

DAUGAVPILS UNIVERSITĀTE



Inta Belogradova

Promocijas darba kopsavilkums – publikāciju kopa

**RETO UN IZZŪDOŠO LATVIJAS SAVVAĻAS ORHIDEJU
BIOLOĢISKĀS ĪPATNĪBAS *IN SITU* UN *IN VITRO***

**Bioloģijas doktora zinātniskā grāda iegūšanai
Apakšnozare: Ekoloģija**

Promocijas darba zinātniskā vadītāja:
Dr.biol. **Gunta Jakobsons**
Zinātniskā konsultante ģenētiskos pētījumos:
Dr.biol. **Dace Grauda**

Daugavpils, 2012

Promocijas darbs (publikāciju kopa) tika izstrādāts V/a „Nacionālais Botāniskais dārzs” Augu valsts bioloģiskās daudzveidības *in vitro* saglabāšanas nodaļā laika posmā no 2008. līdz 2011. gadam. Ģenētiskie pētījumi tika veikti LU BI Augu Ģenētikas Laboratorijā 2010. un 2012. gadā.



NACIONĀLAIS BOTĀNISKAIS DĀRZS



Latvijas Universitātes Bioloģijas institūts



IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ



Šis darbs izstrādāts ar Eiropas Sociālā fonda atbalstu projektā
«Atbalsts Daugavpils Universitātes doktora studiju īstenošanai»
Vienošanās Nr. 2009/0140/1DP/1.1.2.1.2/09/IPIA/VIAA/015

Darbs veikts ar daļēju Eiropas Sociālā fonda atbalstu.

Doktora studiju programma: Bioloģija, apakšnozare Ekoloģija

Promocijas darba zinātniskā vadītāja:

Dr.biol. **Gunta Jakobsone**, Nacionālais botāniskais dārzs

Zinātniskā konsultante ģenētiskos pētījumos:

Dr.biol. **Dace Grauda**, LU Bioloģijas institūts

Recenzenti:

Dr.biol. **Sigita Jurkoniene**, Institute of Botany, Laboratory of Plant Physiology, Nature Research Centre, Vilnius, Lithuania; sigita.jurkoniene@botanika.lt

Dr.biol., asoc.prof. **Inese Kokina**, Daugavpils Universitātes Zinātņu prorektore
inese.kokina@du.lv

Dr. biol. **Jevgenija Nečajeva**, Latvijas Universitāte, Augu fizioloģijas katedra
Sb20025@lu.lv

Promocijas darba aizstāvēšana notiks Daugavpils Universitātes Bioloģijas zinātnes nozares Promocijas padomes atklātajā sēdē 2012.gada 5.decembrī, Daugavpilī Vienības ielā 13, 311.auditorijā pl. 12.00.

Ar promocijas darbu un tā kopsavilkumu var iepazīties Daugavpils Universitātes bibliotēkā, Saules ielā 1/3, Daugavpilī un elektroniski:

http://du.lv/zinatne/promocija/aizstavesanai_iesniegtie_promocijas_darbi

Promocijas padomes priekšsēdētājs Dr.biol., prof. **Arvīds Barševskis**

Atsauksmes sūtīt promocijas padomes sekretārei Mg. Biol. Janai Paiderei Daugavpilī, Vienības ielā 13, LV-5401, tālrunis 26002593, e-pasts: jana.paidere@du.lv

Inta Belogradova, 2012

ISBN 978-9984-49-694-8

SATURS

DARBĀ LIELOTO TERMINU SKAIDROJUMS.....	4
IEVADS.....	4
1. LITERATŪRAS APSKATS.....	11
2. MATERIĀLI UN METODEDES.....	17
2.1. Materiāli.....	17
2.2. Pētījuma metodes.....	18
2.2.1. Pētījumi <i>in situ</i> [I; II; V; VI].....	18
2.2.2. Pētījumi <i>in vitro</i> [I; II; III; IV; V].....	18
2.2.3. Aklimatizācija <i>ex vitro</i> [V].....	20
2.2.4. Mikorizas pētījumi [III;V].....	20
2.2.5. <i>Liparis loeselii</i> ģenētiskās daudzveidības noteikšana [VII; VIII].....	21
3. GALVENIE REZULĀTI UN DISKUSIJA.....	23
3.1. Pētījumi <i>in situ</i> [I;II;V;VI].....	23
3.2. Pētījumi <i>in vitro</i>	24
3.3. Reģenerantu aklimatizēšana <i>ex vitro</i> [V].....	32
3.4. Mikorizas veidošanās aklimatizētiem <i>Dactylorhiza baltica</i> augiem [III;V].....	36
3.5. <i>Liparis loeselii</i> populāciju ģenētiskā daudzveidība dažādos Latvijas biotopos [VII; VIII].....	37
SECINĀJUMI.....	41
PATEICĪBAS.....	41
IZMANTOTĀS LITERATŪRAS SARAKSTS.....	81

Iesaistītās organizācijas

Vides aizsardzības un reģionālās attīstības ministrijas v/a “Nacionālais botāniskais dārzs”–

NBD

Latvijas Universitātes Bioloģijas institūts–LU BI

Promocijas darba izstrādes vieta un laiks

Promocijas darbs tika izstrādāts NBD Augu valsts bioloģiskās daudzveidības *in vitro* saglabāšanas nodaļā laika posmā no 2008. līdz 2011. gadam.

Ģenētiskie pētījumi tika veikti LU BI Augu Ģenētikas Laboratorijā 2010. un 2012. gadā.

DNS kvalitātes noteikšana veikta Daugavpils Universitātes SBI Biotehnoloģiju laboratorijā 2010. gadā. Mikorizas izpēte veikta 2008. gadā sadarbībā ar Latvijas Universitātes Augu fizioloģijas katedru.

Darbā lietotie saīsinājumi:

NBD–Nacionālais botāniskais dārzs	IRAP–mikrosatelīts (<i>Inter</i> –
DU–Daugavpils Universitāte	<i>retrotransposon amplifid polymorphism</i>)
LU BI–Latvijas Universitātes Bioloģijas institūts	LTR–garie terminālie atkārtojumi
ABS–abscizskābe	MT–metatopolīns
ACE–4,5 % aktīvo hloru saturošs sadzīves dezinfekcijas līdzeklis	N–slāpekļis
AFLPs–praimeris (<i>Amplified fragment lenght polymorphism</i>)	NES– α -naftiletiķskābe
AO–aktīvās ogles pulveris	OT–Orhideju taka Engurē
BAP–6-benzilaminopurīns	P–fosfors
C–ogleklis	PVP–40- polivinilpirolidons
Ca–kalcijs	PCR–Polimerāzes ķēdes reakcija
CTAB–heksadeciltrimetilamonijbromīds	RAPD–mikrosatelīts (<i>Random amplified polymorphic DNA</i>)
DNS–dezoksiribonukleīnskābe	RE–rauga ekstrakts
IES– β -indoliletiķskābe	RNS–ribonukleīnskābe
	TTH–2, 3, 5, trifeniltetrazolija hlorīds

IEVADS

Pētījuma aktualitāte

Viena no apdraudētākajām augu dzimtām ne tikai Latvijā, bet arī citās pasaules valstīs, ir orhideju dzimta (Orchidaceae). Šobrīd Latvijā no 32 orhideju sugām aizsardzībai ieteiktas 26 sugas un iekļautas Latvijas Sarkanā grāmatā (Andrušaitis 2003), kā arī 25 sugas tiek aizsargātas ar Latvijas nacionālās likumdošanas normatīviem aktiem. Eiropas valstīs orhideju sugu aizsardzību nosaka ES Direktīva 92/43/EEC par dabisko dzīvotņu savvaļas faunas un floras aizsardzību. Apdraudētības kategoriju piešķiršana un likumdošanas normatīvo aktu prasības ir tikai daļa no sugu aizsardzības preventīviem pasākumiem, taču tie vēl neatrisina jautājumu par reālu šo sugu aizsardzību. Tātad līdztekus aizsargājamo teritoriju statusa noteikšanai aizsargājamo sugu dabiskajās augtenēs, resp., *in situ*, ir nepieciešams tās aizsargāt arī ārpus to augšanas vietām slēgtās teritorijās *ex situ* – stādījumos botāniskajos dārzos un arī laboratorijas apstākļos *in vitro*, veidojot taksonu banku. Īpaši apdraudētām un izzūdošām sugām saglabāšana *ex situ* metodes bieži vien ir

vienīgā iespēja, kas var nodrošināt to eksistenci ārpus dabīgām augtenēm, tādējādi veicinot bioloģiskās daudzveidības saglabāšanu. *Ex situ* saglabāšanas metodikas izstrāde kopumā palīdzēs izveidot taksonu banku ne tikai valsts mērogā, bet arī dos iespēju šajā jomā sadarboties ar Baltijas valstu speciālistiem, kā arī attīstīt sadarbību pasaules mērogā. Saskaņā ar Starptautisko botānisko dārzu programmu augu aizsardzībā (BGCI 2000), botāniskie dārzi piedalās bioloģiskās daudzveidības nacionālo stratēģiju plānošanā, pēta un nodrošina augu sugu saglabāšanu *ex situ*.

Ja subtropu un tropu orhideju sugas ir salīdzinoši viegli kultivējamas *in vitro* (Augu valsts bioloģiskās daudzveidības *in vitro* saglabāšanas nodaļas, v/a “Nacionālais botāniskais dārzs” dati, 1980-to gadu beigas, 1990-to gadu sākums), tad mērenā klimatā augsnē augošajām orhideju sugām katrai nepieciešami specifiski kultivēšanas apstākļi *in vitro*. Latvijas savvaļas orhideju sugu ievadīšana *in vitro* kultūrā ir saistīta ar asimbiotiskās dīgšanas nodrošināšanu (orhideju sēklas dabā dīgst simbiotisko mikroorganismu klātbūtnē), kas papildus sarežģī sēklu uzdīgšanas procesu. Tātad *in vitro* ir jānodrošina viss apstākļu kopums, ko dabā veic simbionti. Mikorizas klātbūtne ir obligāts nosacījums visos orhideju attīstības posmos (Rasmussen 1995; Weston et al. 2000 u.c.), kas savukārt rada šo sugu bioloģiskās izpētes nepieciešamību, īpaši *in vitro* metodoloģisko jautājumu risināšanā. Turklāt ļoti sīkajām orhideju sēklām nav endospermas un dīglis sastāv no nedaudzām šūnām. Tas nozīmē, ka sēklai ir minimāla mitruma uzsūcošā virsma, kas būtiski var ietekmēt sēklu dīgšanu (Rasmussen 1995). Morfoģenēzes pētījumi sākotnējās attīstības stadijās dabiskos apstākļos ir grūti veicami, tādēļ *in vitro* metodes dod iespēju izsekot šim attīstības posmam, sākot no sēklu uzdīgšanas līdz pirmā virszemes dzinuma attīstībai, kas atkarībā no sugas ilgst vairākus gadus. Orhideju sugu vispusīga bioloģiskā izpēte Latvijā nav veikta. Pirmo reizi Latvijā savvaļas orhideju pētījumus *in vitro* uzsāka LZP projekta ietvaros 2006. gadā Nacionālā botāniskā dārza Augu valsts bioloģiskās daudzveidības *in vitro* saglabāšanas nodaļā.

Izpratnei par sugas dzīvotspēju, īpaši nozīmīga ir sugu iekšējā ģenētiskā struktūra, kas ir viens no piemērotības mehānismiem dzīvei mainīgā apkārtējā vidē. Šādus *Liparis loeselii* pētījumi veikti vairākās valstīs: Vācijā, Anglijā, ZR-Francijā, Polijā, Kanādā, ASV, u.c. (Lande 1988; Vos et al. 1995; Hedrick, Kalinowski 2000; Pillon et al. 2007, Rolfsmeier 1993, u.c.). Latvijas *L. loeselii* populācija šai aspektā Latvijā nav pētīta. Tādēļ zināšanas par sugas ģenētisko daudzveidību un tās struktūru ir nepieciešams priekšnoteikums tālākas sugas saglabāšanas stratēģijas izstrādei (Lande 1988).

