, eds. Conservation biology for the coming decade. New York: Chapman and Hall, 255–278.
91. Hossain M.M. (2008) Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Epidendrum ibaguenese* Kunth. (Orchidaceae). African journl of Biotechnology. 7(20): 3614-3619.
92. Hossain M.M., Kant R., Van P., Budi Winarto., Zeng S., De Silva J. (2013) The Application of Biotechnology to Orchids. Critical Reviews in Plant sciences. 32:69-139.
93. Hsu R., Lee Y. (2012) Seed Development of *Cypripedim debile* Rchb. F. in relation to asymbiotic germination. HortScience. 47(10): 1495-1498.
94. Huber F.K., Kaiser R., Sauter W., Schiestl F.P. (2005) Floral scent emission and pollinator attraction in two species of *Gymnadenia* (*Orchidaceae*). Oecologia 142: 564– 575.
95. Huh Y.S., Lee K., Nam S.Y., Peak K.Y., Suh G.U. (2016) Improvement of asymbiotic seed germination and seedling development of *Cypripedium*

macroanthos Sw. with organic additives. Journal of Plant Biotechnology. 43:134-145.

96. IUCN. (2011) IUCN Red List of Threatened Species (ver. 2011.2). Available at: http://www.iucnredlist.org.
97. Jacquemyn H., Brys R., Honnay O., Hutchings M. (2009) Biological Flora of the British Isles: *Orchis mascula* (L.) L. Journal of Ecology. 97: 360-377.
98. Jacquemyn H., Brys R., Vandepitte K., Honnay O., Roldán-Ruiz I. (2006) Fine-scale genetic structure of life history stages in the food deceptive orchid *Orchis purpurea*. Molecular Ecolology. 15:2801–2808.
99. Jacquemyn H., Hunchinhs M. (2010) Biological Flora of the British Isles: *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall. Journal of Ecology 98: 1253-1267.
100. Jacquemyn H., Hunchinhs M. (2015) Biological Flora of the British Isles: *Ophrys sphegodes*. Journal of Ecology. 103: 1680-1696.
101. Jersakova J., Johnson S.D., Kindlmann P. (2006) Mechanisms and evolution of deceptive pollination in orchids. Biological Reviews 81: 219–235.
102. Jiang H., Chen M.C., Lee Y.I. (2017) *In vitro* germination and low temperature seed storage of *Cypripedium lentiginosum* P.J.Crib & S.C. Chen, a rare and endangered lady's slipper orchis. Scientia Horticulturae. 225: 471-479.
103. Jiang W., Yang G., Zhang C., Fu C. (2011) Species composition and molecular analysis of symbiotic fungi in roots of *Changnienia amoena* (Orchidaceae). African Journal of Microbiology Research 5(3): 222-228.
104. Johnson T.R., Kane M.E., Perez H.E. (2011) Examining the interaction of light, nutrients and carbohydrates on seed germination and early seedling development of *Bletia purpurea* (Orchidaceae). Plant Growth Regulation 63(1): 89–99. doi:10.1007/s10725-010-9516-3.
105. Johnson T.R., Stewart S.L., Dutra D., Kane M.E., Lichardson L. (2007) Asymbiotic and symbiotic seed germination of *Eulophia alta* (Orchidaceae) – preliminary evidence for symbiotic culture advantage. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 90: 313-323.
106. Jones D.L. (2006). Native Orchids of Australia. New Holland Publishers: Sydney, Australia.
107. Kalopissis J. (1988) The Orchids of Greece. Inventory and Review. Museum of Creten Ethnology, Crete, Voroi.

108.Kamari G., Felber F., Garbari F. (1995) Mediterranean chromosome number reports. Flora Mediterranea. 5: 261 -373.

109.Kano K. (1965) Studies on the media for orchid seed germination. Mem. Fac. Agric. Kagawa Univ. 20: 1-68.

110.Karadžić B., Marjanović Ž., Mijović A., Marinković S., Popović R. 2000. *Ophrys onsectifera* L., a new orchid species in flora of Serbia. Archive of Biological Science. 52: 11-12.

111.Kasparek M., Grimm U. (1999) European trade in Turkish salep with special reference to Germany. Economic Botany. 53: 396–406.

112.Kauth P., Dutra D., Johnson T. (2008) Techniques and applications of *in vitro* orchid seed germination. In: Teixeira de Silva J.A (Eds.) Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances snd Tropical Issues. Global Sciences Books. Iselworth. UK pp. 375-391.

113.Kauth P.J. (2005) *In vitro* seed germination and seedling development of *Calopogon tuberosus* and *Sacoila lanceolata* var. *lanceolata*: two Florida native terrestrial orchids. MS thesis. University of Florida.

114.Kauth P.J., Vendrame W.A., Kane M.E. (2006) *In vitro* seed culture and seedlings development of *Calopogon tuberosus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 85: 91-102. doi:10.1007/s11240-005-9055-1.

115.Kende H., Zeevaart J. (1997) The five "Classical" plant hormones. *Plant Cell 9*:1197–1210.

116.Kitsaki C.K., Zygouraki S., Ziobora M., Kintzios S. (2004) *In vitro* germination, protocorm formation and plantlet development of mature versus immature seeds from several *Ophrys* species (Orchidaceae). Plant Cell Replication 23:284–290

117.Knudson C. (1922) Non-symbiotic germination of orchid seeds. Botanical Gazette 73: 1-25.

118.Knudson C. (1924) Further observations on non-symbiotic germination of orchid seeds. Botanical Gazette. 77:212-219.

119.Knudson C. (1946) A new nutrient solution for the orchid seed germination. American Orchid Society Bulletin. 15:214-217.

120.Kohler A., Kuo A., Nagy L.G., Morin E., Barry K.W., Buscot F. et al. (2015) Convergent losses of decay mechanisms and rapid turnover of symbiosis genes in mycorrhizal mutualists. Nature Genetics 47(4):410-5. doi: 10.1038/ng.3223.

121.Kondorosi E., Roudier F., Gendreau E. (2000) Plant cell-size control: growing by ploidy? Current Opinion in Plant Biology 3: 488–492

122.Kostenyuk I., Oh B., So I.S.(1999) Induction of early flowering in *Cymbidium niveo-marginatum* Mak *in vitro*. Plant Cell Replication. 19:1-5.

123.Kreziou A., De Boer H., Gravendeel B. (2016) Harvesting of salep orchids in north-western Greece continues to threaten natural populations. Oryx 50: 393–396.

124.Kulinov P.V. Filippov E.G. (2001) Specific features of mycorrhizal symbiosis formation in the ontogeny of Orchids of the temperate zone. Russian Journal of Ecology. 32: 408-412.

125.Kumar A., Nandi S.K., Bag N., Palni L.M.S. (2002). Tissue culture studies in two important orchid taxa: *Rhynchostylis retusa* (L.) Bl. And *Cymbidium elegans* Lindl. In: Nandi S.K., Palni L.M.S., Kumar A. (eds). Role of plant tissue culture in biodiversity conservation and economic development. Gyanodaya Prakshan, Nainital, India, pp 113-124.

126.Landwehr J. (1983) Les orchide´es sauvages de Suisse et d'Europe, tome II Piantanida, Lausanne.

127.Lang D. 2004. *Britain's Orchids*. WILDGuides Ltd., Old Basing.

128.Lauzer, D., St-Arnaud, M., Barabe, D. (1994) Tetrazolium staining and in vitro germination of mature seeds of *Cypripedium acaule* (*Orchidaceae*). Lindleyana 9: 197–204.

129.Leitch I.J., Kahandawala I., Suda J., Hanson L., Ingrouille M.J., Chase M.W., Fay M.F. (2009) Genome size diveristy in orchids: consequences and evolution. Annals of Botany. doi: 10.1093/aob/mcp003

130.Lienert J. (2004) Habitat fragmentation effects on fitness of plant populations – a review. Journal for Nature Conservation 12:53-72.

131.Light M.H.S., MacConaill M. (1998) Factors affecting germinable seed yield in *Cypripedium calceolus* var. *pubescens* (Wild.) Correll and *Epipactis helleborine* (L.) Crantz (Orchidaceae). Botanical Journal of the Linnean Society 126: 3–26.

132.Linden B. 1980. Aseptic germination of seeds of Northern Terrestrial orchids. Annales Botanici Fennici 17: 174–182.

133.Liu H., Feng C.L., Luo Y.B., Chen B.S., Wang Z.S, Gu H.Y (2010) Potential Challenges of Climate Change to Orchid Conservation in a Wild Orchid Hotspot in Southwestern China. The Botanical Review. 76: 174 -192.

134.Lugo Lugo H. (1955) Effects of nitrogen on the germination of *Vanilla planifolia*. Ameerican Journal of Botany 42:679–684. Available from http://www.jstor.org/stable/ doi:10.2307/2485329

135.Magrini S., De Carli A., Onofri S., Scoppola A. (2011) A comparative study of the seed germination capabilities of *Anacamptis palustris* (Orchidaceae), a threatened terrestrial orchid, and other more common *Anacamptis* species, by asymbiotic culture *in vitro.* European journal of environmental sciences. 2: 71-79.

136.Magrini S., De Vitis M. (2017) *In vitro* reproduction of three *Limodorum* species (Orchidaceae): impactis of scarification methodas and nitrogen sources on mature seed germination and seedling development. Plant Biosystems. 151(3): 419-428.

137.Mahendran G., Muniappan V., Ashwini M., Muthukumar T., NarmathaBai V. (2013) Asymbiotic seed germination of *Cymbidium bicolor* Lindl. (Orchidaceae) and the influence of mycorrhizal fungus on seedling development. Acta Physiologiae Plantarum 35: 829–840

138.Malmgren S. (1992) Large-scale asymbiotic propagation of Cyperdium calceolus – plant physiology from surgeon's point of view. Bot Gard Microprop News 1: 59-63

139.Malmgren S. (1996) Orchid propagation. Theory and practice. In: Allen C., editor. North American native terrestrial orchids. Propagation and production. North American native terrestrial orchid Conference Proceedings. Germination MD: C.Allen. pp 63-71.

