

KOEKULTUURI MEETODITE UURIMINE LOODUSLIKE ORHIDEEDE SÄILITAMISEL

V. Vasar, A. Vaasa

Sissejuhatus

Inimtegevuse tagajärjel muutuvad meie orhideede looduslikud elupaigad järjest ebasoodsamaks. Võsastumine, metsaraie, kuivendustööd jmt võivad oluliselt muuta antud ala keskkonnatingimusi ja tuua kaasa haruldaste orhidee populatsioonide arvukuse vähenemise, halvimal juhul hävimise. *In vitro* tingimustes säilitatakse paljusid taimeliike, sealhulgas ka orhideed. Selle taimeperekonna esindajate seemneid külvati *in vitro* tingimustes toitesegule juba 1900. aastal (Pierik, 1987). L. Knudson (1922) avastas esimesena, et selliste perekondade nagu *Cattleya*, *Laelia* ja *Epidendrum* seemned on võimelised idanema asümbiootiliselt. Orhidee seemnete idanevuse sõltuvust seentest hakati tõsisemalt uurima 1970ndatel aastatel (Zettler-Lawrence, Jofer-Cara, 1998). Peale 1960. aastat arenes kiiresti orhideede meristeempaljundus, mis võimaldas orhideetaimi viirushaigustest tervendada. Perekonna *Cymbidium* juures muutus meristeempaljundus ainuvalitsevaks paljundusviisiks, olles üks esimesi taimeliike, mida hakati kommertseesmärgil laborites paljundama ja säilitama (Kishi, Takagi, 1997).

Praegu pööratakse järjest enam tähelepanu looduslike orhideede säilitamisele *in vitro* tingimustes, kuna maailmas on käivitunud ohustatud taimeliikide geenipankade loomine. Orhideede säilitamine *in vitro* tingimustes võib toimuda kas aeglustatud kasvu või madalate temperatuuride tingimustes. Kew botaanikaeda Suurbritannias on püütud koguda mõningaid Euroopas leiduvaid orhideesid (Fay, 1992).

Materjal ja meetodika

EPMÜ Teaduskeskusesse EVIKA toodi 1999. a 27. juunil Sakus, Harjumaal asuvast eraaiast looduskaitse alla võetud balti sõrmkäpa *Dactylorhiza baltica* (Klige) Orlova juuremugulad, et katsetada meristeempaljundust juuremugulal asuvatest pungadest. Katsetööd alustati 25 juuremugulaga. Suurema hulga juuremugulate üleskaevamine ei olnud võimalik haruldast populatsiooni ohustamata, kuna liik paljuneb looduslikes oludes aeglaselt.

Enne juuremugulate steriliseerimist pesti juuremugulad voolava vee all mullast puhtaks. Edasine tööprotsess toimus antiseptilistes tingimustes. Juuremugulad asetati 1 minutiks 75%-lisse etanooli lahusesse ja loputati 1 kord destilleeritud vees. Seejärel hoiti neid 25 minutit naatriumhüpokloriidi lahuses ja loputati 3 korda destilleeritud veega. Pärast steriliseerimisprotsessi opereeriti meristeemilõigud juuremugulal asuvatest pungadest binokulaarmikroskoobi all. Kokku eraldati 23 tipupunga meristeemi (pung, millest areneb järgmiseks aastaks uus taime maapealne osa) ja 5 külgpunga meristeemi (pung, millest areneb järgmiseks aastaks uus juuremugul ja maapealne taime osa). Meristeemilõigud asetati katseklaasi Murashige-Skoog'i (MS) (Murashige, Skoog, 1962) toitesegule, millele oli lisatud 0,5 mg/l naftüüläädikhapet (NAA) ja 2,0 mg/l 6-dimetüülallüülaminopüriini (2iP). Toitesegu happesus oli 5,4 (Nakay *et al.*, 1998). Opereeritud meristeemilõigud kasvasid fütotronis päevasel temperatuuril 20–23 °C ja öisel 18–20 °C, päeva pikkusega 16 tundi.

Opereeritud orhidee meristeemid kanti iga 7 päeva järel värsketele toitesegule. Kahe kuu möödudes kanti meristeemikultuurid katseklaasist 150 ml-stesse purkidesse, kus nende värsketele toitesegule kandmise intervall pikenes 14 päevani.

Tulemused ja arutelu

Opereeritud algkoe lõikudest saastus esimese kolme päeva jooksul 5 meristeemi. Sellist tulemust tuleb lugeda heaks, kuna algmaterjal pärines mikroobiderohkest keskkonnast.