Pētījuma novitāte

- Promocijas darbā veikti detalizēti savvaļas orhideju bioloģiskie pētījumi, noteikts, ka katrai orhideju sugai ir savas ļoti specifiskas prasības augšanas un attīstības

nodrošināšanai sterilos apstākļos. *In vitro* kultūrās NBD tiek uzturētas sešas orhideju sugas dažādās attīstības stadijās.

- Lai novērtētu iniciālo barotņu komponentu ietekmi iniciālajās barotnēs un lai novērtētu Latvijas savvaļas orhideju sugu dīgtspēju, aprobēta tetrazolija testa metode embriju dzīvotspējas noteikšanai.
- Ar *in vitro* pētījumos iegūtajiem reģenerantiem uzsākta orhideju aklimatizācija, ierīkojot eksperimentālos stādījumus NBD teritorijā. Aklimatizācijas sekmīga norise saistīta ne tikai ar vides apstākļiem, bet arī ar kolonizāciju ar simbiotiem.
- Pirmo reizi Latvijā veikti *Liparis loeselii* populācijas ģenētiskie pētījumi, izmantojot IRAP metodi (Kalendar et al. 2010), noteikta ģenētiskā daudzveidība un to ģenētiskās distances astoņās dažādās augtenēs augošiem *L. loeselii* augiem.

Galvenās aizstāvēšanai izvirzītās tēzes

1. Nepieciešamais ķīmisko vielu kvalitatīvais un kvantitatīvais saturs augšanas un attīstības nodrošināšanai *in vitro* atšķiras gan katrai orhideju sugai, gan arī vienas sugas robežās atkarībā no augšanas un attīstības fāzes.
2. Iniciālajai barotnei orhideju sēklu ievadīšanai *in vitro* jāsaturs ķīmiskie savienojumi, kurus dabā nodrošina simbiotiskās sēnes.
3. *In vitro* iegūto augu sekmīga aklimatizācija ir atkarīga no kultivēšanas barotnes un ekspozīcijas pazeminātā temperatūrā pirms izstādīšanas substrātā *ex vitro*.
4. Latvijas *Liparis loeselii* populācija ir ģenētiski daudzveidīga un IRAP metode ir piemērota *L. loeselii* ģenētiskās daudzveidības izpētei.
5. Vispusīga orhideju bioloģijas izpēte rada iespēju veidot taksonu banku *ex situ*, t.i. - *in vitro* un botānisko dārzu ekspozīcijās, kas kalpo kā būtisks papildus garants sugu daudzveidības saglabāšanai.

Pētījuma mērķis

Latvijas reto un apdraudēto orhideju sugu bioloģiskā izpēte, lai sekmētu šo sugu aizsardzību un bioloģiskās daudzveidības saglabāšanu, izmantojot *in vitro* metodes.

Pētījuma galvenie uzdevumi:

1. Apsekot orhideju populācijas *in situ*.
2. Ievākt orhideju sēklas no dažādām populācijām un veikt embriju dzīvotspējas testu pirms ievadīšanas *in vitro*.
3. Izstrādāt *in vitro* metodes, kas nodrošina orhideju uzdīgšanu, augšanu un veģetatīvo attīstību, lai veiktu orhideju sugu bioloģiskās daudzveidības saglabāšanas pasākumus ārpus to dabīgās vides.
4. Uzsākt aklimatizācijas izmēģinājumus, lai nodrošinātu *in vitro* iegūto augu stādījumu veidošanu NBD un noteikt sakņu kolonizēšanos ar simbiotiskajām sēnēm.

5. Izstrādāt metodi *Liparis loeselii* kvalitatīvas un nefragmentētas DNS iegūšanai un piemērot, uz PCR balstīto IRAP metodi *L.loeselii* sugas ģenētiskās daudzveidības noteikšanai.

Pētījuma specifika

Starptautiskā programma par augu aizsardzību botāniskajos dārzos (BGCI, 2000) tika izstrādāta, balstoties uz Riodežaneiro Konvenciju par bioloģisko daudzveidību (CBD). Latvija pieņēmusi Riodežaneiro Konvenciju par pamatu ilgtermiņa stratēģijai bioloģiskās daudzveidības saglabāšanā. 2010. gadā Nagojā (Japānā) tika pieņemta jauna, atjaunota stratēģija bioloģiskās daudzveidības saglabāšanā botāniskajos dārzos. Latvija ir viena no 180 valstīm, kas iekļauta šajā procesā. Ilgtermiņa plāns paredz, ka līdz 2020. gadam vismaz 75% apdraudēto sugu tiks saglabātas *ex situ* kolekcijās.

Savvaļas floras aizsardzību Latvijā reglamentē nacionālā normatīvo aktu sistēma. Sugu aizsardzības statusu Latvijas normatīvajos aktos nosaka sugu retums un apdraudētība gan nacionālā, gan Eiropas Savienības (ES) mērogā. Latvijas nacionālajos normatīvos aktos iestrādātas un tādējādi saistošas ir ES direktīvu un regulu prasības. ES mērogā savvaļas faunas un floras aizsardzību regulē ES Direktīva 92/43/EEC par dabisko dzīvotņu savvaļas faunas un floras aizsardzību. Direktīvas prasības iestrādātas Latvijas nacionālajā likumdošanā.

Darbam ar aizsargājamām augu sugām ir saistoši šādi normatīvie akti:

1. 16.03.2000. „Sugu un biotopu aizsardzības likums”;
2. 14.04.2005. „Zinātniskās darbības likums”;
3. 28.04.2011. likums „Par īpaši aizsargājamām dabas teritorijām”;
4. MK 2000. gada 14. novembra noteikumi Nr. 396 „Noteikumi par īpaši aizsargājamo sugu un ierobežoti izmantojamo īpaši aizsargājamo sugu sarakstu”;
5. MK 2000. gada 5.decembrī noteikumi Nr. 421 „Īpaši aizsargājamo biotopu veidu saraksts”;
6. MK 2010. gada 16. marta noteikumi Nr. 264 „Īpaši aizsargājamo dabas teritoriju vispārējie aizsardzības un izmantošanas noteikumi”;
7. Īpaši aizsargājamo teritoriju individuālie aizsardzības un izmantošanas noteikumi (saistoši konkrētās īpaši aizsargājamās dabas teritorijās, kurām šādi noteikumi ir pieņemti);
8. MK 2001. gada 30.janvāra noteikumi Nr. 45 „mikroliegumu izveidošanas aizsardzības un apsaimniekošanas noteikumi”;
9. MK 2010. gada 21. decembra noteikumi Nr. 1165 "Kārtība, kādā izsniedz atļaujas nemedījamo sugu indivīdu iegūšanai, ievieš Latvijas dabai neraksturīgas savvaļas sugas (introdukcija) un atjauno sugu populāciju dabā (reintrodukcija)";
10. MK 2009. gada 15. septembra noteikumi Nr. 1055 "Noteikumi par to Eiropas

Kopienā nozīmīgu dzīvnieku un augu sugu sarakstu, kurām nepieciešama aizsardzība, un to dzīvnieku un augu sugu indivīdu sarakstu, kuru ieguvei savvaļā var piemērot ierobežotas izmantošanas nosacījumus”;

Saistošas ir arī starptautiskās nozīmes noslēgtās saistības:

11. 31.08.1995. likums "Par 1992. gada 5. jūnija Riodežaneiro Konvenciju par bioloģisko daudzveidību”;

12. 05.04.1995. likums „Par 1971. gada 2. februāra Konvenciju par starptautiskas nozīmes mitrājiem, īpaši kā ūdensputnu dzīves vidi”.

Bioloģiskās daudzveidības aizsardzības mērķus un stratēģiju valstī nosaka dokumenti, kas nav saistoši, bet tiem ir ieteikuma raksturs:

- Bioloģiskās daudzveidības nacionālā programma. Vides aizsardzības un reģionālās attīstības ministrija, 2000;
- Vides politikas pamatnostādnes 2009.–2015.gadam (apstiprināta ar 2009. gada 31. jūlija Vides ministra rīkojumu Nr. 517).

Pētījumā izmantotas sugai vai tās biotopam nekaitīgas pētījuma metodes, ievērojot Latvijas nacionālās likumdošanas prasības. Fizioloģiskiem eksperimentiem, kuriem nepieciešams liels augu skaits, tika izmantoti tikai NBD *in vitro* iegūtie *Dactylorhiza baltica* augi.

Pētījuma rezultātu aprobācija

Promocijas darbā iegūtie pētnieciskie rezultāti ir atspoguļoti 7 zinātniskās publikācijās, 1 manuskriptā, 13 starptautisko zinātnisko konferenču tēzēs un par pētījumiem sniegti 13 ziņojumi starptautiskās zinātniskās konferencēs.

Ziņojumi starptautiskajās konferencēs un publicētās zinātniskās konferences tēzes:

Prezentējošais autors ir pasvītrots

1. Congress of EastCentGard II, Warsaw/Rogow, Poland, 2007. Stenda referāts „The conservation possibilities of endangered orchid species of Latvia and Lithuania” (Jakobsone G., Dapkūnienē S., Cepurīte B., Belogradova I.). Book of Abstracts, 44–45.
2. 2nd World Scientific Congress: Challenges in Botanical Research and Climate Change. The Netherland, Delft, 2008. Stenda referāts “Conservation of *Liparis loeselii* (L.) Rich. in protected areas of Latvia and National Botanic Garden” (Jakobsone G., Gavrilova Ģ., Belogradova I., Aleksejeva L.). Book of Abstracts, 79.
3. 22nd expedition of the Baltic Botanists, Daugavpils, Latvia, 2008. Stenda referāts “*Dactylorhiza fuchsii* as model object in *in vitro* culture study for development of terrestrial orchids” (Jakobsone G., Belogradova I., Megre D.). Abstracts and Excursion Guide, 21.

4. Daugavpils Universitātes 51. Starptautiskā zinātniskā konference, Daugavpils, Latvija, 2009. Referāts „Latvijas savvaļas orhideju sugu bioloģiskās izpētes nepieciešamība *in vitro*” (Belogradova I., Jakobson G.). Zinātniskās konferences tēžu krājums, 36.
5. 5th International Conference "Research and conservation of biological diversity in Baltic Region". Daugavpils, Latvija, 2009. Stenda referāts “Methodological solution of problems in investigation of Latvia's wild orchid species *in vitro*” (Belogradova I., Jakobson G., Megre D.). Book of Abstracts, 22.
6. Daugavpils Universitātes 52. Starptautiskā zinātniskā konference, Daugavpils, Latvija, 2010. Referāts „Latvijas reto un izzūdošo orhideju sugu saglabāšanas perspektīvu izpēte: *in vitro* kultūras iegūšana no sēklām, kultivēšana un aklimatizācija *ex vitro*” (Belogradova I., Jakobson G.). Zinātniskās konferences tēžu krājums, (DU, CD formātā), 52.
7. FESPB XVIII, Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology, Valencia, Spain, 2010. Stenda referāts „Protection of rare wild orchid species in Latvia *ex situ*” (Belogradova I., Jakobson G., Roze D., Megre D.). Book of Abstracts, 97.
8. XXIII Conference – Expedition of the Baltic Botanists, Haapsalu, Estonia, 2010. Stenda referāts „*Dactylorhiza baltica in vitro and in vivo*” (Jakobson G., Belogradova I., Roze D., Megre D.). Abstracts & Excursion guides, 23.
9. Daugavpils Universitātes 53. Starptautiskā zinātniskā konference, Daugavpils, Latvija, 2011. Referāts „Usability of retrotransposon-based molecular markers to assess genetic diversity *Liparis loeselii*” (Belogradova I., Grauda D., Jakobson G., Rashal I.). Zinātniskās konferences tēžu krājums, 16.
10. 6th International Conference “Research and conservation of Biological diversity in Baltic region”, Daugavpils, Latvija, 2011. Stenda referāts “The different habitat types with *Liparis loeselii* populations in Latvia” (Roze D., Jakobson G., Strode L., Belogradova I., Višņevska L., Kreile V.). Book of Abstracts, 110.
11. International Conference for Academic Disciplines, University of Malta, Gozo Campus, Malta, 2011. Stenda referāts “Some aspects of the ecology of *Ophrys insectifera*” (Roze D., Belogradova I., Jakobson G., Megre D.). Abstracts in CD-R.
12. 6th Planta Europa Conference “Actions for Wild Plants”, Krakow, Poland, 2011. Stenda referāts “The possible ecological reasons of the threat for *Liparis loeselii* populations in Latvia” (Roze D., Jakobson G., Belogradova I., Megre D., Kreile V.). Book of Abstracts, 62.