140.Manning J.C., van Staden J. (1987) The development and mobilization of seed reserves in some African orchids. Australian Journal of Botany 35: 343-353

141.Marhold K., Jongepierova I., Krahulcova A., Kučera J. (2005) Morphological and karyological deifferentiation of *Gymnadenia densiflora* and *G. Conopsea* in the Czech Republic and Slovakia. Presila. 77: 159-176.

142.Martinez A.C., Perez E.S. (2019) Orchids of Central Spain (Cuenca Province) : a field guide. Jaca : Jolube Consultor Botánico. Pp 164.

143.McKinley T., Camper N.D. (1997) Action spectra of *in vitro* asymbiotic germination of *Goodyera repens* var. ophioides. Lindleyana 12:30-33.

144.Meekers T., Hutchings M., Honnay O., Jacquemyn H. (2012) Biological flora of the British Isles: *Gymnadenia conopsea* s.l. Journal of Ecology. 100: 1269-1288.

145.Miljković Lj. (1998) Geološki sastav i tektonski odnosi u Sremu. In: Romelić J., Plavša J., Lazić L. (ur.) Reljef Srema, Regionalno geografska proučavanja

Vojvodine, Srem, Novi Sad: Prirodno-matematički fakultet - Institut za geografiju, str. 13-18.

146.Miljković N. (1975) Zemljišta Fruške gore. Marica Srpska.

147.Miljković N. (1996) Osnovi pedologije. Univerzitet u Novom Sadu. Prirodno-matematički fakultet. Institut za geografiju.

148.Miljković N. (2005) Meliorativna pedologija. Univerzitet u Novom Sadu. Poljoprivredni fakultet. Deoartman za uređenje voda i JVP „Vode Vojvodine“. Novi Sad

149.Miller G.M. (2007) Environmental Metabolomics: A SWOT Analysis (Strengths, Weaknesses, Opportunities, and Threats). Journal of reviews proteome research. 6: 540–545.

150.Miyoshi, K. (1988) Germination of terrestrial orchids from temperate regions: enhancement of asymbiotic germination by Calanthe spp. In: Kako, S. (Eds.), Biotechnology in Orchid. Seibundo-shinkosya, Tokyo, pp. 30–35

151.Mohanty P., Das M.C., Kumaria S., Tandon P. (2012) High-efficiency cryopreservation of the medicinal orchid Dendrobium nobile Lindl. 109(2): 297-305.

152.Molnár A.V., Kreutz K. (CAJ), Óvári M., Sennikov A.N., Bateman R.M., Takács A., Somlyay L., Sramkó G. (2012) *Himantoglossum jankae* (Orchidaceae: Orchideae), a new name for a long misnamed lizard orchid. Phytotaxa 73:8–12

153.Moore R. T. (1988) The genera Rhizoctonia-like fungi: Ascorhizoctonia, Ceratorhiza gen. Nov., Epulorhuza gen. nov., Moniliopsis and Rhizoctonia. Mycotaxon. 29: 31-99.

154.Moscone E.A., Rosabelle A., Schwarzacher T., Schweizer D., Pedrosa-Harand A. (2007). Complex rearrangements are involved in *Cephalanthera* (Orchidaceae) chromosome evolution. Chromosome Research. 15(7): 931-943.

155.Muir H.J., (1987) Symbiotic microporpagation of *Orchis laxiflora*. Orchid Review. 95: 27-29.

156.Myers N., Mittermeier R.A., Mittermeier C.G., Da Fonseca G.A.B., Kent J. (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature. 403: 853–858

157.Nanekar V., Shiriram V., Kumar V., Kishor K. (2014) Asymbiotic *In vitro* Seed germination and Seedling Development of Eulophia nuda Lindl., An Endangered medicinal Orchid. Proceedings of the National Academy of Sciences, India, Section B Biological Sciences. 84(3):837-846.

158.Nau J. (2007) Cultivar testing. In Flower Breeding and Genetics. Springer Netherlands. pp. 65-79.

159.Nešković M., Konjević R., Ćulafić Lj. (2010). Fiziologija biljaka. Drugo dopunjeno izdanje. NNK-international. Beograd. Srbija. 429 str.

160.Nilsson L.A. (1983) Processes of isolation and introgressive interplay between *Platanthera bifolia* (L.) Rich and *P. chlorantha*(Custer) Reichb. (Orchidaceae) Botanical Journal of the Linnean Society. 87: 325–350.

161.Okada H. (1988) Karyomorphological observations of *Apostasia nuda* and *Neuwiedia veratrifolia* (Apostasiaceae, Orchidaceae). Journal of Japanese Botany. 63: 344–350

162.Otto F. (1990): DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow citometry of nuclear DNA. In: Crissman HA, Darzynkiewicz Z. Eds. Methods in cell biology. Vol. 33. New York, NY: Academic press. 105-110.

163.Paul J., Budd C., Freeland J. (2013) Conservation genetics of an endangered orchid in eastern Canada. Conservation Genetics. 14:195-204.

164.Pedersen H.Æ. and Faurholdt N. (2007) *Ophrys.* The Bee Orchids of Europe. Kew Publishing. Royal Botanic Gardens, Kew, London.

165.Peterson R. L., Massicotte H.B., Melville L.H. (2004) Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology. National Research Council Research Press. Ottawa

166.Peterson R.L., Uetake Y., Zelmer C.J. (1998) Fungal symbiosis with orchid protocorms. Symbiosis. 25: 29-55.

167.Petković K. (1975) Geološka terminologija i nomenklatura – Knjiga IV – petrologija. Zavod za regionalnu geologiju i paleontologiju Rudarsko-geološkog fakulteta, Univerzitet u Beogradu, Beograd.

168.Petković K. (1975) Geološka terminologija i nomenklatura – Knjiga I – stratigrafija i paleogeografija. Zavod za regionalnu geologiju i paleontologiju Rudarsko-geološkog fakulteta, Univerzitet u Beogradu, Beograd.

169.Petković K. Čučulić-Trifunović M., Pašić M., Rakić M (1976): Fruška gora-monografski prikaz geološke građe i tektonskog sklopa. Matica srpska, Novi Sad.

170.Phitos D., Strid A., Snogerup S., Greuter W., (Eds.) (1995) The Red Data. Book of Rare and Threatened Plants of Grece. W.W.F. Athens.

171.Pierce S, Ferrario A, Cerabiolini B (2010) Outbreeding and asymbiotic germination in the conservation of the endangered endemic *Ophrys benacensis*. Plant Biosyst 144(1): 121-127.

172.Pierce S., Guidi V., Ferrario A., Ceriani R., Labra M., Vagge I., Cerabolini. (2013) Pea seed extracts stimulate germination of the terrestrial orchid *Ophrys apifera* Huds. during a habitat restoration project. Pant Biosystems. 149 (1) DOI:10.1080/11263504.2013.809814

173.Pignatti S. (1982) Flora d'Italia. Vol. 3. Edagricole, Bologna.

174.Ponert J., Figura T., Vosolsobe S., Lipavska H., Vohnik M., Jersakova J. (2013) Asymbiotic germination of mature seeds and protocorm development of *Pseudorchis albida* (Orchidaceae) are inhabited by nitrates even at extremely low concentrations. Botany. 91:662–670

175.Preston C.D., Pearman D.A., Dines T.D. (2002) New Atlas of the British &Irish Flora. Oxford University Press, Oxford, UK

176.Qien D., O'Neill J.P., Whigham D.F., McCormick M.K. (2008) Germination ecology of the boreal-alpine terrestrial orchid *Dactylorhiza lapponica* (Orchidaceae). Annales Botanici Fennici. 45: 161–172.

177.Quave C.L., Pieroni A. (2015) A reservoir of ethnobotanical knowledge informs resilient food security and health strategies in the Balkans. Nature Plants 1: 14021.

178.Quillet M. C., Madjidian N., Griveau T., Serieys H., Tersac M., Lorieus M., and Berville A. (1995) Mapping genetic factors controlling pollen viability in an interspecific cross in Helianthus section Helianthus. Theoretical and Applied Genetics. 91: 1195–1202.

179.Quiroz K., Saavedera J., Hermine V., Verdugo G., Caligari P., Garcia-Gonzales R. (2017) *In vitro* asymbiotic germination for micropropagation of the recalcitrant terrestrial orchid *Chloraea crispa* (Orchidaceae). Applications in plant sciences 5(8): 1600142.

180.Rackham O. (2003) Ancient Woodland. 2nd edn. Castlepoint Press, Colvend, UK.

181.Radak B., Vlku A. Z., Peškanov J., Matevski V., Anačkov G. (2019): Morphological characterization of three natural hybrid orchid taxa, new for Serbia, Montenegro and North Macedonia. Archives of Biological Sciences. In Press.

182.Raghavan V., Torrey J.G. (1964) Inorganic nitrogen nutrition of the seedlings of the orchid, Cattleya. American Journal of Botany. 51: 264-274.

183.Ramsay M.M., Dixon K.W. (2003) Propagation science, recovery and translocation of terrestrial orchids. In: Dixon KW, Kell SP, Barrett RL, Cribb PJ, eds. Orchid conservation. Kota Kinabalu, Sabah: Natural History Publications. 259–288

184.Ramsay R.R., Sivasithamparam K., Dixon K.W. (1986) Patterns of infection and endophytes associated with Western Australian orchids. Lindleyana. 1: 203–214.

185.Ranković B. (2003) Sistematika gljiva. Prirodno matematički Fakultet. Kragujevac

186.Rasmussen F.N. 1985. Orchids. In: The families of the monocotiledons – structure, evolution and taxonomy. R. Dahlgren, H.T. Cliford, P.F.Yeo (eds). Springer, Berlin: 249-274.