On teada, et orhideede meristeemid alustavad intensiivset kasvu 15...20 päeva peale opereerimist (Agrawal *et al.*, 1992). Orhidee *in vitro* kultuuri kasvukiirus oleneb opereeritava koe asukohast taimel. Orhideede puhul võib seda teha ka noorte lehtede või lehetipu meristeemikoest. Alglõigud võib võtta noorte õisikute arenemisvõimelistest taimekudedest, mis on suutelised regeneerima uusi taimi (Pierik, 1987).

Meie katses arenesid Balti sõrmkäpa tipupunga meristeemidest kuu aja möödudes elujõulised 0,8 cm suurusel eristunud lehealgmete ja kallusega kultuurid. Külgpunga meristeemid ei hakanud katseklaasi tingimustes arenema. Võib arvata, et külgpungad ei olnud piisavalt diferentseerunud, mistõttu nende edasist morfoloogilist arengut ei toimunud.

27. novembriks 1999. a. oli lõigatud tipupunga meristeemidest järele jäänud 8 arenemisvõimelist regeneranti, mille paljundamist jagamise teel jätkatakse.

Kokkuvõte

Steriliseerimisprotsessi, mida kasutasime Balti sõrmkäpa *D. baltica* (Klige) Orlova juuremugulate ettevalmistamisel meristeemi opereerimiseks võib pidada efektiivseks, kuna saastus vaid väike hulk opereeritud meristeemidest. Vaid juuremugulate tipupungadest opereeritud meristeemkultuurid osutasid arenemisvõimelisteks. Külgpungad ei olnud piisavalt diferentseerunud, mistõttu nende edasine areng oli pärsitud. Täiustamist vajab toitesevõime komponendiline koostis, mis tagaks balti sõrmkäpa täielikult diferentseerunud organitega juurdumisvõimeliste regenerantide arenemise katseklaasi tingimustes. Tuleviku-uurimus fookuseerub enam orhideede *in vitro* pikaajalise säilitamise tingimustele.

Kirjandus

- Agrawal, C. D., Morwal, C. G., Mascarenhas, F. A. *In vitro* propagation and slow growth storage of shoots cultures of *Vanilla walkeriae* Wight – An endangered orchid. *Lindleyana* 7(2) 95–99, 1992.
- Fay, M. F. Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 28:1–4, 1992.
- Knudson, L. Non-symbiotic germination of orchid seed. *Bot. Gaz.* 73 1–25, 1922.
- Kishi, F., Takagi, K. Analysis of medium components used for orchid tissue culture. – *Lindleyana* 12(3) 158–161, 1997.
- Murashige, T., Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. – *Physiol. Plant.*, 15 473–497, 1962.
- Nayak, N. R., Chand, P. K., Rath, S. P., Patnaik, S. N. Influence of some plant growth regulators on the growth and organogenesis of *Cymbidium aloifolium* (L.) SW. seed-derived rhizomes *in vitro*. *In Vitro Cell Dev. and Biol. Plant.* 34 (3) 185–188, 1998.
- Pierik, M. L. R. *In Vitro* Culture of Higher Plants. p.149–168, 1987.
- Zettler-Lawrence, W., Jofer-Cara, J. Propagation of the little club-spur orchid (*Plantanthera clavellana*) by symbiotic seed germination and its ecological implications. – *Environmental and Experimental Botany* 39(3) 189–195, 1998.

The Investigation of Tissue Culture Methods on the Conservation of Terrestrial Orchids

V. Vasar, A. Vaasa

Summary

Some of Estonian native orchids are very rare and need to be protected in all habitats. Despite of strong protection still some species may become extinct. To anticipate such a situation it is necessary to establish meristematic cultures. Conservation of terrestrial orchids *in vitro* can be problematic. Most of the species need a fungus for symbiotic germination.

In the Plant Biotechnological Research Centre EVIKA of EAU we have started to investigate the *in vitro* conservation techniques of Estonian native orchids. Preliminary results have been obtained at the *in vitro* culture of *Dactylorhiza baltica* (Klige) Orlova.

The protocorm-like bodies of *Dactylorhiza baltica* were used as a plant material. The protocorm-like bodies were dipped in 75% alcohol and rinsed with distilled autoclaved water. This was followed by sterilization in sodium hypochlorite solution for 20 min. In total 28 meristems were excised from protocorm-like bodies and planted to modified Murashige-Skoog's medium supplemented with 0.5 mg/l NAA and 2.0 mg/l 2iP. After four weeks of culture, 60% of the excised apical meristems had started to grow while none of the explants originated from the lateral meristems expressed any tissue development. The latter ones were probably not fully differentiated and therefore incapable for morphological development.