13. 5th Baltic Congress of Genetics, Kaunas, Vytautas Magnus University, Lithuania, 2012. Stenda referāts "Genetic diversity of *Liparis loeselii* from different habitats of Latvia" (Belogradova I., Grauda D., Lapina L., Jakobsons G., Roze D., Rashal I.). Book of Abstracts, 25.

Zinātniskās publikācijas

Promocijas darbs – publikāciju kopa, kas balstīta uz 5 publicētajiem un 3 publicēšanai iesniegtajiem zinātniskajiem rakstiem, no tiem 7 starptautiski recenzējamos žurnālos un 1 sagatavota publikācija [VIII] iesniegšanai Lietuvā, V Baltijas Ģenētikas kongresa ietvaros 2012.gada oktobrī, publicēšanai starptautiski indeksētā zinātniskā žurnālā.

1. Jakobsons G., Dapkūnienē S., Cepurīte B., **Belogradova I.** 2007. The conservation possibilities of endangered orchid species of Latvia and Lithuania. *Monographs of Botanical Gardens* (European botanic gardens together towards the implementation of plant conservation strategies), Warsaw/Rogow, Poland, 1: 65–68. [I]
2. **Belogradova I.**, Jakobsons G. 2010. Latvijas savvaļas orhideju sugu bioloģiskās izpētes nepieciešamība *in vitro*. *Proceedings of the 51st international scientific conference of Daugavpils University*, 1, Daugavpils: DU akadēmiskais apgāds "Saule", 90–94. [IV]
3. Jakobsons G., **Belogradova I.**, Megre D. 2010. *Dactylorhiza fuchsii* as model object in *in vitro* culture study for initial development of terrestrial orchids. *Acta Biologica Universitatis Daugavpiliensis*. Suppl. 2: 41–48. [III]
4. Roze D., **Belogradova I.**, Jakobsons G., Megre D. 2011. Some aspects of the ecology of *Ophrys insectifera*. *International Journal of Arts and Sciences*, USA, CD-R. ISSN: 1944-6934: 4(19): 107–120. [VI]
5. **Belogradova I.**, Grauda D., Jakobsons G., Rashal I. 2012. Usability of retrotransposon-based molecular markers to assess genetic diversity *Liparis loeselii*. *Acta Biologica Universitatis Daugavpiliensis*, Daugavpils, 12(1): 40–43. [VII]

Iesniegti un publicēšanai pieņemti zinātniskie raksti:

1. Jakobsons G., Gavrilova Ģ., **Belogradova I.**, Megre D., Aleksejeva L. "Conservation of *Liparis loeselii* (L.) Rich. in protected areas of Latvia and National Botanic Garden". (2008.g. iesniegts rakstu krājumam 2nd World Scientific Congress: Challenges in Botanical Research and Climate Change, The Netherlands, Delft). [II.]
2. Jakobsons G., **Belogradova I.**, Roze D., Megre D. „*Dactylorhiza baltica in vitro* and *in vivo*”, raksts 2010. gada decembrī iesniegts publicēšanai *Acta Biologica Universitatis Daugavpiliensis*. (DU Apstiprinājums : 23.08.2012) [V]

3. **Belogradova I.**, Grauda D., Lapina L., Jakobsone G., Roze D., Rashal I. „Genetic diversity of Latvian *Liparis loeselii* population”. (*Manuskripts*, iesniegšanai publicēt starptautiski indeksētā žurnālā Lietuvā, V Baltijas ģenētikas kongresa ietvaros 2012. gada novembrī [VIII])

1. LITERATŪRAS APSKATS

Orhideju dzimtas raksturojums

Pasaulē Orchidaceae (Juss) dzimta ir viena no lielākajām ar vairāk nekā 30000 sugu (Buttler 2007). Latvijā sastopamās 32 orhideju sugas, kas aug dažādās augtēs: purvos, mitrās pļavās, mežos, arī grāvmalās, atsevišķas sugas – kāpu smiltīs (Andrušaitis 2003).

Ziedi ir divdzimumu, pieziedlapu žāklēs, ziedkopās – vārpā, ķekarā, retāk pa vienam. Apziednis ir vienkāršs, vainaglapveidīgs, zigomorfs un sēklotne ar daudziem sēklaizmetņiem. Putekšņi brīvi, irdeni (*Cypripedium*) vai tetrādēs; tetrādes salīp polīnijos (*pollinium*). Polīnijs kopā ar kājiņu (*caudicula*) un lipķermeni (*viscidium*, *retinaculum*) veido polināriju. Auglis ir pogaļa, kurā ir ap 3 līdz 4 miljoni sēklu. Lapas vienkāršas, pamīšus, veselas, bez pielapēm, ar vai bez makstīm. Latvijā augošās orhidejas ir daudzgadīgi autotrofi lakstaugi ar sakneņiem vai gumiem (Cepurīte 2005). Orhidejām raksturīgi pazemes barības vielu uzkrājošie orgāni: sakneņi, gumi, neīstie sīpoli (*pseudobulb*), kas ir vasas pārveidnes. Pateicoties pazemes uzkrājējorgāniem, augi pārziemo. Jaunās saknes daļai sugu veidojas pavasarī: *Liparis loeselii* sakņu attīstība notiek sākot no maija līdz septembrim (Masuhara et al. 1988). Savukārt *Ophrys* ģints orhidejām jaunās saknes sāk atīstīties rudenī līdz ar lapu rozetes veidošanos, kas varētu būt saistīts ar gaismas indukcijas procesiem (Möller 1967). Orhidejām raksturīgs ilgs attīstības cikls (Cepurīte 2005). *Cypripedium calceolus*, piemēram, līdz ziedēšanai pāiet 6–10 gadi, un augs ir spējīgs dzīvot daudzus gadus pateicoties sakneņiem (Kober 1972; Fast 1974; Kull 2002). Orhidejas var vairoties kā veģetatīvi, tā ģeneratīvi. Veģetatīvi vairojas tikai tās sugas, kam ir rizomas jeb sakneņi (Buttler 2007). Gumi gada ciklā nomainās – pakāpeniski iet bojā vecais(-ie) un veidojas jaunais(-ie). Piemēram, *Dactylorhiza fuchsii* abi vecie gumi pamazām samazinās, sākot no oktobra līdz nākošā gada jūnijam, bet jaunie sāk veidoties aprīļa vidū un maksimālos izmērus sasniedz septembrī (Janečková, Kindlmann 2002). Orhidejām iespējama kā svešappute, tā pašappute (Catling 1980). Ļoti svarīga ir putekšņu kvalitāte, jo pašappute noved pie sēklu kvalitātes samazināšanās. Ja orhideju sugai ziedēšanas laikā nav tās areālā atbilstošu kukaiņu-apputeksnētāju sugas īpatņu vai arī šī suga pamazām pārvietojusies, ieņemot attālu teritoriju, kur konkrētā kukaiņa suga nemājo, notiek pašappute. Novērojumi ar *Ophrys apifera* liecina, ka šī suga ir fakultatīvi autogāma: ja apputeksnēšanās ar kukaiņiem nav notikusi vai tā ir bijusi nesekmīga, polīniju kātiņš noliecas uz leju, un polīnijs tiek tiešā veidā uzlikts uz tā paša zieda drīksnas (Buttler 2002).

Orhideju apputeksnēšanās pētījumi aptver veselu zinātnes jomu, kas kopumā raksturīga tieši orhideju dzimtai un ir specifiska katrai konkrētai sugai atsevišķi (*O. insectifera*, *C. calceolus* u.c.), kas detalizēti aprakstīts publikācijās (Van der Pijl, Dodson 1966; Van der Pijl 1979; Arditti 1992; Faegri, Buttler 2002, u.c.). Piemēram, *O. insectifera* zieds imitē dzimumnobriedušu racējlapseņu *Argogorytes mystaceus* vai *A. fargei* māfīti un izdala feromonus, kā rezultātā racējlapseņu tēviņš veic pseidokopulāciju un apputeksnē *O. insectifera* (Faegri, Van der Pijl 1979). Orhideju sēklas ir ļoti sīkas, putekļveida, bez endospermas. Literatūrā uzrādīti sēklu izmēri: platums 0,07 līdz 0,40 mm, garums 0,11 līdz 1,97 mm, atkarībā no sugas. Embrijam ir salīdzinoši ļoti nedaudzas šūnas, piemēram, *Epipogium aphyllum* – ir tikai 8 šūnas, t. i., kad embrijs ir attīstījies pēc 3 mitotiskajām dalīšanās, *Dactylorhiza majalis* – 200 šūnas (Rasmussen 1995). Sēklas embrijam ir globulārā attīstības stadija – tas ir olveida un tam ir nedaudz izteikta polarizācija. Sēklu uzdīgšanai nepieciešama simbiotisko sēņu klātbūtne. Tiek norādīts, ka sēklas dabā izsējas un zemē nonāk arī ar vēju un lietus pilieniem. Embrija šūnas var saturēt proteīna un lipīdu ieslēgumus, cietes graudiņus, kas tiem dod iespēju izdzīvot neilgu laiku pirms kolonizēšanās ar simbiontiem. Sēklu šūnās var būt nelieli cukuru daudzumi – saharoze, mannoze, u. c. (Rasmussen 1995). Ūdensnecaurlaidīgais sēklapvalks ļauj sēklām ilgāku laiku atrasties augsnē intaktā stāvoklī. Sēklapvalkus pēc to struktūras iedala trīs veidos: 1) kas pēc sēklu nobriešanas spējīgi uzsūkt ūdeni; 2) ūdensnecaurlaidīgi sēklapvalki ar lipīdu slāni; 3) ūdensnecaurlaidīgi sēklapvalki ar “bruņām” (angļu val. – *carapace*), kas satur kutīnu, dažādus polisaharīdus un suberīnu. To orhideju sugu, kuru sēklapvalks ir ar “bruņām”, uzdīgšanu panākt ir nopietna problēma, kā, piemēram, orhidejām no *Epipactis*, *Cephalanthera* un *Ophrys* ģintīm (Rasmussen 1995). Sēklās embrijs intensīvi piesaista ūdeni, jo ir ļoti hidrofils (Terkikh et al. 2005). Vienlaicīgi ūdens uzņemšanu ietekmē ne tikai pašas sēklas īpašības, bet arī ārējie apstākļi – temperatūra, ūdenī izšķīdušās vielas un pH (Leopold 1983).