187.Rasmussen H.N. (1992) Seed dormancy patterns in *Epipactis palustris* (Orchidaceae): Requirements for germination and establishment of mycorrhiza. *Physiologia Plantarum* 86: 161-167

188.Rasmussen H.N. (1995) Terrestrial orchids, from seed to mycotrophic plant. Cambridge University Press. Great Britain

189.Rasmussen H.N. (2002) Recent developments in it he study of orchid mycorrhiza. Plant and Soil. 224: 149-163.

190.Rasmussen H.N. Andersen T.F. Johansen B (1990) Light stimulation and darkness requirement for the symbiotic germination of *Dacylorhiza majalis in vitro*. Phisiologia Plantarum 79: 226-30.

191.Rasmussen H.N., Rasmussen F.N. (1991) Climactic and seasonal regulation of seed plant establishment in *Dactylorhiza majalis* inferred from symbiotic experiments *in vitro*. Lindleyana 5: 221–227.

192.Rasmussen H.N., Rasmussen F.N. (2007) Trophic relationships in orchid mycorrhiza-diversity and implications for conservation. Lankesteriana. 7(1-2): 334-341.

193.Robatsch K. (1983) Beiträgezur Blüten biologie und Autogamie der Gattung Epipactis. Jahresber Naturwiss Ver Wuppertal 36:25-32.

194.Robbirt K.M., Roberts D.L., Hutchings M.J., Davy A.J. (2014) Potential Disruption of Pollination in a Sexually Deceptive Orchid by Climatic Change. Current Biology 24: 2845–2849.

195.Roberts D.L., Dixon K.W. (2008) Orchids. Current Biology. 18: 325–329.

196.Rossi W. (2002) Orchidee d'Italia. Ministero dell'ambiente e della tutela del territorio, Direzione conservazione della natura : Istituto nazionale per la fauna selvatica, Bologna.

197.Roy J., N. Banerjee. (2002) Optimization of *in vitro* seed germination, protocorm growth and seedling proliferation of *Vanda tessellata* (Roxb.) Hook. ex G. Don. Phytomorphology. 52: 167-178.

198.Savić D. (1998) Ekologija, rasprostiranje I zaštita vrsta familije *Orchidaceae* na Fruškoj gori. Magistarski rad. Biološki fakultet. Beograd.

199.Sazak A., Ozdener Y. (2006) Symbiotic and asymbiotic germination of endangered *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall. and *Dactilorhiza osmanica* (Kl.) Soo var. *Osmanica* (Endemic). Pakistan journal of Biological sciences 9(12): 2222-2228.

200.Schiestl F.P., Huber F.K., Gomez J.M. (2011) Phenotypic selection on floral scent: trade-off between attraction and deterrence? Evolutionary Ecology 25:237–248

201.Scopece G., Widmer A., Cozzolino S. (2008) Evolution of Postzygotic Reproductive Isolation in a Guild of Deceptive Orchids. American Naturalist. 171(3): 315-326.

202.Seaton P.T., Hu H., Perner H., Pritchard H.W. (2010) *Ex situ* conservation of orchids in a warming world. Botanical Review 76: 193–203.

203.Seaton P.T., Pritchard H.W. (2003) Orchid germplasm collection, storage and exchange. In: Dixon KW, Kell SP, Barrett RL, Cribb PJ (Eds), Orchid Conservation. Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah. Pp 227-258

204.Sell P., Murrell, G. (1996) Flora of Great Britain and Ireland, vol. 5. Cam-bridge University Press, Cambridge, UK.

205.Selosse M.A., Faccio A., Scappaticci G., Bonfante P. (2004) Chlorophyllous and Achlorophyllous Specimens of *Epipactis microphylla* (Neottieae, Orchidaceae) Are Associated with Ectomycorrhizal Septomycetes, including Truffles. Microbial Ecology. 47: 416-426.

206.Sezik E. (2002) Turkish Orchids and Salep. Acta Pharamaceutica Turcica. 44: 151-157.

207.Sgarbi E, Grimaudo M, Del Prete C (2009) *In vitro* asymbiotic germination and seedling development of *Limodorum abortivum* (Orchidaceae). Plant Biosystems 143:114–119

208.Sgarbi E., Grimaudo M., Del Petre C. (2007) *In vitro* asymbiotic growth of Mediterranean terrestrial orchids from immature seed. Journal of European Orchid 39: 611-624.

209.Shan X.C., Liew E.C.Y., Weatherhead M.A., Hodgkiss I.J. (2002) Characterization and taxonomic placemant of *Rhizoctonia*-like endofites from orchid root. Mycologia. 94(2): 230-239.

210.Shang X., Guo X., Liu Y., Pan H., Miao X., Zhang J. (2017) *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br.: A Systemic Review of the Ethnobotany, Phytochemistry, and Pharmacology of an Important Asian Folk Medicine. Frontiers in Pharmacology. 8:24 doi: 10.3389/fphar.2017.00024

211.Sharon M., Kuninaga., Hyakumachi., Naito S., Sneh B. (2008) Classification of *Rhizoctonia* spp. using rDNA-ITS sequence analysis supports the genetic basis of the classical anastomosis grouping. Mycoscience. 49(2): 230-239.

212.Silvestre S. (1983) Numeros cromosomicos para la flora española, 295–300. Lagascalia. 12:133–135.

213.Sim E.G., Loh C.S., Goh C.J. (2007) High frequency early in vitroflowering of Dendrobium Madame Thong-In (Orchidaceae). Plant Cell Replication. 26: 383-393.

214.Simakov V.N. (1957) The use of phenylathranilic acid in the determination of humus by Tyurins method. Pochvovedenie. 8: 72-73

215.Sinker C.A., Packham J.R., Trueman I.C., Oswald P.H., Perring F.H., Prestwood W.V. (1985) Ecological Flora of the Shropshire Region. Shropshire Trust for Nature Conservation, Shrewsbury, UK.

216.Snech B., Bupree L., Ogoshi A. (1991) *Identification of Rhizoctonia species*. American Phytopatological Society. Minnesota. USA

217.Spoerl E., Curtis J.T. (1948) Studies of the nitrogen nutrition of orchid embryos. III. Amino acid nitrogen. American Orchid Society Bulletin. 17: 307–312.

218.Stace C. (2010) New Flora of the British Isles, 3rd edn. Cambridge UniversityPress, Cambridge, UK.

219.Stace C.A. (ed.) (1975) Hybridization and the Flora of the British Isles. Academic Press, London, UK

220.Stark C., Babik W., Duka W. (2009) Fungi from the roots of the common terrestrial orchid *Gymnadenia conopsea*. Mycological research. 113: 952-959.

221.Stenberg M.L., Kane M.E. (1998) *In vitro* seed germination and greenhouse cultivation of *Encyclia boothiana* var. erythronioides, an endangered Florida orchid. Lindleyana. 13: 101–112.

222.Stewart J. (1989) The genus Stenoglottis. Kew Magazine. 6(1): 9-22.

223.Stewart S., Kane M. (2006) Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 86:147-158.

224.Stewart S.L., Kane M.E. (2007) Symbiotic seed germination and evidence for in vitro mycobiont specificity in Spiranthes brevilabris (Orchidaceae) and its implications for species-level conservation. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant 43: 178-186

225.Stewart S.L., Zettler L.W. (2002) Symbiotic germination of three semi-aquatic rein orchids (*Habeneria repens*, H. *quinqueseta*, *H. macroceratitis*) from Florida. Aquatic Botany. 72:25–35.

226.Stoutamire W (1964) Seeds and seedlings of native orchids. Mich Bot 3:107–119

227.Stoutamire W (1974) Terrestrial orchid seedling. In: Withner CL (ed) The orchids: Scientific studies. Wiley-Interscience, New York, NY pp 101–128

228.Stroh P.A. (2016) *Orchis militaris* L. Military Orchid. Species Account. Botanical Society of Britain and Ireland.

229.Summerhayes V.S. (1951) Wild Orchids of Britain. Collins, London, UK.

230.Swarts N.D., Dixon K.W. (2009) Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. Annals of Botany. 104: 543-556.

231.Takhtajan A. (2009) Flowering Plants. Second Edition. Springer. pp 1-906.

232.Tali K., Foley M., Kull T. (2004) *Orchis ustulata* L. Journal of Ecology. 92: 174-184.

233.Tamer C.E., Karaman B., Copur O.U. (2006) A Traditional Turkish Beverage: Salep. Food Reviewers International.

234.Tang C.Y., Chen W.H. (2007) Breeding and development of new varieties in Phalaenopsis. In: Chen W.H, Chen H.H. (Eds.) Orchid Biotechnology. Word scientific. Hong Kong. pp 1-22

235. Tatić B., Blečić B. (2002) Sistematika I filogenija viših biljaka. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva Beograd. Татић, Б., Блечић, В. (2002).

236.Tavares A, Young JL, Ori S Kanashiro, Lima G, Chu E, Suzuki R (2012) Orchid *in vitro* growth as affected by nitrogen levels in the culture medium. Hortic Bras 30:119–124

237.Toole VK (1963) Light control of seed germination. Ass Office Seed Anal. 53:124-143

238.Travnicek P., Kubatova B., Čurin V., Rauchova J., Krajnikova E., Jersakova J., Suda J. (2011) Remarkable coexistence of multiple cytotypes of the Gymnadenia conopsea aggregate (the fragrant orchid): evidence from flow cytometry. Annals of Botany. 107:77-87.

239.Travnicek P., Ponert J., Urfus T., Jersakova J., Vrana J., Hribova E., Dolezel J., Suda J. (2015) Challenges of flow-cytometric estimation of nuclear genome size in orchids, a plant group with both whole-genome and progressively partial endoreplication. Cytometry A. 87A:958–966.