Uzskata, ka orhideju sēklu dīgspēju ietekmē sarežģīts bremsēšanas mehānisms, kas pamatojas uz diviem galvenajiem pamatprincipiem: 1) fizioloģiskais (uzkrājas inhibitori) un 2) strukturālais – atkarīgs no sēklapvalka uzbūves īpatnībām. Sēklu dīgšanas īpatnības var būtiski ietekmēt sugas izplatību un tās ir cieši saistītas ar auga dzīves ciklu. Sēklā ir attīstīti vides faktoru uztveres mehānismi un sēklu pielāgošanās spēja konkrētam klimatam un biotopa īpatnībām, kas nodrošina sēklu uzdīgšanu piemērotā brīdī (Nečajeva 2012). Sakarā ar to sēklapvalka struktūras detalizēta izpēte ir īpaši aktuāla. Šo dīgšanas barjeru pārvarēšanai iesaka sēklu ilgstošu mērcēšanu ūdenī (Kano 1968) vai pazeminātās temperatūras stratifikāciju, vai abus šos procesus kopā (Cherevchenko et al. 2008). Svarīgi atzīmēt, ka pastāv atšķirības dīgšanas apstākļu prasībās starp dažādām sēklām vienai un tai pašai sugai (Rasmussen 1995).

Simbioze

Pastāv uzskats (Rasmussen 1995), ka holarktiskās sugas normāli dīgst pavasarī ar izņēmumiem *Dactylorhiza*, *Orchis* un vēl pāris ģintis. Jāatzīmē, ka rudenī augsnes virskārtā veidojas ievērojams trūdvielu slānis, kurā jau ziemas sākumā notiek ievērojama mikorizas sēņu aktivitāte, kas kopumā rada svarīgus priekšnoteikumus, lai mikotrofiskais dīgsts sāktu savu attīstību (Rasmussen 1995). Pavasara dīgšana netieši norāda, ka sēklas ir izgājušas miera periodu vai pēc-nogatavošanās procesus, kas tām neļauj uzdīgt vasarā vai rudenī un ļauj saglabāties augsnē ilgu laiku (Литвинов 1967). Augi no mikorizas sēnēm dīgšanas un protokormu stadijā saņem N, P un C, kā arī ūdeni. Pieaugušie augi turpretī apgādā sēnes ar C, jo paši uzsāk fotosintēzi (Dearnaley 2007; Gebauer, Meyer 2003; Trudell et al. 2003). Sēne var būt arī kā starpnieks starp orhideju un kokaugiem, saņemot no koka viņiem vajadzīgās vielas. Tai jābūt piemērotai koku sugai kā saimniekaugam (McKendrick et al. 2000; Dearnaley 2007; Kottke, Chacón 2009).

Asimbiotiskā diedzēšana sterilajās kultūrās

Sēklām ir jāpāriet no proteīna uzglabāšanas fāzes uz proteīna mobilizēšanu jeb dīgšanu (Rasmussen 1995). Ir nepieciešams noskaidrot faktorus, kas kavē un kas veicina sēklu dīgšanu sterilos apstākļos. Pētnieki uzskata, ka tas, cik dienas sēklas pirms izešanas jātur pazeminātā temperatūrā, lai tās varētu dīgt, ir atkarīgs no dažādiem to nobriešanas apstākļiem dažādos gados. Pazemināta temperatūra acīmredzot aktivē metaboliskās sistēmas, kas ir atbildīgas par organogēni dīglī. Uzskata, ka pazemināta temperatūra samazina brīvās abszcizskābes (ABS) daudzumu un palielina endogēno citokinīnu daudzumu embrija šūnās. Ja sēklām eksogēni pievieno ABS, tad dīgšana inhibējas pilnībā. Domājams, ka dabā sēklu dīgšanu kavē ABS, kas atrodas sēklapvalkā. Aukstums, sals un atkušņi ziemas laikā un periodi, kas ziemā atbilst mērcēšanai laboratorijas apstākļos, izskalo inhibitorus un iniciē nepieciešamās fizioloģiskās izmaiņas embrijos. Ja dīgsti tiek apgaismoti, papildus ir vajadzīgi vitamīni kā pantotēnskābe, tiamīns un piridoksīns (Rasmussen 1995). Šķidrā barotne var veicināt sēklapvalka uzbriešanu un barības vielu uzsūkšanos. Lai sēklapvalks uzsūktu ūdeni, vēlams to skarificēt, to apstrādājot ar etanolu vai ēteri – ar kādu lipofīlu šķīdumu. Turklāt mērcēšana nodrošina inhibējošo vielu izskalošanos no sēklapvalka. *Epipactis helleborine* sēklās ir konstatēts piecas reizes augstāks ABS endogēnais līmenis nekā *Dactylorhiza maculata*, kura dīgst salīdzinoši labi: ja to sēklas sterilizējot mērcē divas stundas, tad tajās vairs nekonstatēja ABS klātbūtni (Van Waes 1984, citēts pēc Rasmussen 1995). Taču šķidrās barotnes pielietošana orhideju sēklu diedzēšanai ierobežo fakts, ka kultivējamo trauku nedrīkst kustināt, jo sešas nedēļas nedrīkst mehāniski traucēt sēklas, pretējā gadījumā dīgšana inhibējas (Rasmussen 1995). Ir minēti pozitīvi dīgšanas rezultāti, ja sēklas tiek pārklātas ar agara barotni (Weinert 1990) vai arī ja kultivējamuos traukus aizvāko hermētiski (Nakamura 1962; Kano 1968; McIntyre et al. 1974), kā rezultātā traukos

uzkrājas etilēns. Ir ziņas, ka etilēnu izdala dažu augu sugu dīgstošās sēklas, kas var būt autostimulējošs efekts uz dīgšanu (Taylorson, Hendriks 1977).

Dīgšanas procesam ļoti svarīgs ir N avots. Dažu orhideju sugu dīgšanai nav obligāti nepieciešams neorganiskais slāpekļis, bet citām tas pat aizkavē dīgšanu. Lielai daļai Eiropas savvaļas orhideju sugu Van Waes un Debergh (1986) novērojuši, ka dīgšanas procents bijis lielāks, ja barotnē nebija pievienoti makroelementi, un autori konstatējuši dažas sugas, kuras neorganiskā slāpekļa klātbūtnē nedīga vispār. Piemēram, *Orchis morio* dīgšanas procents pazeminājās līdz ar neorganiskā slāpekļa koncentrācijas pieaugumu (Dijk 1988). Savukārt stimulēt asimbiotisko dīgšanu varēja ar eksogēni pievadītiem organisko N savienojumiem (Vejsadova 2006), pie tam tas bija piemērotāks, ja koncentrācija bija augstāka. Kā piemērotāko iesaka rauga ekstraktu, kas satur lielu aminoskābju daudzumu. Specifiskiem organiskiem savienojumiem, kurus parasti izmanto orhideju barotnēs, kā, piemēram, rauga ekstraktam un peptonam, nav pilnībā noteiktas visas sastāvdaļas (Dijk 1988). Šie savienojumi ir bagāti ar aminoskābēm, bet satur nenoteiktu daudzumu organiskā N, un to kvalitatīvais un kvantitatīvais sastāvs šī produkta ražošanas partijām ir atšķirīgs. Organisko piedevu noteikšana barotnēs ir komplicēta un atkarīga no vairākiem faktoriem, jo termiskā apstrāde (autoklāvēšana) var izmainīt to sastāvu. Piemēram, glutamīna pievienošana pirms autoklāvēšanas daļēji samazina N daudzumu, jo aminoskābes neiztur temperatūru, kas augstāka par 100 °C un degradējas (George et al. 1988). Tomēr dažādas N saturošas organiskās piedevas orhideju barotnēm tiek lietotas, jo literatūras avotos ir minēts, ka neorganiskā N ietekme uz dīgšanas procesu galvenos vilcienos ir negatīva, bet organiskā N – pozitīva vai neitrāla. Eksperimentāli ir noteikts, ka iniciālo barotņu receptūrā samazinot kādu no barības vielu daudzumiem, piemēram, nepievienojot rauga ekstraktu, *Liparis lilifolia* dīgšanas procents bija ievērojami zemāks (Rasmussen 1995). Tas nozīmē, ka dažas aminoskābes, kas atrodas rauga ekstrakta sastāvā, ir ļoti būtiskas orhideju dīgšanai un dīgsts tās nesintezē. Eksogēnā amonija augstais līmenis stimulē glutamātdehidrogenāzes aktivitāti dzīvās šūnās, kas savukārt veicina proteīna pieaugumu. N reducētās formas stimulē nitrātreduktāzes aktivitāti un tā pārveido absorbētos nitrātus augam izmantojamā veidā (Gamborg 1970). Diedzēšanas efektivitāte ir atkarīga arī no tā, kādas sēklām ir iekšējās rezerves un īpašības (Dutra et al. 2009). Barotņu receptūras orhidejām balstās uz minerālo sāļu devas samazināšanu un organisko vielu palielināšanu. Tomēr tieši kuras sastāvdaļas ir tās, kas asimbiotiskās kultūrās aizvieto mikorizu, vēl nav noteikts. Pie tam eksistē atšķirības katrai sēklu populācijai un pat katras sēklas prasībās pret ķīmiskām vielām (Rasmussen 1995). Dabā orhideju pirmais attīstības posms (2–4–10 gadi) notiek augsnē, tātad apstākļos, kuros nav iespējama fotosintēze un līdz ar to oglekļa uzņemšana. Šajā posmā, tāpat kā tas tiek lietots *in vitro* apstākļos, oglekli augi uzņem ar cukuriem. Literatūrā tiek minēti divi iespējamie cukura avoti dīgšanas ierosinošajā fāzē: 1) kas ir endogēni pašā embrijā un 2) ko

veicina un saņem no simbiontiem (Rasmussen 1995). Agrīnā orhideju sēklu attīstības stadijā heksozes ir galvenie cukuri, kas uzkrājas embrijā (Bradford, Nonogaki 2007).

Nepietiekami ir izpētīta Ca^{2+} ietekme uz orhideju dīgšanu. Par Ca^{2+} ir īpaša interese, jo daudzas Eiropas orhidejas ir kalcifilas un aug ar kalciju bagātā substrātā. Kalcija jonam ir ietekme uz šūnas membrānas īpašībām un tas mijiedarbojas ar dažādiem augšanas regulatoriem, it īpaši ar citokinīniem (George et al. 1988). Tomēr ir maz informācijas par sēklu reakciju uz kalcija joniem. Modificējot orhideju barotnes, ir tendence samazināt $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ daudzumu no $1000\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ līdz mazāk par $100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Ir receptūras, kur neorganisko Ca^{2+} nepievieno vispār. Andersons (1990) pievieno nelielu daudzumu kalciju ar kalcija pantotenātu Lucke (1971) pamatbarotnē. Hipotētiski varētu secināt, ka asimbiotiskai dīdīšanai lieto zemākas kalcija koncentrācijas, lai palielinātu šūnapvalka caurlaidību, lai veicinātu to dīgšanu, jo dabā to nodrošina simbionti. Atsevišķi autori (Thompson, Edwards 2006) raksta par zemu dīdīšanas procentu *Disa* ģints orhidejām, skaidrojot to ar obligāto miera periodu, kas balstās uz sēklapvalka īpatnībām, kas neļauj barotnes piedevām būt saskarsmē ar embriju. Pastāv uzskats, ka kultivēšanas metode, kura paredzēta vienai orhideju sugai, var nebūt piemērota tai pašai orhideju sugai no cita reģiona (Arditti 1982).

Kopumā varētu teikt, ka ir daudz pretrunīgas informācijas par dīdīšanas apstākļiem *in vitro* kultūrās, tomēr maz ir publicētu datu par Eiropas savvaļas orhideju sugu dīgstu tālāku kultivēšanu *in vitro*.

Kultivēšanas apstākļu nodrošināšana

Orhideju kultivēšanai bieži izmanto organiskās piedevas, kā peptonu, kokosriekstu pienu, kartupeļu novārījumu, ananāsu sulu, svaigu alus raugu utt. Tā kā šīm pārtikas vielām ir atšķirīgs ķīmiskais sastāvs, to pielietošana nevar dot pilnvērtīgu priekšstatu par atsevišķo ķīmisko savienojumu un jonu ietekmi uz kultivēšanas procesu. Gadījumos, kad mēs nespējam precīzi noteikt pievienojamo vielu un tās nepieciešamo devu, kompleksie organiskie savienojumi var dot iespēju nodrošināt orhideju dzīvotspēju un attīstību *in vitro*. Ļoti dažāda sastāva barotnes orhideju dīdīšanai publicētas H. Rasmussen monogrāfijā (1995), bet to modificēšana un piemērošana orhideju kultivēšanai ir šī eksperimentālā pētījuma pamatā. Sēklu dīdīšanas stadijā šķidrām barotnēm straujāk mainās pH nekā agarizētām, kā rezultātā rodas nekrozes un audi aiziet bojā (Cherevchenko et al. 2008). Eksperimentos ar *Pterostylis sanguinea* konstatēts, ka jasmīnskābe stimulēja uzkrājējorgānu augšanu. Tas nebija novērots ar *Habenaria bractescens*; bet ar šo sugu stimulējošo efektu panāca pielietojot BAP (Medina et al. 2009). Eksperimentos ar *Dactylorhiza* ģints sugām, lai inducētu gumu diferenciāciju, lietoja BAP kombināciju ar NES (Medina et al. 2009). Audzēšana *in vitro* dod iespēju izsekot katrai orhideju attīstības fāzei (Jakobsone 2009) un kontrolēt ārējās vides apstākļus: barības vielu sastāvu, temperatūras režīmu, gaismas intensitāti un gaismas – tumsas režīma ilgumu (Cherevchenko et al. 2008).

Aklimatizācija *ex vitro* apstākļiem

Maz ir literatūras datu par *in vitro* iegūto savvaļas orhideju sugu aklimatizāciju apstākļiem *ex vitro*. Pētījumos par *Cephalanthera falcata* aklimatizāciju *ex vitro* (Yamato, Iwase 2008) *in vitro* iegūtos augus pēc izstādīšanas substrātā inkubēja 4°C temperatūrā 6 mēnešus, kā pirmējo substrātu izmantoja vermikulītu. Pēc šīs inkubācijas augus izstādīja dabiskā augtenē. Pēc viena gada 44,4%-iem augu attīstījās vasa un daži eksemplāri ziedēja. Pēc pieciem gadiem konstatēja zemu izdzīvošanas procentu – tikai 3%. Autori to skaidro galvenokārt ar simbiozes veidošanās problēmām (Smith et al. 1997).

Ģenētiskie pētījumi

Liparis loeselii apputeksnēšanās veidam pievērsušies daudzi pētnieki un vairums uzskata, ka tās ir pašapputes (Van der Pilj, Dodson 1966; Rolfsmeier 2007), tomēr pastāv arī atšķirīgi viedokļi, ka *L. loeselii* raksturīga gan svešappute, gan pašappute (Catling 1980). Pašapputes augu populācijas veidojas no tīro līniju kopuma, un noteiktos apstākļos var veidoties situācija, kad populācija ir ģenētiski vienveidīga, kas savukārt samazina tās spēju pielāgoties. Mainoties augšanas apstākļiem, tas var arī novest pie populācijas bojāejas, tādēļ to populācijas ģenētiskās daudzveidības saglabāšana ir īpaši svarīga sugas izdzīvošanas stratēģijai, sevišķi, ja mainās klimatiskie apstākļi (Rolfsmeier 2007). Vairāki jaunākie pētījumi *L. loeselii* sugas bioloģijā, ekoloģijā un ģenētikā veikti tieši Eiropā. Ģenētiskā daudzveidība un dažādu orhideju sugu struktūra Ziemeļrietumu Francijā un Apvienotajā Karalistē tika pētītas, izmantojot genomu fragmentu garuma polimorfismu (AFLPs). Šo pētījumu rezultāti parādīja, ka pat ģeogrāfiski attālas populācijas varētu būt līdzīgas (Vos et al. 1995; Travis et al. 1996; Juan et al. 2004). Orhideju dažādu sugu ģenētiskās daudzveidības izpētei izmanto tādas plaši pazīstamas kodola DNS analīzes metodes kā mikrosatelītus SSR, RAPD, AFLPs, kā arī plazmīdu DNS, mitohondriju un hloroplastu DNS analīzi, parasti izmantojot mikrosatelītu marķierus. Orhideju analīzei tiek izmantota arī atsevišķu DNS gēnu reģionu sekvencēšana, bet to izmantošanu ierobežo augstās izmaksas. Tomēr visas šīs metodes ir sugu specifiskas. Lai nākotnē pielāgotu metodi ģenētiskās daudzveidības izpētei arī citām orhideju sugām, ļoti nozīmīgi šai darbā bija izmantot jaunāko, uz universāliem praimeriem balstīto metodi (Kalendar et al. 2010). Izstrādātā IRAP metode, kura ir plaši pielietojama organismu evolūcijas un ģenētiskās daudzveidības pētījumiem, un ir vienkārši ieviešama, šajā pētījumā tā tika izmantota *L. loeselii* ģenētiskās daudzveidības populācijas izpētei Latvijā. Izmantotie marķieri ir universāli, un, veicot praimeru atlasī, iespējams atrast praimerus ar augstu polimorfismu konkrētās sugas ģenētiskai analīzei (Feschotte et al. 2002; Schulman et al. 2004; Kalendar, Schulman 2006; Kalendar et al. 2010). Universālie retrotranspozonu marķieri atšķiras no cita veida marķieriem, jo retrotranspozoni parasti ir izkaisīti genomā, tādēļ tas ir labs pamats retrotranspozonu izmantošanai arī sugu ģenētiskās daudzveidības noteikšanā (Schulman 2007). Retrotranspozonu klase atkarībā no tā, vai

mobila gēnētiskais elements abos savas sekvenču galos satur vienādus garos terminālos atkātojumus (LTR–*angļu val.*–Long Terminal Repeat), tiek iedalīti divās apakšklasēs: LTR saturoši retrotranspozoni un LTR nesaturoši retrotranspozoni (Kubis et al. 1998; Benetzen 2000; Turcotte et al. 2001; Queen et al. 2004; Sangeeta 2010; Ragupathy et al. 2010). LTR saturošie retrotranspozoni kodē pašpavairošanai un integrācijai DNS struktūrai nepieciešamos fermentus. Šāds replikācijas mehānisms ir līdzīgs retrovīrusiem ar to atšķirību, ka retrotranspozoni neveido infektozas struktūras, kas atstājot šūnu inficē citas šūnas (Havecker et al. 2004). Retrotranspozoni pa genomu pārvietojas, izmantojot RNS starpproduktus, kas ar reversās transkriptāzes palīdzību pirms integrācijas genomā tiek transkribēti par DNS (Turcotte et al. 2001; Miller 2004). Ar šādu retrotranspozonu replikācijas veidu tiek papildināts DNS materiāls, ievērojami palielinot genomu. Orhidejām raksturīgs ļoti augsts fenolu saturs gan lapās, gan ziedos, kas apgrūtina augstas kvalitātes DNS iegūšanu. DNS izdalīšanai no augiem ar augstu metabolītu saturu tiek ieteiktas dažādas metodes (Zimmer, Roalson 2005; Frier 2005; Pillon et al. 2007; u.c.), tomēr par piemērotāko tiek atzīta E. Frier 2005. gadā publicētā metode DNS izolācijai [VIII].

2. MATERIĀLI UN METODES

2.1. Materiāli

Materiālam izvēlētas retās un apdraudētās orhideju sugas no *Dactylorhiza*, *Liparis*, *Ophrys* un *Cypripedium* ģintīm. Zinātniskā pētījuma ietvaros laika periodā no 2007.–2011. gadam tika veiktas ekspedīcijas dažādos Latvijas reģionos un apsektas septiņpadsmit savvaļas orhideju atradnes pie Būšnieku ezera, Ovīšiem, Engures ezera austrumu piekrastē pie Lepstes, Orhideju takā Engures dabas liegumā (divas atradnes), Pēterezera vigā Slīteres rezervātā, Jaunciema purvā Ances purvu un mežu liegumā, Silabebru ezerā pie Ļaudonas, Svētes ezera (Dreimaņu) pussalā Krustkalnu rezervātā, „Šalku” grants karjerā pie Ainažiem, dabas liegumā Ķemeru nacionālā parka teritorijā, t. sk. trijās atrdnēs pie Kaņiera ezera, Papes ezera liegumā pie Brušvītiem, Tosmāres ezera austrumu krastā un Baltezera purvā pie Brocēniem. Kopumā pētījumā izmantoti astoņi orhideju taksoni: Baltijas dzegužpirkstīte (*Dactylorhiza baltica* (Klinge) N.I.Orlova); Fuksa dzegužpirkstīte (*Dactylorhiza fuchsii* (Druce) Soó); Rusova dzegužpirkstīte (*Dactylorhiza russowii* (Klinge) Holub); stāvlapu dzegužpirkstīte (*Dactylorhiza incarnata* subsp. *incarnata* (L.) Soó); iedzeltenā stāvlapu dzegužpirkstīte (*Dactylorhiza ochroleuca* (Wüstnei ex Boll) Holub), ko vieni botāniķi raksturo kā atsevišķu sugu, bet citi kā *D. incarnata* subsp. *ochroleuca* (Wüstnei ex Boll) P.F. Hunt et Summerh.; Lēzela lipare (*Liparis loeselii* (L.) Rich); mušu ofrīda (*Ophrys insectifera* L.); dzeltenā dzegužkurpīte (*Cypripedium calceolus* L.).

Kā modeļsuga fizioloģijas eksperimentos *in vitro* tika izvēlēta *D. baltica*, jo jau no 2007. gadā iesētajām *D. baltica* sēklām tika iegūti *in vitro* augi pietiekamā daudzumā, lai varētu veikt eksperimentu sērijas. Salīdzinoši ar citām sugām šī suga Baltijas reģionā

sastopama biežāk; vairumā gadījumu tā aug kā atsevišķi eksemplāri vai nelielā skaitā, retāk konstatētas ļoti bagātas atradnes (Kuusk et al. 2003). Latvija ir bagātākais šīs sugas izplatības reģions Eiropas mērenā joslā (Tutin et al. 1980).

2.2. Pētījuma metodes

2.2.1. Pētījumi *in situ* [I; II; V; VI]

Engures ezera austrumu daļā pie Lepstes iezīmēti laukumi (atradnes dabiskajās robežās) lauka pētījumiem divām retajām orhideju sugām – *O. insectifera* 28m² (57° 17.190N, 23° 09.032E) un *L. loeselii* 19m² (57° 17.175N, 023° 08.991E), kuros 2008.–2011. gados veikta ziedu, pogaļu uzskaitē un augu morfoloģisko pazīmju fiksēšana, novēroti konkrētie augi un izlases veidā ievākts sēklu materiāls ievadīšanai *in vitro*. Līdztekus savvaļas orhideju atradnēs augošajiem augiem dabas teritorijās, sēklas pētījumiem izmantotas no *ex situ* esošiem augiem NBD lauka stādījumos.