240.Tremblay R.L., Ackerman J.D., Zimmerman J.K., Calvo R.N. (2005) Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. Biological Journal of the Linnean Society 84: 1–54.

241.Tsintides T., Christodoulou C.S., Delipetrou P. and Georghiou K. 2007. The Red Data Book of the Flora of Cyprus. Cyprus Forestry Association, Lefkosia.

242.Tyurin I.V. (1931) A modification of volumetric method of humus determination with chromic acid. Pochvovedenie, (5/6). 36.

243.Utami E.S., Purnobasuki H., Soedarti T., Hariyanto S. (2015) Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Paphiopedilum liemianum* Fowlie, an endangered terrestrial orchid in Nothern Sumatra, Indonesia. Journal of plant sciences 10(1): 25-34.

244.Vacin E.F. and Went F.W. (1949) Some pH changes in nutrient solutions. Botanical Gazette. 110(4): 605-613.

245.Vakhrameeva, M.G., Tatarenko, I.V., Varlygina, G.K. and Zagulskii, M.N. 2008. Orchids of Russia and adjacent countries (within the borders of the former USSR). A. R. G. Gantner Verlag, Ruggell, Liechtenstein.

246.Valletta A., Attorre F., Bruno F., Pasqua G. (2008) *In vitro* asymbiotic germination of *Orchis mascula*. Plant Biosystems. 142(3): 653-655.

247.Van Waes J., Devergh P.C. (1986) *In vitro* germination of some Western European orchids. Phisiologia Plantarum. 66:224-253

248.Vejsadova H. (2006) Factors affecting seed germination and seedling growth of terrestrial orchids under in vitro conditions. Acta Biologia Cracoviensia. 48(1): 109-113.

249.Vellupillai M., Swarup S., Goh C.J. (1997) Histological and protein changes during early stages of seed germination in the orchid *Dendrobium crumenatum*. Journal of Horticultural Science. 76:941–948.

250. Vujanović V., St-arnaud M., Barabe D., Thibeault G. (2000) Viability testing of orchid seeds and the promotion of colouration and germination. Annals of Botany. 86:79-86.

251. Warcup J.H., Talbot P.H.B. (1966) Perfect stages of some Rhizoctonia's. Transactions of the British Mycological Society. 49: 427-435.

252. Weijer J. (1952) The colour differences in *Epipactis helleborine* (L.) Cr. Wats. & Coult. and the selection of the genetical varieties by environment. Genetica 26:1–32

253. Whigham F. D., Willems H.J. (2003) Demographic studies and life history strategies of temperate terrestrial orchids as a basis for conservation. In: Dixon K.W., Kell S.P., Barrett R.L., Cribb P.J. (Eds), Orchid Conservation. Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah, pp. 137-158

254. Willems J.H. (2006) Herfstschroeforchis. Portret van een Laatbloeier. Stichting Natuurpublicaties Limburg, Maastricht, The Netherlands. Stichting Natuurpublicaties Limburg, Maastricht, The Netherlands

255. Wochok Z.S. (1981) The role of tissue culture in preserving threatened and endangered plant species. Biological Conservation. 20: 83-89.

256. Wood J. (1993) *Limodorum abortivum*: Orchidaceae. Cutrtis's Botanical Magazine. 10(4): 161-166.

257. Wotavová K., Balounová Z., Kindlmann P. (2004) Factors affecting persistence of terrestrial orchids in wet meadows and implications for their conservation in a changing agricultural landscape. Biological Conservation. 118:271–279.

258. Xu J., Mu C. (1990) The relation between growth of Gastrodia elata protocorms and fungi. Acta Botanica Sinica 32: 26-33.

259. Yam T.W., Arditti J. (2009) History of orchid propagation: a mirror of the history of biotechnology. Plant Biotechnology Reports. 3:1-56

260. Yamazaki J., Kazumitsu M. (2006) *In vitro* asymbiotic germination of immaeture seed and formation of protocorm by *Cephalanthera falcate* (Orchidaceae). Annals of Botany 98: 1197-1206.

261. Yates R.C. and Curtis J.T. (1949) The effect of sucrose and other factors shoot-root ratio of the orchid seedling. American Journal of Botany. 36(5): 390-396.

262. Yoder J.A., Zettler L.W., Stewart S.L. (2000) Water requirements of terrestrial and epiphytic orchid seeds and seedlings, and evidence for water uptake by means of mycotrophy. Plant Science 156(2): 145-150

263. Yong J., Ge L., Ng J., Tan S. (2009) The chemical composition and Biological properties of Coconut (*Cocos nucifera L.*) Water. Molecules 14: 5144-5164

264. Young A.G., Boyle T., Brown T. (1996) The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. Trends in Ecology and Evolution 11: 413–418.

265. Yukava T., Ogura-Tsujita Y., Shefferson R., Yokoyama J. (2009) Mycorrhizal diversity in *Apostasia* (Orchidaceae) indicates the origin and evolution of orchid mycorrhiza. American Journal of Botany 96(11): 1997-2009.

266. Zelmer C.D. (1994) Interaction between northern terrestrial orchids and fungi in nature. MSc Thesis, University of Alberta, Edmonton, Canada.

267. Zeng S.J., Zhang Y., Teixeira da Silva J.A., Wu K.L., Zhang J., Duan J. (2014) Seed biology and *in vitro* seed germination of *Cyperdium*. Critical Reviews in Biotechnology. 34(4): 358-371.

268. Zettler L.W. (1997) Terrestrial orchid conservation by sibriotic seed germination: techniques and perspectives. Selbayana. 18(2): 188-194.

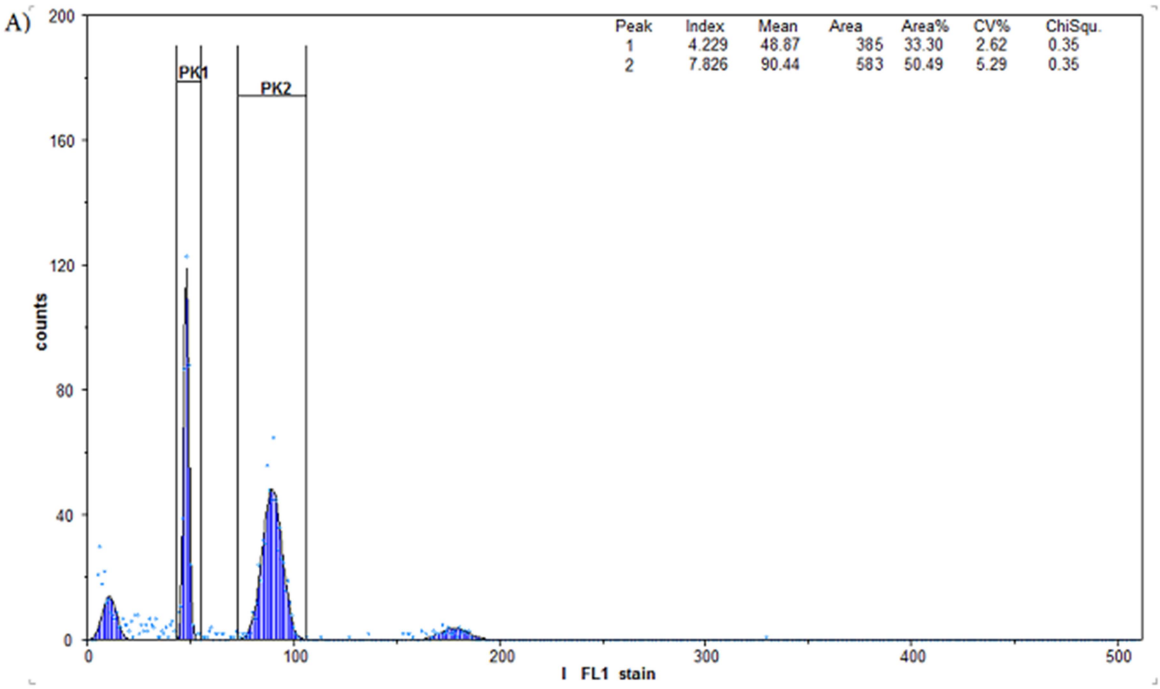
269. Zettler L.W., Hofer C.J. (1998) Propagation of the little club-spur orchid (*Platanthera clavellat*) by symbiotic seed germination, and its ecological implications. Environmental and experimental botany. 39:189-195.

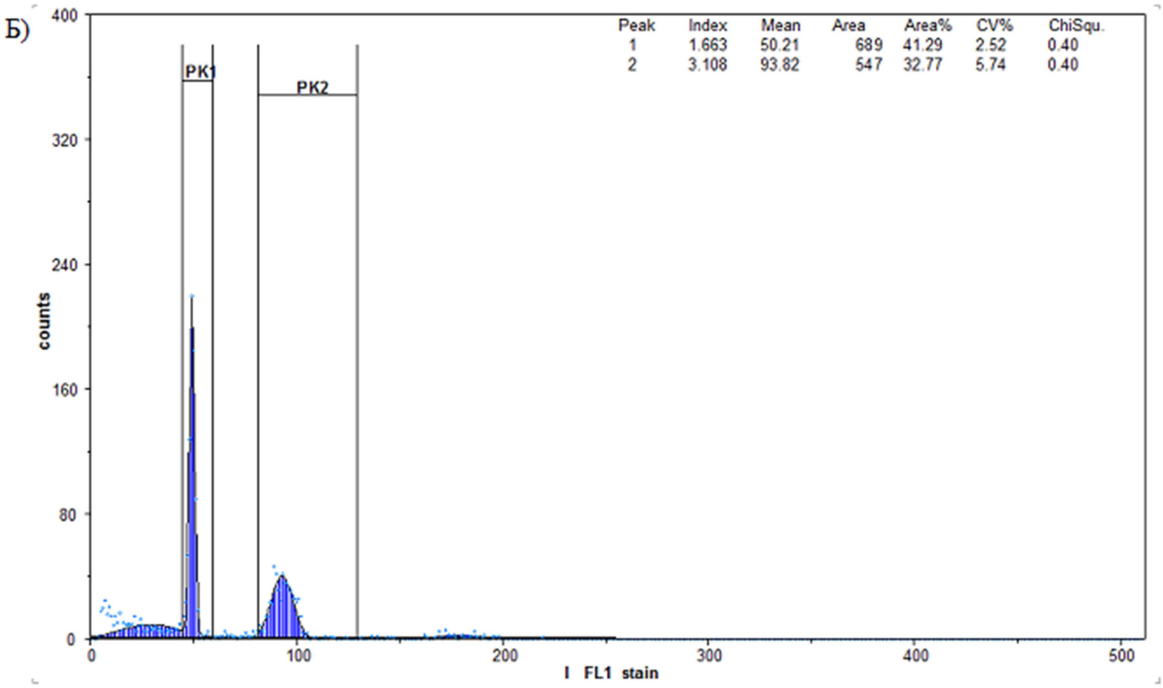
270. Zettler L.W., McInnis T.M. (1992) Propagation *of Platanthera integrilabia* (Corell) Luer, an endangered terrestrial orchid, through symbiotic seed germination. Lindleyana. 7:154-161.