2.2.2. Pētījumi *in vitro*

Embriju dzīvotspējas tests [IV]

Ekspedīciju laikā tika novērotas izteiktas atšķirības sēklu nogatavošanās laikos starp populācijām dažādos Latvijas reģionos. Lai varētu noteikt sēklu vitalitāti, tika aprobēts tests ar 1% trifeniltetrazolija hlorīdu (TTH) (Dixon et al. 2003) un ar to noteica embriju dzīvotspēju astoņām sugām. Ekspozīcijas laiks ar TTH + Tween 20 24h 30°C temperatūrā, tumsā, kā rezultātā TTH dzīvotspējīgos embrijus iekrāso sarkanbrūnā krāsā.

Dažādos literatūras avotos norādīts, ka šī testa veikšanai izmantoti atšķirīgi sēklu sterilizēšanas līdzekļi: nātrija hipohlorīds (NaOCl) vai kalcija hipohlorīds (Ca (OCl)₂) (Van Waes, Debergh 1986). Embriju dzīvotspējas noteikšanai šajā testā tika izmantota šīs metodes modifikācija: metodē minētais sēklu pirmapstrādes šķīdums tika aizstāts ar Cl⁻ saturošu sadzīves dezinfekcijas līdzekli ACE koncentrētā veidā un atšķaidījumā ar destilētu ūdeni 1:2. Ekspozīcijas laiks– 7, 10, 15, 20 un 25 minūtes. Eksperimentālā ceļā tika precizēts optimālākais sēklu apstrādes laiks un šķīduma koncentrācija dažādām orhideju sugām, lai maksimāli saglabātu sēklu dīgtspēju. Pēc sterilizācijas sēklas filtrpapīra diskos skalotas 3 reizes sterilizētā destilētā ūdenī pa 5 minūtēm, bet ceturtā skalošanas reizē atstātas mērcēties līdz divām stundām. Iegūtie paraugi rezultātu novērtēšanai tika apskatīti mikroskopā, saskaitīti dzīvotspējīgie embriji, kas iekrāsoti sarkanbrūnā krāsā, un aprēķināts embriju dzīvotspējas procents attiecībā pret kopējo sēklu daudzumu izvēlētajā redzeslauka sektorā. Darbā izmantots mikroskops Carl Zeiss – SteREO Discovery V8, kas aprīkots ar digitālo kameru AxioCam Mrc5 attēlu iegūšanai, dzīvotspējīgo embriju skaitīšanai izmantota lupa MBC1.

Sēklu sterilizēšana un ievadīšana *in vitro* [I; II; III; IV]

Sēšanai sterilajās kultūrās izmantotas daļēji nobriedušas sēklas dažādās gatavības stadijās (sēklas baltas, nav atdalījušās no placentas; sēklas baltas, birstošas; sēklas

krēmkrāsas līdz viegli brūnām) un arī pilnībā nobriedušas sēklas. Nobriedušās sēklas sterilizēja ar Cl⁻ saturošu sadzīves dezinfekcijas līdzekli ACE koncentrētā veidā vai atšķaidītu ar destilētu, sterilizētu ūdeni (1:2); sterilizācijas laiks 7–25 minūtes. Nepieciešamo sterilizācijas režīmu katras sugas sēklām noteica eksperimentāli. Iniciālo un kultivēšanas barotņu eksperimentiem izmantotas pamatbarotnes: Fast (1974); Norstog un Van Waes (citēts pēc Rasmussen 1995) un to modifikācijas (NBD laboratorijas dati), kas pielāgotas atšķirīgām orhideju sugām. Sēšanu veica gan uz filtrpapīra tiltiņa mēģenēs ar šķidro barotni, gan uz agarizētas barotnes ar samazinātu agara saturu – 0,3%. Šķidro barotni laika gaitā papildināja ar atsevišķi sagatavotu barotni, bet otrajā variantā uz agarizētās virsmas pilināja atšķaidītu barotni mitruma nodrošināšanai. Ja sēklas bija daļēji nobriedušas un pogaļā nebija mikroplaisu, pogaļu sterilizēja, iemērcot 96% etanolā un aizdedzinot, jo pogaļas iekšpuse ir sterila. Pilnībā nogatavojušās sēklas sterilizēja salocītos filtrpapīra diskos, skaloja 4–5 reizes sterilā destilētā ūdenī (pēdējā skalojamā ūdenī atstājot uz 2h). Atvērtus sterilos filtrpapīra diskus novietoja kultivējamās traukos uz agarizētas barotnes virsmas, periodiski sterilos apstākļos pievienojot šķīdumu ar dažādām organiskām vielām, lai veicinātu dīgšanu.

Kultivēšana *in vitro* [II; III; V]

Kultivējamās traukus ar uzsētām sēklām novietoja tumsā 23–25 °C. Kad sēklas uzdīga un protokormi sasniedza aptuveni 1–2 mm diametru, tos pārstādīja uz kultivēšanas barotnēm un atkal novietoja tumsas režīmā. Ik nedēļu tika pārskatīti uzsējumi *in vitro*, lai konstatētu uzdīgušos eksemplārus, regulāri pārlietot audziņus uz jaunām barotnēm atbilstoši to attīstības fāzei, kā arī nepieciešamības gadījumā (barotnei laika gaitā izžūstot) papildinātu barības vielas ar šķidro barotni. Kad dīgstiem izveidojās saknes, kultivējamās traukus pārvietoja gaismas kamerā ar dienas gaismas spuldzēm gaismas – tumsas režīmā (16h gaisma/8h tumsa). Laika gaitā izlases veidā vizuāli lielākos un spēcīgākos augus ievietoja tumsas režīmā aukstuma kamerā 5°C; maksimālais ekspozīcijas laiks līdz 5 mēnešiem.

Lai konstatētu barotņu piedevu ietekmi uz auga attīstību, veikta eksperimentu sērija, kā pamatbarotnes izmantojot Fast (1974) (A varianti) un Van Waes (citēts pēc Rasmussen 1995) (B varianti) receptūras, kopā 20 variantos, kā modeļobjektu izvēloties *D. baltica*:

- RE – 0; 0,5; 1; 1,5 un 2 g.L⁻¹ (A-1) vai kopā ar BAP, 0,2 mg.L⁻¹, kas pievienots katram variantam ar RE (A-2).
- BAP – 0; 0,1; 0,2 un 0,3 mg.L⁻¹ (B-1) vai kopā ar IES, 0,05 mg.L⁻¹ (B-2) katrā variantā ar BAP.
- MT – 0,1; 0,2 un 0,3 mg.L⁻¹ (B-3).

Eksperiments ilga 1,5 mēnešus. Rezultātus izvērtēja pēc šādiem parametriem: sakņu skaits, kopējais sakņu garums, jauna dzinuma iniciācija, barotnes nokrāsošanās pakāpe (no 1 līdz 5 ballēm), auga nekrotizēšanās pakāpe (procentuāli no auga), kopējā auga vitalitāte (no 1 līdz 5 ballēm). Dati analizēti izmantojot SPSS 17 programmu. Tā kā mūsu eksperimenta

dati neatbilst standarta SPSS 17 programmas sadalījumam, tika izmantotas neparametriskas metodes. Vispirms ar Kruskal-Wallis testu tika salīdzinātas visas paraugkopas, no kurām atlasītas tās paraugkopas, kuras uzrādīja būtisku atšķirību pēc konkrētiem parametriem. Šīs atlasītās paraugkopas tālāk tika salīdzinātas ar Manna-Vitnija U-testu. Gala rezultātā tika veikts Pīrsona korelācijas izvērtējums, lai pārbaudītu, kā paraugkopas atšķiras pēc konkrētā parametra – korelē pozitīvi vai negatīvi [V].

Lai novērstu augu nekrozes, ko nevarēja novērst pievienojot barotnei AO, mēs sākām izstrādāt arī citas metodes, lai atrisinātu šo problēmu. Pirmie eksperimenti tika veikti ar paaugstinātām Ca^{2+} devām kultivēšanas barotnēs *D. baltica*, izmantojot kalcija glukonāta monohidrātu ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{CaO}_{14} \times \text{H}_2\text{O}$) [V].

2.2.3. Aklimatizācija *ex vitro* [V]

2007. gadā *in vitro* ievadītās modeļsugas *D. baltica* iegūtos reģeneratus izstādīja substrātā 2009. gada maijā 6 dažādos substrāta variantos. Kastītes, pārsegta ar agroplēvi, kas aiztur mitruma iztvaikošanu, novietoja plauktos zem dienas gaismas spuldzēm. Visu substrātu pH līmeni stabilizēja līdz pH 6,8 kaļķojot.

1. grants : substrāts no pļavas, kur aug orhidejas : priežu mizu mulča (1:1:0.5);
2. substrāts Nr. 1, segts ar meža augsni no daļēji satrudējušām lapām;
3. substrāts Nr. 1, segts ar pļavas augsnes un priežu mizu mulčas maisījumu (1:1:1);
4. velēzemes un lapu komposts : daļēji sadalīties augu daļu slānis zem sfagniem (1:3);
5. velēzemes un lapu komposts : daļēji sadalīties augu daļu slānis zem sfagniem (1:5).
6. velēzemes un lapu komposts : daļēji sadalīties augu daļu slānis zem sfagniem (1:5).

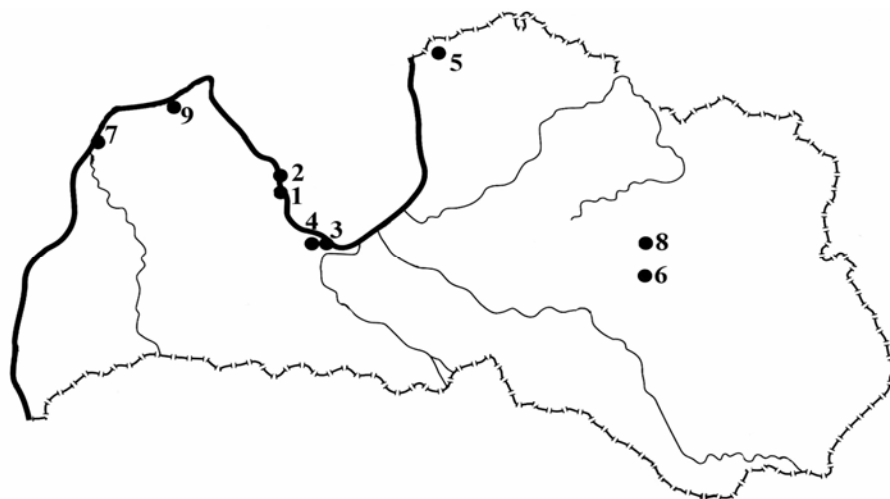
Variantos Nr.1–5 *in vitro* augus izstādīja no kultivēšanas telpas ar 23–25°C un 16h apgaismojumā un 8h tumsas režīmā. Variantā Nr. 6 *in vitro* iegūtie augi tika stādīti *ex vitro* pēc 5 mēnešu ekspozīcijas 5°C tumsā. Pēc mēneša kastes ar *ex vitro* iestādītajiem augiem pārvietoja atklātā lauka apstākļos. Papildmēslojums netika lietots. Variantus (1.3; 2.1; 2.2; 2.3; 3.1; 3.2; 4.1; 4.2; 5.1; 6.1) novērtēja 2009. gada septembrī (10.att.) pēc šādiem rādītājiem: sakņu skaits vienam augam, gumveida sakņu skaits vienam augam (angļu val. - *droppers*), gumu skaits vienam augam, augu kopējā masa (g). Iegūtos rezultātus apstrādāja ar PC-ORD 5.0 programmas daudzdimensijas Klāstera analīzes metodi. Pēc novērtēšanas *ex vitro* aklimatizētos *D. baltica* augus no visiem 6 aklimatizācijas izmēģinājuma variantiem 2009. gada septembrī pārstādīja NBD teritorijā 3 variantos: kultivētā dobē (1.), mitrā pļavā dīķa malā (2.), mitrā pļavā, kurā aug orhidejas no *Dactylorhiza* ģints (3.). Pēdējie divi varianti tuvināti *in situ* apstākļiem. Šajos variantos stādījumiem apvērta pļavas velēnu, sakapāja, pārklāja ar nelielu kūdras slāni. Vienlaicīgi tika ņemti paraugi augsnes analīzēm. 2010. un 2011. gados apsekoja pārziemojušos augus, reģistrēja to izdzīvotību un raksturoja attīstības īpatnības visā veģetācijas laikā.