271. Znaniecka J., Lojkowska E. (2004) Establishment of *in vitro* culture collection of endangered European orchids. Bulletin of Botanical Gardens. 13:69–73.

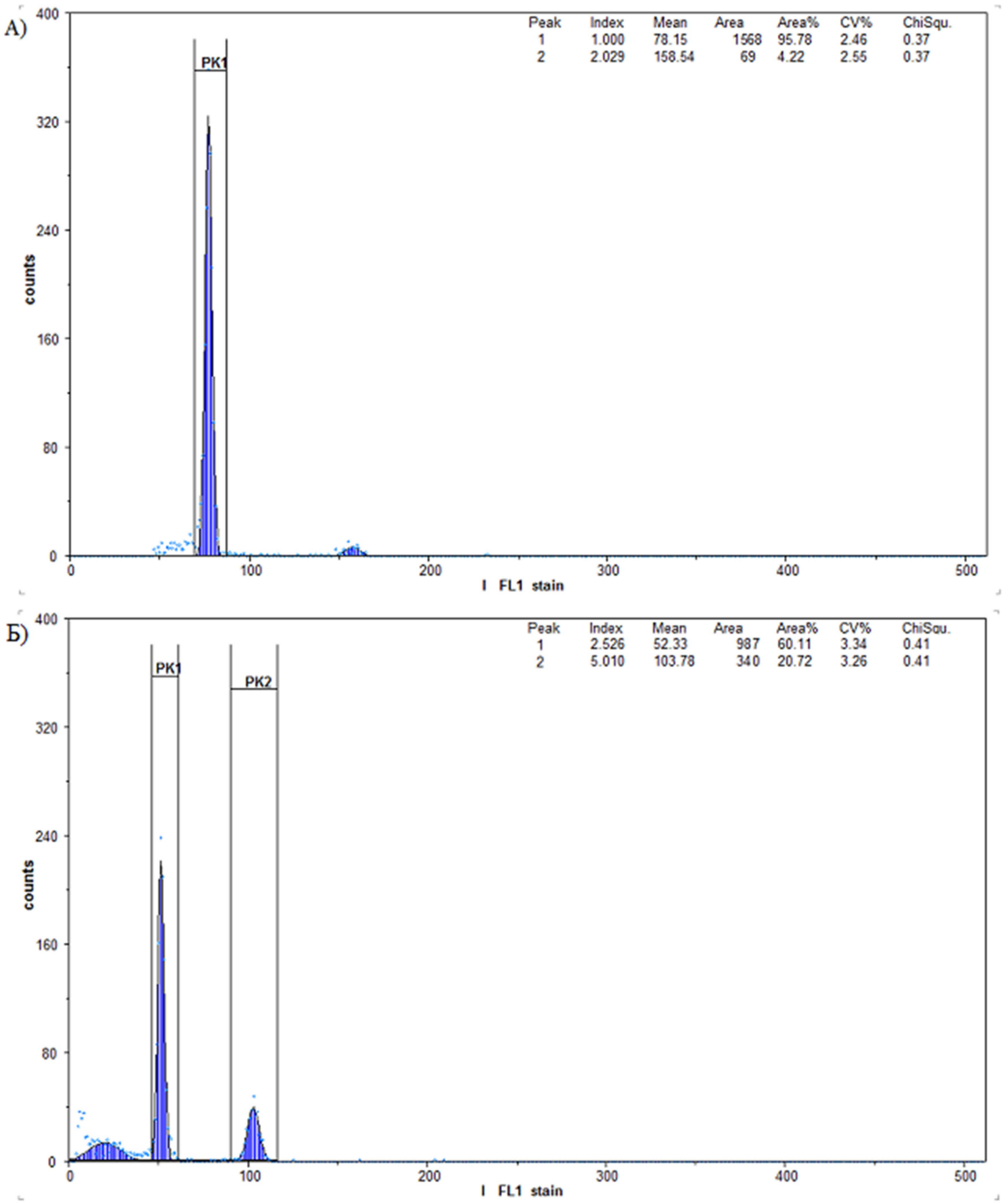
ПРИЛОЗИ

Прилог 1. Хистограми проточне цитометрије добијене из јединки *A. pyramidalis* из различитих популација: а) Беочин 1; б) Главица

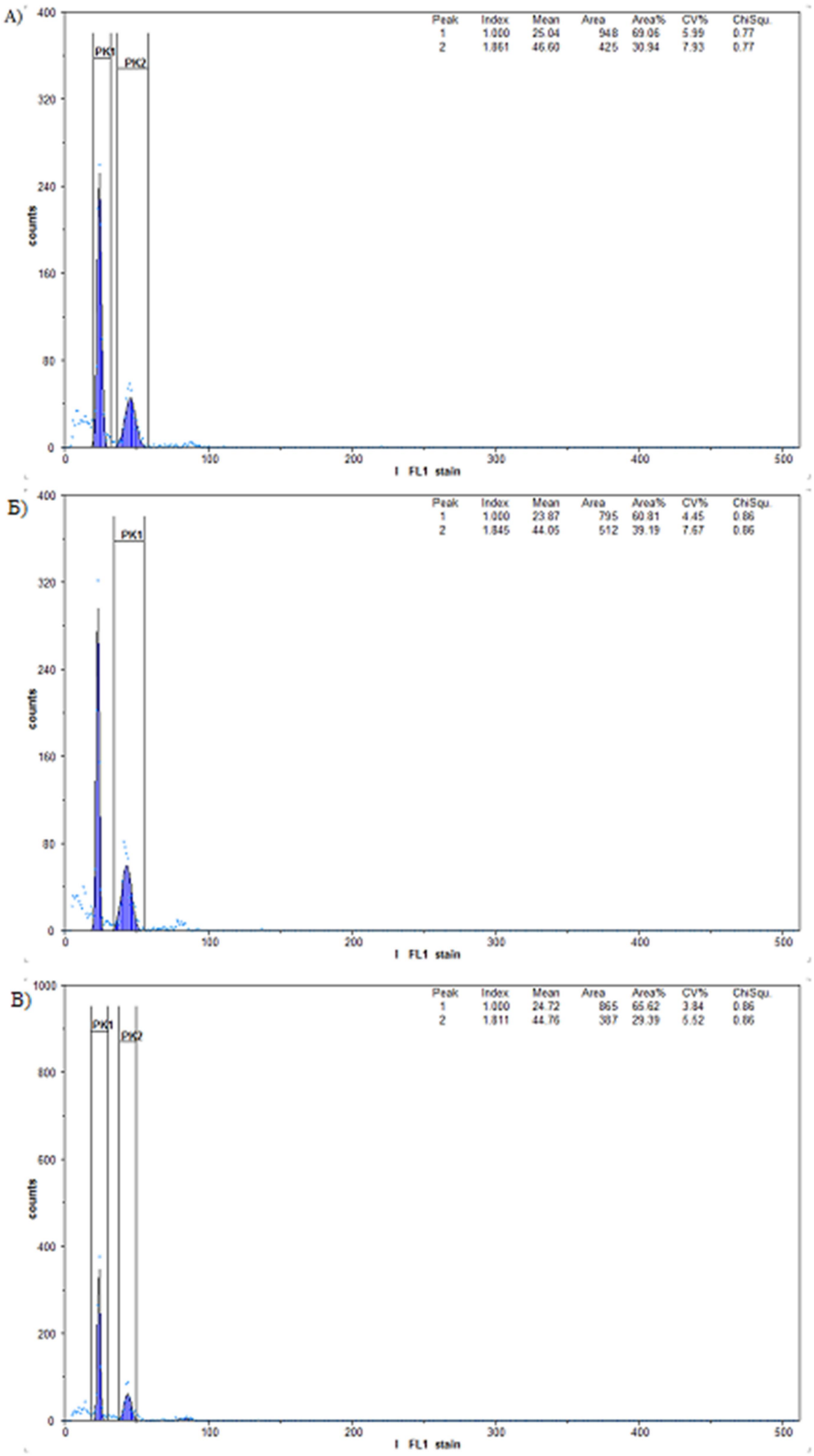




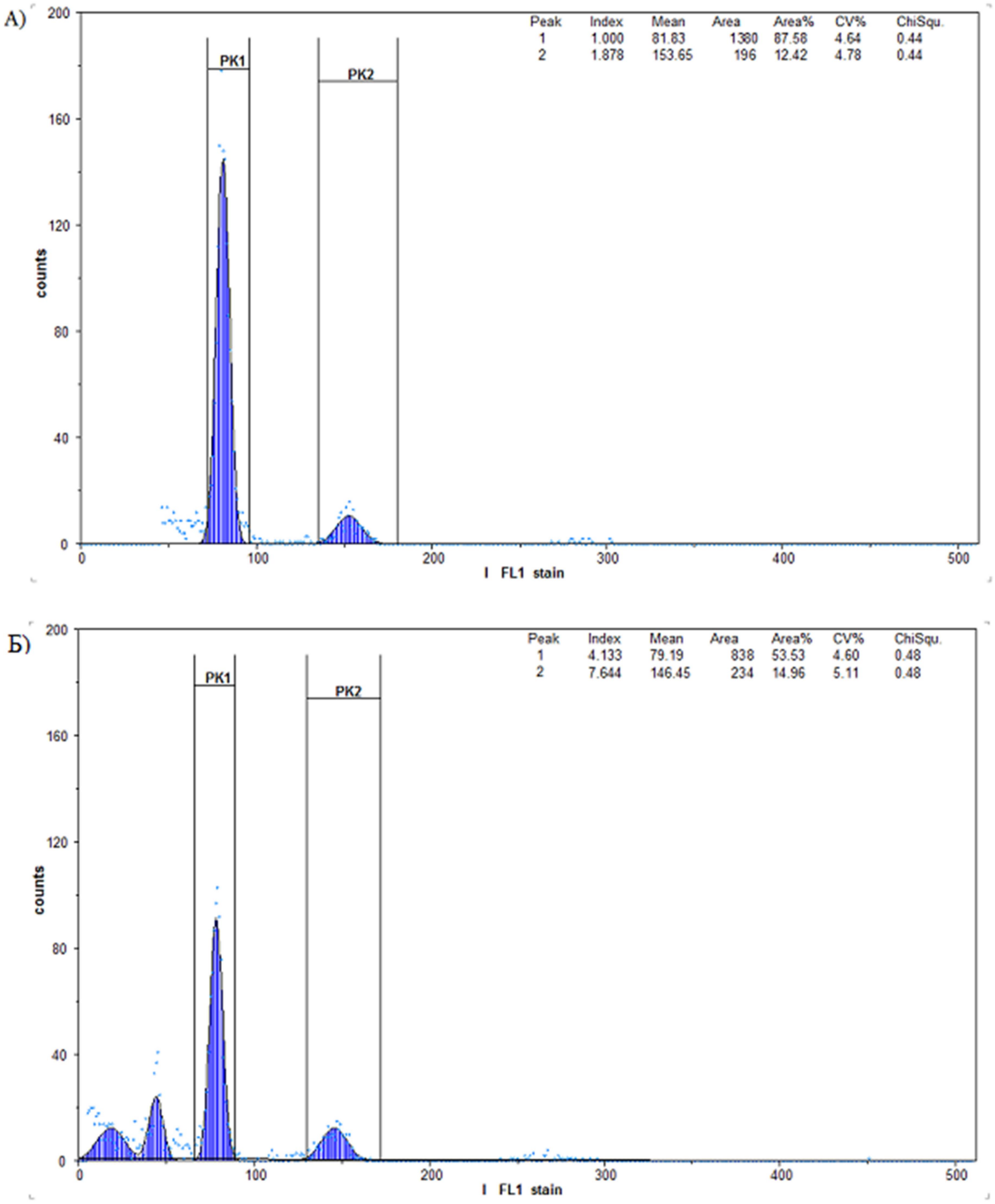
Прилог 2. Хистограми проточне цитометрије добијене из јединки врста: а) *C. longifolia*; б) *E. microphylla*



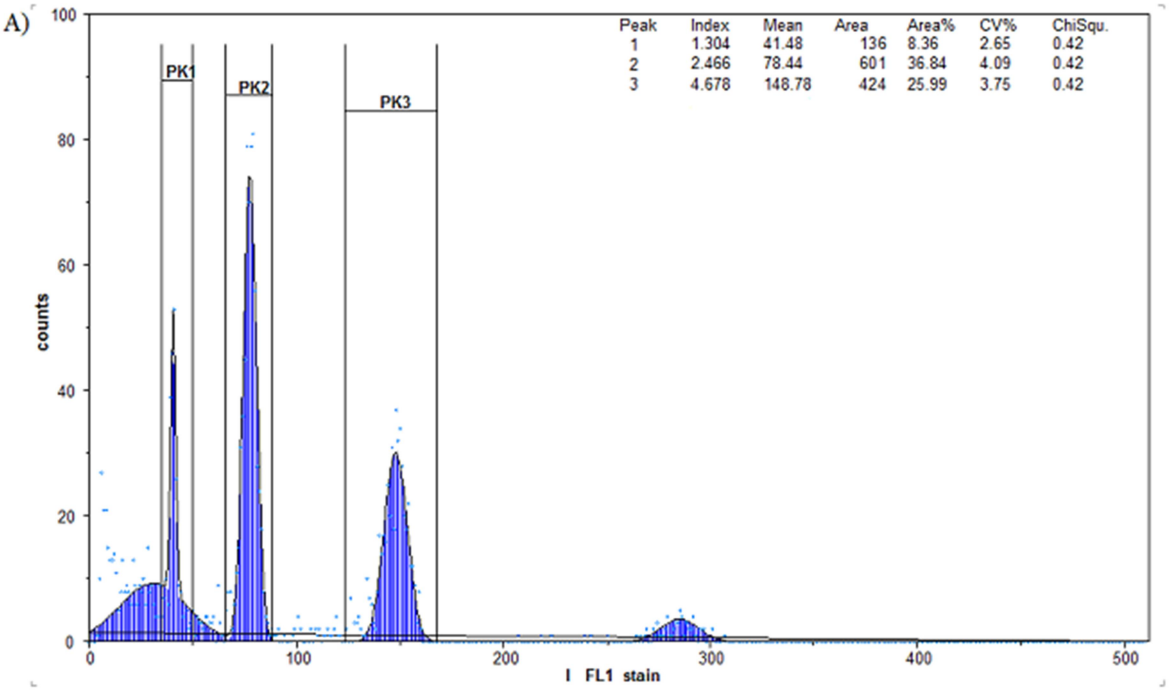
Прилог 3. Хистограми проточне цитометрије добијене из јединки врсте *G. conopsea* из различитих популација: а) Беочин 1; б) Беочин 3 в) Главица

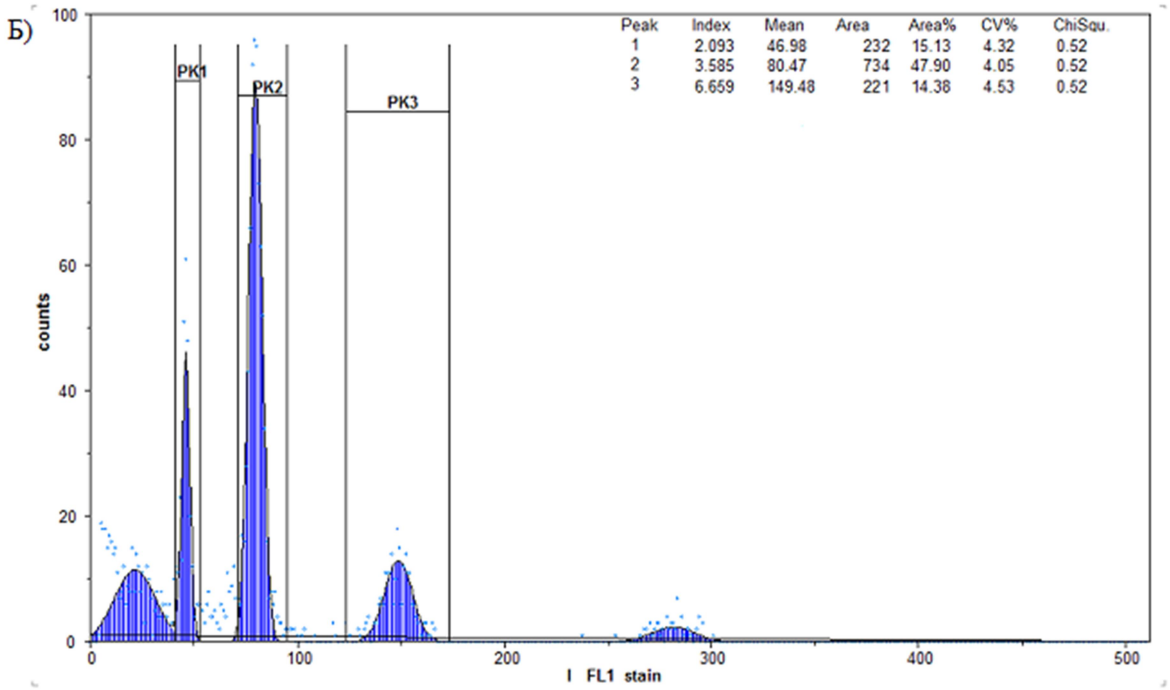


Прилог 4. Хистограми проточне цитометрије добијене или утврђене из јединки врсте *O. militaris* из различитих популација: а) Беочин 1; б) Главица