2.2.4. Mikorizas pētījumi [III;V]

Mikorizas noteikšanas metodi apguva 2008. gadā, izmantojot *D. fuchsii* sakņu paraugus (8 bioloģiskie atkārtojumi). *D. baltica* sakņu paraugus (6 bioloģiskie atkārtojumi) ievāca no katra aklimatizācijas eksperimenta dažādiem substrāta variantiem pēc 5 mēnešiem no eksperimenta uzsākšanas (2009. gads). *D. fuchsii* sakņu paraugus fiksēja ar FEE šķīdumu – 37% formalīns, ledus etiķskābe, 96% etanols, destilēts ūdens (10:5:50:35, v/v/v/v). Vispirms FEE fiksētos paraugus pakāpeniski atūdeņoja ar etanola un terc-butanola šķīdumiem, pēc tam veica histovaska infiltrāciju tajos (Ruzin 1999). Anatomiskos šķērs griezumus (25µm) pagatavoja ar rotācijas mikrotomu (Leica RM 2145). Deparafinēšanu veica ar ksilola un etanola šķīdumiem un griezumus krāsoja ar astra zilā un safranīna maisījumu (astra zilais 0,5% etiķskābē : safranīns ūdenī, 5:1, v/v) (Braune et al. 1999) un toluidīnzilo krāsu (Norriss et al. 1994). Pēc krāsošanas griezumus atūdeņoja ar etanola un ksilola šķīdumiem un ieslēdza Kanādas balzāmā (Ruzin 1999). *D. fuchsii* un *D. baltica* sakņu mikorizas simbiontu noteikšanai izmantoja Hayman (1970) metodi. Vispirms sakņu fragmentus noskaloja tekošā krāna ūdenī, tad 1h karsēja 10% KOH šķīdumā. Pēc tam saknes noskaloja tekošā krāna ūdenī un krāsoja ar 0,05% triptānzilo krāsu (5min). Saknes uzglabāja lakto-glicerolā (pienskābes, glicerīna un destilēta ūdens maisījums, 1:1:1, v/v/v). Mikorizas intensitāti (M%) un mikorizas struktūru sastopamības biežumu (F%) visā sakņu sistēmā izrēķināja izmantojot datorprogrammu “Mycocalc” (Trouvelot et al. 1986). Preparātus apskatīja un veica fotografēšanu ar gaismas mikroskopu Leica DM5500B, kas aprīkots ar digitālo kameru Leica DFC490; ar fotoaparātu Canon PowerShot S70.

2.2.5. *Liparis loeselii* ģenētiskās daudzveidības noteikšana [VII; VIII]

Ģenētiskām analīzēm *L. loeselii* paraugi (lapu daļas 10mm x 10mm no lapām bez redzamiem insektu bojājumiem) ievākti 2010. gada jūnija mēnesī un jūlija pirmajā nedēļā. Kopumā tika ievākti 54 paraugi no 9 dažādām atradnēm (1.att.).



1. attēls. Paraugu ņemšanas vietas 2010.gadā *Liparis loeselii* populācijas ģenētiskās daudzveidības izpētei :1.-Engure Orhideju taka (OT); 2.-Engure; 3.-Kaņiera ezers; 4.-

Kaņiera ez. dabas taka (NT); 5. "Šalkas" grants karjers; 6.- Silabebru ezers; 7.- Būšnieku ezers; 8.- Dreimaņu ezers; 9.-Pēterezera vīga.

L. loeselii lapu daļas ievietoja plastikāta Petri platēs ar destilētu ūdeni samitrinātos filtrpapīra diskos un uzglabāja vēsumā līdz 10°C. Divu līdz četru stundu laikā paraugus nogādāja LU BI Augu ģenētikas laboratorijā. Paraugus žāvēja termostatā 45°C/16h. Lai pasargātu izkaltētos paraugus no telpas mitruma, Petri plates papildus noslēdza ar polietilēna plēvi un uzglabāja tumsā istabas temperatūrā.

Izdalīta DNS no izkaltētām lapām (51 paraugs) un no zaļajām lapiņām (3 paraugi), kas ņemtas no NBD Augu valsts bioloģiskās daudzveidības *in vitro* saglabāšanas nodaļā izaudzētiem *L. loeselii* augiem (sēklas ievāktas no atradnes Pēterezera vīgā Slīterē un ievadītas *in vitro* 2008. gadā). Veikti pieci DNS izdalīšanas atkārtojumi, izmantojot divas atšķirīgas DNS izdalīšanas metodes - Saghai-Marroof (1984) metode un modificētā Friar (2005) metode (Belogradova et al. 2012) [VII].

DNS koncentrācijas noteikšanai tika izmantotas divas spektrofotometriskās metodes DNS koncentrācijas noteikšanai ar Thermo Nanodrop -1000 un Ependorf BioPhotometer. Tālākai analīžu veikšanai tika atlasīti paraugi ar DNS koncentrāciju 6,0–187,0 ng.µL⁻¹ un noteikta DNS kvalitāte ar agarozes gēla elektroforēzes metodi. DNS kvalitāte tika noteikta ar agarozes gēla elektroforēzes metodi (agarozes gēla koncentrācija 1,5% un strāvas stiprums 70V, elektroforēzes laiks 1h 30 min.). Gēlu ievietoja 1xTAE bufera šķīduma peldē, kuram pievienota krāsviela – 20µl.L⁻¹ etīdija bromīda 10% šķīdums, krāsošanas laiks 40min. maisīšanas režīmā, pēc kuras paraugus pārlika destilētā ūdens peldē 10min. maisīšanas režīmā. Gēlu apgaismoja ar UV Itec Limited STX-20.M iekārtu, kas aprīkota ar digitālo kameru, lai iegūtu attēlus.

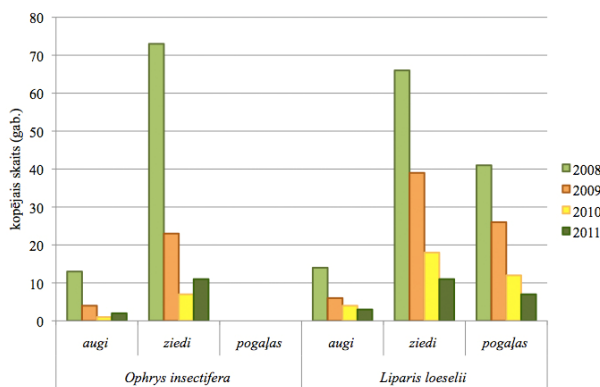
PCR kvalitātes noteikšanai tika izvēlēti 18 universālie retrotranspozoni no Kalendar (2010) kolekcijas, kuri citām augu sugām uzrādījuši lielāko polimorfisma līmeni. PCR produkta iegūšanai ar Gene Amp® PCR System 9700 iekārtu izvēlējās un uzstādīja programmu ar 30 cikliem: denaturācija 95°C/3min., kam sekoja 30 cikli secīgi atkārtoties (denaturācija 95°C/40s, marķieru pielipšana 50°C/40s un elongācija 68°C/60s, cikla beigu elongācija 72°C/10min. un mērcēšana 4°C. Katrā plates ailītē iepilda kopējo darba tilpumu 25µl: 4µl DNS parauga un 21µl MIX; kontroparaugs ar 4µl destilētu un dejonizētu (d.d.) ūdeni [VII]. Pēc PCR veikšanas iegūtie DNS pavedieni tika analizēti ar agarozes gēla elektroforēzes metodi, katrā PCR plates ailē, pie esošajiem 25µl PCR produkta pievienojot 5µl krāsvielu (6xMass Loading Gel Solution). Agarozes gēla koncentrācija 3% un strāvas stiprums 70V, elektroforēzes laiks 5h 30min.. Gēlu ievietoja 1xTAE bufera šķīduma peldē, kuram pievienota krāsviela – 20µl etīdija bromīda 10% šķīdums, krāsošanas laiks 40min. maisīšanas režīmā, pēc kuras paraugus pārlika destilētā ūdens peldē 10min. maisīšanas

režīmā. Gēlu apgaismoja ar UV Itec Limited STX-20.M iekārtu, kas aprīkota ar digitālo kameru, lai iegūtu attēlus. *L. loeselii* populāciju analīzei tika izvēlēti divi polimorfi praimerī. Iegūtie rezultāti analizēti ar datu apstrādes programmām (POPGENE 1.31. un NTSYSpc 2.1) *L. loeselii* ģenētiskās daudzveidības noteikšanai [VIII].

3. GALVENIE REZULĀTI UN DISKUSIJA

3.1. Pētījumi *in situ* [I;II;V;VI]

Lauka pētījumos veikta atšķirīgu biotopu apsekošana ar mērķi novērtēt reto orhideju sugu vitalitāti dažādos biotopos, lai sagatavotos pētījumiem *ex situ* un izvēlētos kvalitatīvākos augus sēklu ievākšanai un ievadīšanai *in vitro* no atšķirīgiem biotopiem, kā arī materiāla iegūšanai ģenētiskām analīzēm.



2. **attēls.** *Ophrys insectifera* (1. apdraudētības kategorija) un *Liparis loeselii* (3. apdraudētības kategorija) augu, ziedu un nobriedušo pogaļu uzskaitē divās orhideju atradnēs Engurē pie Lepstes.

Laika posmā no 2008. līdz 2011. gadam lauka pētījumos Engurē pie Lepstes uzskaitīto *O. insectifera* un *L. loeselii* indivīdu, kā arī to ziedu un pogaļu skaits pa gadiem ir strauji samazinājies (1.att.), kas varētu liecināt par nelabvēlīgu vides faktoru ietekmi uz orhideju sugām šajā biotopā (ES nozīmes aizsargājamā biotopa grupas apzīmējums–7230; Latvijas biotopa klasifikators: C.2.1.12.) (Auniņš 2010). Kaļķainie zāļu purvi ir īpaši sugām bagāti un Latvijā rets biotops ir kaļķainie zāļu purvi ar rūsgano melnceri (*Schoenus ferrugineus*) un dižo aslapi (*Cladium mariscus*), kuras ir sastopamas visās trijās Engures orhideju atradnēs, un ir īpaši aizsargājami biotopi gan Latvijā, gan Eiropā. Šī tipa biotopi parasti ir saistīti ar avotu tuvumu un tiem raksturīgi minerālvielām bagāti, bieži vien karbonātus saturoši ūdeņi, kuri ienes arī smiltis. Atkarībā no tā, kādi avotu ūdeņi izplūst – ar dzelzi, kaļķi vai sēru, veidojas veģetācija, kas atšķiras no pārējās purva daļas. Iespējamo avotu nogulumu uzkrāšanās vietās pastāvīgi palielinātā mitruma dēļ notiek arī kūdras slāņa uzkrāšanās (Pakalne u.c. 2008). Šajā laika posmā tika novērots, ka arī *O. insectifera* sugai samazinājās augu un ziedu skaits (2.att.). Pogaļas aizmetās, bet atšķirībā no *L. loeselii* nenobrieda, jo auga virszemes daļas dažu nedēļu laikā nekrotizējās inficējoties ar patogēniem mikroorganismiem, kas, iespējams, ir skaidrojams ar nokrišņu daudzuma