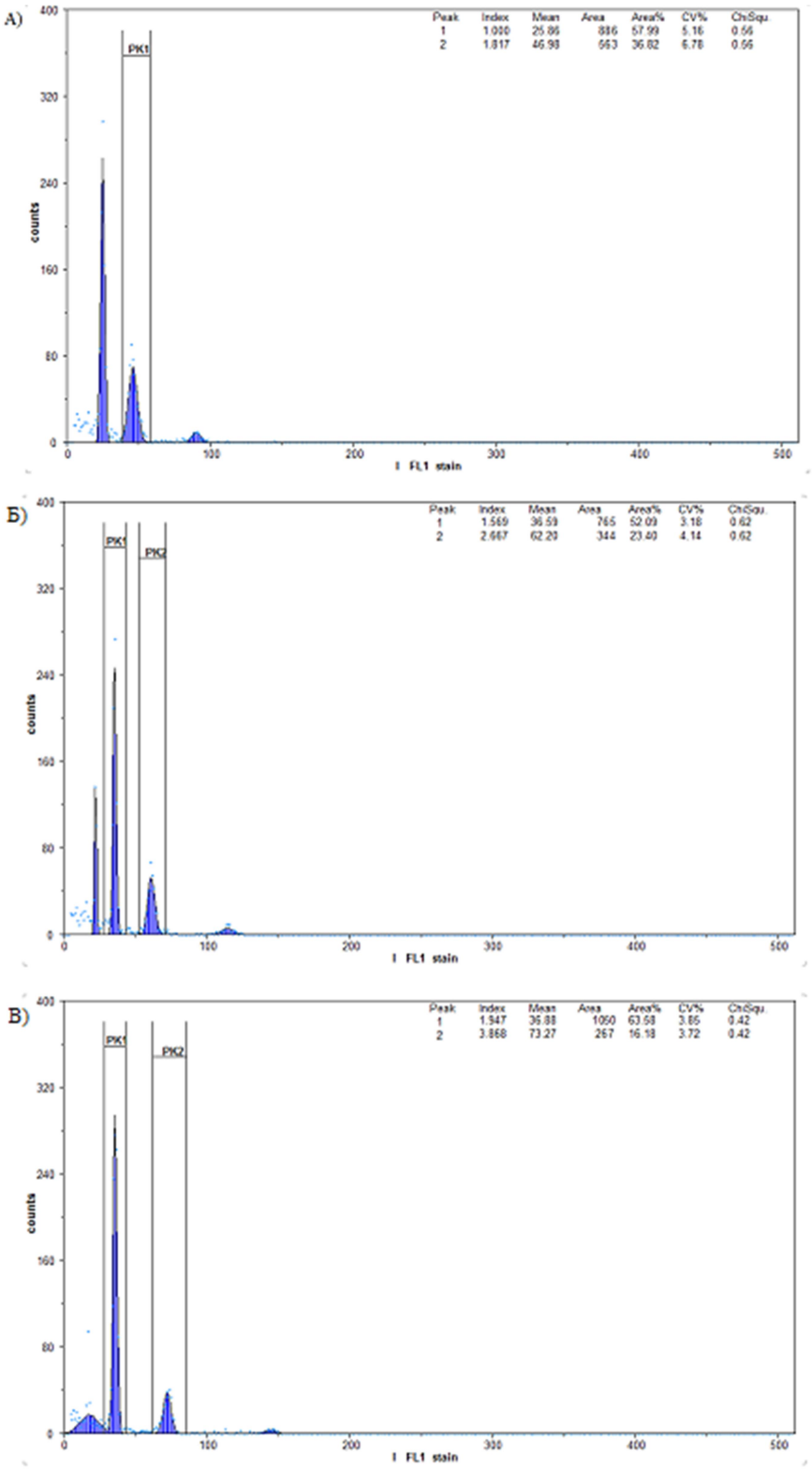


Прилог 5. Хистограми проточне цитометрије добијене из јединки врсте *O. purpurea* из различитих популација: а) Беочин 1; б) Беочин 3.

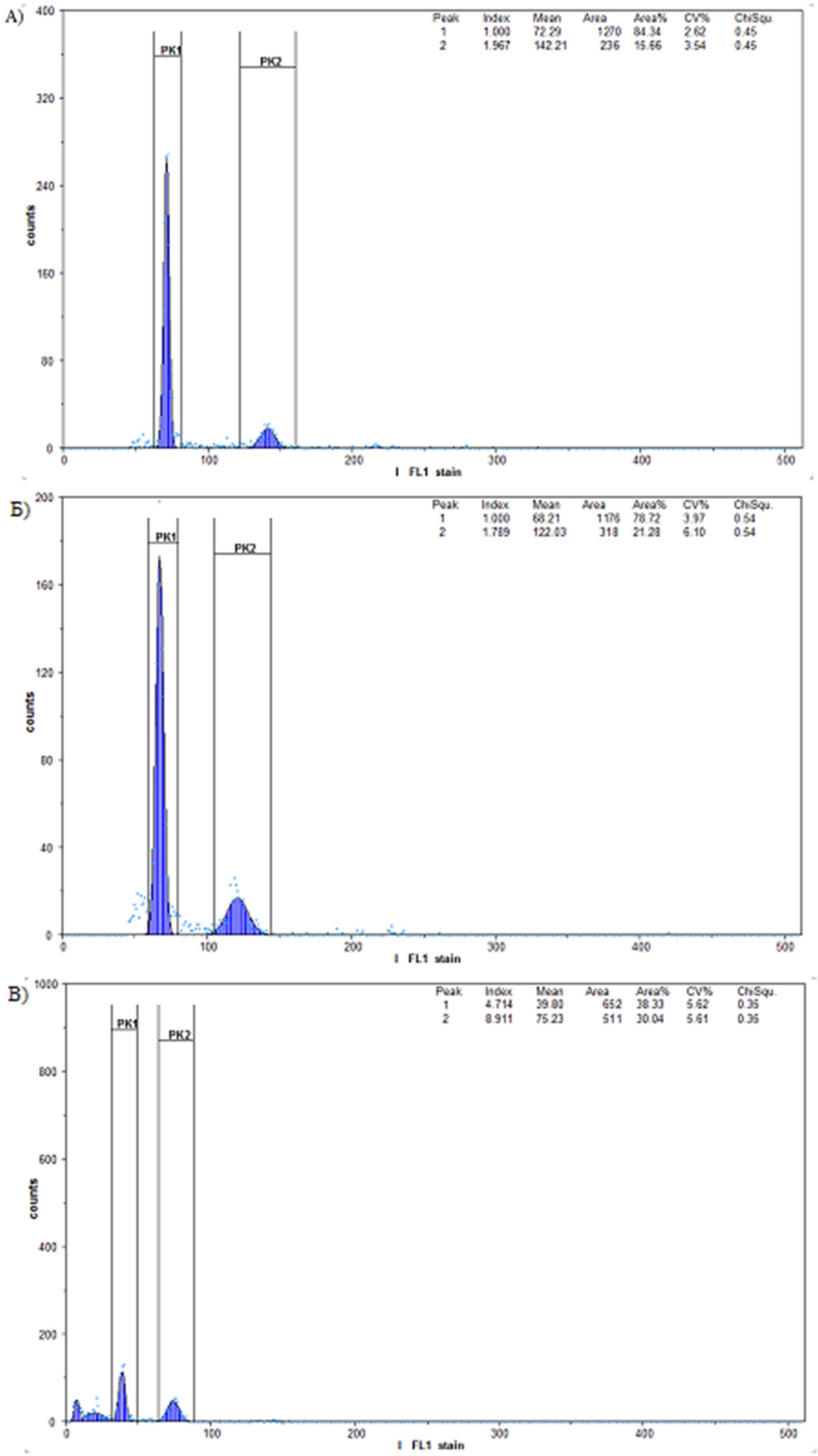




Прилог 6. Хистограми проточне цитометрије добијене из јединки врста: а) *G. odoratissima*; б) *N. ustulata*; в) *O. sphegodes*



Прилог 7. Хистограми проточне цитометрије добијене из јединки врста: а) *L. abortivum*; б) *O. mascula*; в) *P. bifolia*



Прилог 8. Анализа варијансе фаза клијања семена врсте *A. pyramidalis* мерених 8 недеља након постављања огледа

Извори варирања	Степени слободе	Набубрели ембрион без пробијања семеног омотача		Набубрели ембрион, пробијен семени омотач		Формирање протокорма		Формирање пупољчића и ризоида	
		MS	F	MS	F	MS	F	MS	F
Осветљење	1*	169,5836*	11,50649*	796,8242*	68,86767*	2128,507	105,7302	851,6159*	35,06396*
Хранљива подлога	10*	30,2742*	2,05414*	159,1064*	13,75119*	2958,581*	14,6963*	241,2230*	9,93198*
Интеракција Осветљење/хранљива подлога	10*	30,2742*	2,05414*	159,1064*	13,75119*	2958,581*	14,6963*	241,2230*	9,93198*
Грешка	88	14,7381		11,5704				24,2875	

*p<0,05

Прилог 9. Анализа варијансе фаза клијања семена врсте *A. pyramidalis* мерених 12 недеља након постављања огледа

Извори варирања	Степени слободе	Набубрели ембрион без пробијања семеног омотача		Набубрели ембрион, пробијен семени омотач		Формирање протокорма		Формирање пупољчића и ризоида	
		MS	F	MS	F	MS	F	MS	F
Осветљење	1*			9,851612	1,297460	2130,987*	85,85450*	4086,915	156,8364
Хранљива подлога	10*			7,367140	0,970254	314,110*	12,65504*	6409,977	245,985
Интеракција Осветљење/хранљива подлога	10*			7,367140	0,970254	314,110*	12,65504*	6409,977	245,985
Грешка	88			7,593001		24,827			

*p<0,05

Прилог 10. Анализа варијансе фаза клијања семена врсте *G. conopsea* мерених 8 недеља након постављања огледа

Извори варирања	Степени слободе	Набубрели ембрион без пробијања семеног омотача		Набубрели ембрион, пробијен семени омотач		Формирање протокорма		Формирање пупољчића и ризоида	
		MS	F	MS	F	MS	F	MS	F
Осветљење	1*	454,77*	7,9419*	488,2271*	21,65959*	5512,453*	386,1227*	0,145455	1,000000
Хранљива подлога	10*	249,56*	4,3581*	159,7406*	7,08669*	999,473*	70,0086*	0,145455	1,000000
Интеракција Осветљење/хранљива подлога	10*	192,59*	3,3633*	159,7406*	7,08669*	999,473*	70,0086*	0,145455	1,000000
Грешка	88	57,26		22,5409		14,276		0,145455	

*p<0,05

Прилог 11. Анализа варијансе фаза клијања семена врсте *G. conopsea* мерених 12 недеља након постављања огледа

Извори варирања	Степени слободе	Набубрели ембрион без пробијања семеног омотача		Набубрели ембрион, пробијен семени омотач		Формирање протокорма		Формирање пупољчића и ризоида	
		MS	F	MS	F	MS	F	MS	F
Осветљење	1	49,250	2,0352	1648,866*	92,20685*	8341,477*	173,0729*	664,0762*	18,35475*
Хранљива подлога	10*	212,334*	8,7742*	414,941*	23,20408*	695,305*	14,4265*	447,2873*	12,36281*
Интеракција Осветљење/хранљива подлога	10*	99,743*	4,1217*	414,941*	23,20408*	695,305*	14,4265*	447,2873*	12,36281*
Грешка	88	24,200		17,882		48,196		36,1801	

*p<0,05

Прилог 12. Анализа варијансе фаза клијања семена врсте *H. jankae* мерених 8 недеља након постављања огледа

Извори варирања	Степени слободе	Набубрели ембрион без пробијања семеног омотача		Набубрели ембрион, пробијен семени омотач		Формирање протокорма		Формирање пупољчића и ризоида	
		MS	F	MS	F	MS	F	MS	F
Осветљење	1*	4238,87*	43,4714*	23,12384*	11,04892*	2855,755*	133,2027*	82,44983*	64,45496*
Хранљива подлога	10*	3674,91*	36,9042*	6,67979*	3,19171*	488,604*	22,7901*	82,44983*	64,45496*
Интеракција Осветљење/хранљива подлога	10*	1513,15*	15,1354*	6,67979*	3,19171*	488,604*	22,7901*	82,44983*	64,45496*
Грешка	88	99,58		2,09286		21,439			

*p<0,05

Прилог 13. Анализа варијансе фаза клијања семена врсте *H. jankae* мерених 12 недеља након постављања огледа

Извори варирања	Степени слободе	Набубрели ембрион без пробијања семеног омотача		Набубрели ембрион, пробијен семени омотач		Формирање протокорма		Формирање пупољчића и ризоида	
		MS	F	MS	F	MS	F	MS	F
Осветљење	1*	4238,87*	43,4714*	23,12384*	11,04892*	2855,755*	133,2027*	82,44983*	64,45496*
Хранљива подлога	10*	3674,91*	36,9042*	6,67979*	3,19171*	488,604*	22,7901*	82,44983*	64,45496*
Интеракција Осветљење/хранљива подлога	10*	1513,15*	15,1354*	6,67979*	3,19171*	488,604*	22,7901*	82,44983*	64,45496*
Грешка	88	99,58		2,09286		21,439			

*p<0,05

Прилог 14. Анализа варијансе фаза клијања семена врсте *O. sphegodes* мерених 8 недеља након постављања огледа

Извори варирања	Степени слободе	Набубрели ембрион без пробијања семеног омотача		Набубрели ембрион, пробијен семени омотач		Формирање протокорма		Формирање пупољчића и ризоида	
		MS	F	MS	F	MS	F	MS	F
Осветљење	1*	1557,65*	82,813*	243,1517*	39,45199*	0,029173*	24,91856*	118,6947*	13,38751*
Хранљива подлога	5*	1497,47*	79,613*	36,8792*	5,98375*	0,006035*	5,15488*	43,1808*	4,87034*
Интеракција Осветљење/хранљива подлога	5*	537,95*	28,600	36,8792*	5,98375*	0,006035*	5,15488*	43,1808*	4,87034*
Грешка	48			6,1632		0,001171		8,8661	

*p<0,05

Прилог 15. Анализа варијансе фаза клијања семена врсте *O. sphegodes* мерених 12 недеља након постављања огледа

Извори варирања	Степени слободе	Набубрели ембрион без пробијања семеног омотача		Набубрели ембрион, пробијен семени омотач		Формирање протокорма		Формирање пупољчића и ризоида	
		MS	F	MS	F	MS	F	MS	F
Осветљење	1*	413,55	1,03137	399,8423*	56,76210*	0,039837*	65,41937*	2946,321*	341,2066*
Хранљива подлога	5*	3708,72*	9,24924*	81,9835*	11,63848*	0,017871*	29,34809*	1351,510*	156,5153*
Интеракција Осветљење/хранљива подлога	5*	505,96	1,26183	81,9835*	11,63848*	0,017871*	29,34809*	1351,510*	156,5153*
Грешка	48	400,98						8,635	

*p<0,05

Прилог 16. Анализа варијансе фаза клијања семена врсте *O. militaris* мерених 8 недеља након постављања огледа

Извори варирања	Степени слободе	Набубрели ембрион без пробијања семеног омотача		Набубрели ембрион, пробијен семени омотач		Формирање протокорма		Формирање пупољчића и ризоида	
		MS	F	MS	F	MS	F	MS	F
Осветљење	1	1,61	0,055	0,062719	0,996226	0,000008	1,549618		
Хранљива подлога	10*	612,00*	20,958*	0,062933	0,999635	0,000004	0,689950		
Интеракција Осветљење/хранљива подлога	10*	541,35*	18,538*	0,062933	0,999635	0,000004	0,689950		
Грешка	88	29,20		0,062956		0,000005			

*p<0,05

Прилог17. Анализа варијансе фаза клијања семена врсте *O. militaris* мерених 12 недеља након постављања огледа

Извори варирања	Степени слободе	Набубрели ембрион без пробијања семеног омотача		Набубрели ембрион, пробијен семени омотач		Формирање протокорма		Формирање пупољчића и ризоида	
		MS	F	MS	F	MS	F	MS	F
Осветљење	1	1,61	0,055	0,062719	0,996226	0,000008	1,549618		
Хранљива подлога	10*	612,00*	20,958*	0,062933	0,999635	0,000004	0,689950		
Интеракција Осветљење/хранљива подлога	10*	541,35*	18,538*	0,062933	0,999635	0,000004	0,689950		
Грешка	88	29,20		0,062956		0,000005			

*p<0,05

Прилог 18. Анализа варијансе фаза клијања семена врсте *S. spiralis* мерених 8 недеља након постављања огледа

Извори варирања	Степени слободе	Набубрели ембрион без пробијања семеног омотача		Набубрели ембрион, пробијен семени омотач		Формирање протокорма		Формирање пупољчића и ризоида	
		MS	F	MS	F	MS	F	MS	F
Осветљење	1*	656,09*	12,062*	141,1	2,638	47,811	3,7587	0,923476*	4,912045*
Хранљива подлога	10*	2686,92*	49,398*	3260,0*	60,935*	314,585*	24,7313*	0,923476*	4,912045*
Интеракција Осветљење/хранљива подлога	10*	404,75*	7,441*	3887,0*	72,656*	158,171*	12,4347*	0,923476*	4,912045*
Грешка	88	54,39		53,5		12,720		0,188002	

*p<0,05

Прилог 19. Анализа варијансе фаза клијања семена врсте *S. spiralis* мерених 12 недеља након постављања огледа

Извори варирања	Степени слободе	Набубрели ембрион без пробијања семеног омотача		Набубрели ембрион, пробијен семени омотач		Формирање протокорма		Формирање пупољчића и ризоида		Сејанац са једнимм листом		Издуживање првог листа	
		MS	F	MS	F	MS	F	MS	F	MS	F	MS	F
Осветљење	1*	646,012*	9,9194*	6223,67*	187,917*	752,07*	20,4353*	811,443*	40,8631*	4,642876*	4,084161*	0,581818	1,000000
Хранљива подлога	10*	531,701*	8,1642*	2626,30*	79,298*	506,00*	13,7490*	1239,062*	62,3973*	4,642876*	4,084161*	0,581818	1,000000
Интеракција Осветљење/ хранљива подлога	10*	412,456*	6,3332*	1577,32*	47,626*	266,25*	7,2345*	589,986*	29,7108*	4,642876*	4,084161*	0,581818	1,000000
Грешка	88	65,126		33,12		36,80		19,858		1,136800		0,581818	

*p<0,05

БИОГРАФИЈА

MSc Јована Дулић, мастер инжењер хортикултуре рођена је у Новом Саду, 26.7. 1987. Основну школу „Светозар Марковић Тоза“ завршила је у Новом Саду, а Средњу пољопривредну у Футогу. Основне студије на Пољопривредном факултету – смер Хортикултура, завршила је 2011. године, док је мастер студије завршила 2012. године. Докторске студије на смеру Агрономија уписала је сколске 2013/2014. године. Положила је све испите предвиђене планом и програмом са просечном оценом 9,88. Од 2014. године је запослена на Пољопривредном факултету као истраживач сарадник. До сада је била ангажована на једном технолошком пројекту Министарства за образовање и науку Републике Србије и два пројекта Покрајинског Секретаријата за високо образовање и научноистраживачку делатност. Као демонстратор је била ангажована на извођењу вежби из предмета: Оплемењивање хортикултурног биља и Култура биљног ткива. Као аутор и коаутор објавила је 43 научна рада, од којих се 11 налази на SCI (Science Citation Index) листи. Од 2016. године је члан Друштва „Hardy Orchid Society“ (HOS), док је од 2018. године члан Друштва генетичара Србије. Најзначајнији научни допринос дала је у области селекције подлоге за трешњу и вишњу, развијању *in vitro* протокола са наклијавањем недозрелих ембриона раних сорти трешње, вегетативном умножавању подлога за трешњу, вишњу и шљиву и асимбиотско наклијавање семена терестричних орхидеја. Као рецензент, оценила је више научних радова за часописе високе категорије.

Говори, чита и пише енглески језик.