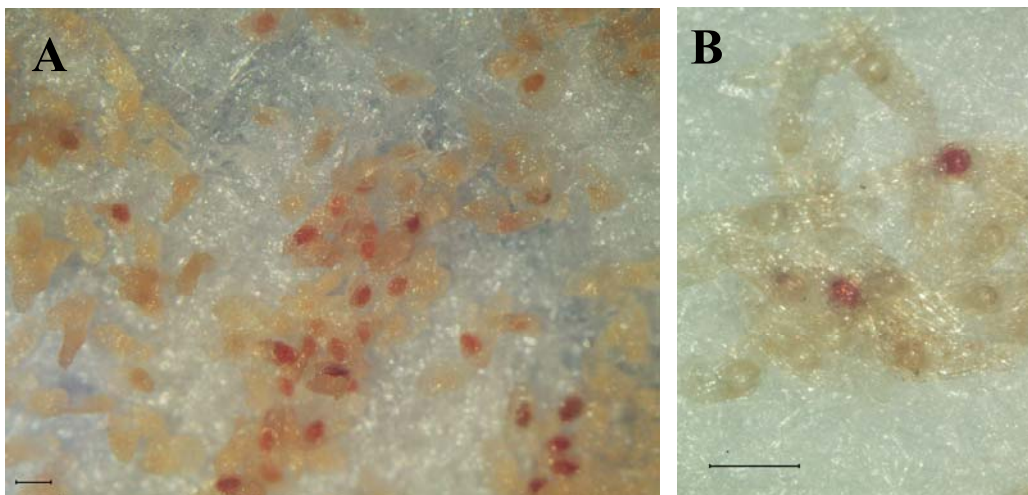
palielināšanos pogaļu nobriešanas periodā jūlija beigās un augusta sākumā [VI]. Konkrētās sugas dabiskais areāls vairāk ir saistīts ar Vidusjūras piekrastes klimatu, kur vasaras ir karstas un lielākoties sausas. Līdz šim *O. insectifera* apdraudētība zinātniskajā literatūrā skatīta apputeksnētāju (Vandewoestijne et al. 2009; Gutowski 1989; Louis 1992) un apgaismojuma izmaiņu kontekstā (Dorland, Willems 2002; 2006), līdz ar to mūsu pētījumi par klimata ietekmi uz šo sugu un iegūtie pirmie rezultāti ir jāuzskata par novitāti [VI]. Lai detalizēti skaidrotu iemeslus *O. insectifera* apdraudētībai Latvijā, ir nepieciešami šo datu salīdzinājumi vairāku gadu laikā. Literatūrā minēts, ka orhidejas jaunu biotopu ieņem efektīvāk, tiklīdz notikusi kolonizēšanās ar simbiontiem, kas kalpo jauno dīgstu apgādāšanai ar nepieciešamām barības vielām (Nara, Hogetsu 2004). Zinātnieku novērojumi liecina, ka, piemēram, *C. calceolus* var sekmīgi ieņemt jaunu biotopu, kurš ir izmainīts cilvēku saimnieciskās darbības rezultātā (Shefferson, Kull 2007). Pētījumi ar vairākām orhideju sugām parādījuši, ka orhideju mijiedarbība ar simbiontiem kalpo augu vides stresa pārvarēšanai (McCormick et al. 2004; Otero et al. 2002; Otero et al. 2004), kas palīdz augiem pielāgoties vides apstākļu maiņai (McCormick et al. 2006). Mūsu pētījumos ar *L. loeselii* konstatēts, ka „Šalku” grants karjerā pie Ainažiem populācija sekmīgi ieņēmusi jauno biotopu, kas sācis veidoties tikai no 1994. gada, kad tika izveidota šī grants ieguves vieta. Konkrētā gadījumā jāsecina, ka populācijas attīstību ir sekmējis viss apstākļu komplekss – pietiekošs apgaismojums, mitrums, u. c. faktori.

3.2. Pētījumi *in vitro*

Embriju dzīvotspējas novērtēšanas rezultāti [IV]

Embriju dzīvotspējas tests uzsākts 2009. gadā, aprobēts NBD Augu valsts bioloģiskās daudzveidības *in vitro* saglabāšanas nodaļā un izmantots praktiski, lai:

1. pārbaudītu sēklu dzīvotspēju noteiktā populācijā pa gadiem;
2. veiktu kontroles testu laboratorijas apstākļos modificētajām iniciālajām barotnēm par to piemērotību konkrētajai orhideju sugai.



3. attēls. Ar TTH iekrāsotie dzīvie embriji: **A**–*Liparis loeselii* (garuma nogrieznis atbilst 200 μm); **B**–*Cypripedium calceolus* (garuma nogrieznis atbilst 0,5 mm).

Embriju dzīvotspējas tests ļāva iepriekš prognozēt sēklu iespējamo vitalitāti no konkrētā sēklu materiāla pirms ievadīšanas *in vitro* (3.att.). Iegūtie rezultāti liecināja, ka embriju dzīvotspēja katrai sugai atšķīrās gan pēc ievākšanas vietas un laika, gan arī dažādos gados. Tests kalpoja arī uzglabāto sēklu dzīvotspējas pārbaudei un tika konstatēts, ka *L. loeselii* sēklas, kuras tika ievāktas 2009. gada rudenī, uzglabājot noslēgtā traukā 4°C temperatūrā, arī pēc gada nezaudēja embriju dzīvotspēju (30%). Literatūrā minētā TTH testa veikšanā sēklas pirmapstrādes, resp., sterilizēšanas ilgums ar 5% Ca(OCl)₂ + 1% Tween 80, katrai sugai bija atšķirīgs – robežās no 8min. līdz 1 stundai, lai sekmīgi būtu izbalinājies sēklapvalks, bet embrijs vēl būtu dzīvs. *C. calceolus* sēklu nepieciešamais pirmapstrādes laiks– 25min., *D. incarnata*– 16min. (Van Waes, Debergh 1986). Mūsu eksperiments par nepieciešamo sēklu izbalināšanas ilgumu, lai tā rezultātā embriji saglabātu savu dzīvotspēju, bija pielietojot ACE šķīdumu (1:2) *L. loeselii* 10min., *D. ochroleuca* 10min.; koncentrētā ACE šķīdumā - *C. calceolus* 12–15min., *O. insectifera* 10min.. Liela nozīme eksperimentālā darba pieredzei ar orhidejām bija, veicot izmēģinājumus *in vitro* ar dažādu sēklu gatavības pakāpi. Mainīgo klimatisko faktoru ietekmē dažādos Latvijas reģionos tika novērotas izteiktas atšķirības sēklu nobriešanā starp populācijām. Ekspedīcijās ievāktais sēklu materiāls ievadīšanai *in vitro* liecināja par dažādu sēklu gatavības pakāpi vienā laikā: 2008.gadā pie Būšnieka ezera *L. loeselii* sēklas vēl bija saistītas ar placentu tai laikā, kad Krustkalnos sēklas bija pārgatavojušās, birstošas, ar labi attīstītu sēklapvalku [II; IV]. Embriju dzīvotspējas tests ļāva kontrolēt ievāktu sēklu dīgšanas rezultātus *in vitro*.

Aseptiskā sēklu ievadīšana *in vitro* [I;II;III;IV]

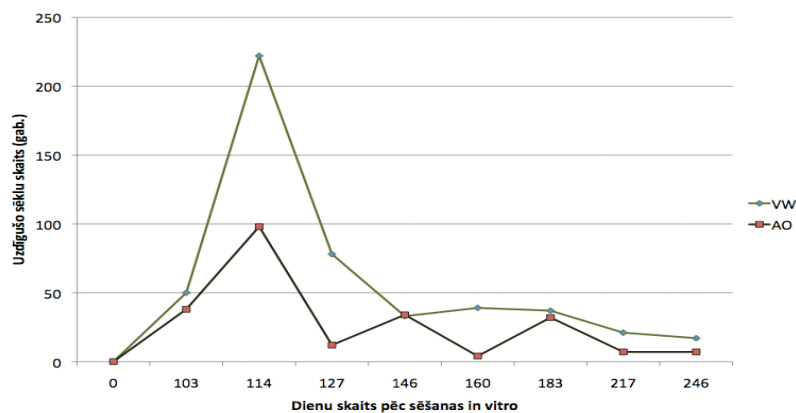
Eksperimentāli noteica nepieciešamo sēklu sterilizēšanas laiku pirms sēšanas *in vitro* un ACE šķīduma koncentrāciju dažādām orhideju sugām, kas bija tāds pats kā embriju dzīvotspējas testā, lai nodrošinātu sterilitāti un vienlaicīgi maksimāli saglabātu embrija dzīvotspēju: neatšķaidītā dezinficējošā ACE sterilizēja *C. calceolus* 12–15min., *O. insectifera* 10min.; 50% ACE atšķaidījumā– *C. calceolus*– 25min., pārējās sugas– 10min.. Literatūrā minēts, ka atsevišķu sugu sēklapvalks var saturēt kuģīnu, suberīnu, dažādus polisaharīdus, veidojot “bruņas” (angļu val. - *carapace*) (Rasmussen 1995). Tas var radīt nopietnu problēmu šādu sēklu diedzēšanai *in vitro* kultūrās. Mērcējot izvēlēto optimālāko laiku koncentrētā ACE šķīdumā, vienlaikus tika panākta *C. calceolus* un *O. insectifera* sēklu sterilizēšana un sēklapvalka skarifikācija. Kā viens no dīgšanas bremzējošiem faktoriem ir sēklapvalkā esošā ABS, kura darbojas kā inhibitors (Van Waes 1984, citēts pēc Rasmussen 1995). Mūsu pētījumos, lai izskalotu sēklapvalkā esošo ABS, sēklas papildus tika turētas 2h sterilā destilētā ūdenī. Iegūstot sēklu fotogrāfijas mikroskopā, bija iespējams sēklapvalka “bruņas” nofiksēt arī vizuāli (4.A att.). *C. calceolus* šāda sēklapvalka struktūra nebija

novērota (4.B att.). Sākotnēji izmantojot šķidrās barotnes un sēšanu uz filtrpapīra tiltiņiem mēģenēs, kad neatvērušās pogaļas sterilizēja iemērcot 96% etanolā un aizdedzināja, nodrošināja to pilnīgu sterilitāti [I; II]. Šo metodi pielietoja daļēji nobriedušo sēklu izsēšanai sterilajās barotnēs bez agara. Šķidrās barotnes deva iespēju barības šķīdumu papildināt vai arī filtrpapīra tiltiņu ar sēklām pārvietot mēģenēs no jauna pagatavotajās barotnēs. Taču šai metodei konstatēti arī trūkumi: daļēji nogatavojušās sēklas var nesaņemt pietiekošu barības vielu un fizioloģiski aktīvo vielu daudzumu, kas katrai sugai nepieciešams to sākotnējā attīstībā. Turklāt, kā literatūrā minēts, šķidrajām barotnēm straujāk mainās pH nekā agarizētajām, kā rezultātā rodas nekrozes un audi aiziet bojā (Cherevchenko et al. 2008). Tādēļ darba gaitā tika izstrādāta jauna sēklu ievadīšanas metodika, kad pilnīgi nobriedušo sēklu sterilizēšanu veica filtrpapīra diskos, kurus novietoja uz agarizētām iniciālajām barotnēm. Arī šādi ievadot *in vitro*, bija iespējams filtrpapīra diskus daļēji pasargāt no izžūšanas, periodiski samitrinot tos ar atšķaidītu barotnes šķīdumu.



4. attēls. Orhideju sēklas: **A**–*Ophrys insectifera* sēklas no NBD. Sēkla ar labi attīstītu embriju (kreisā pusē) un neattīstītu embriju (labā pusē). Sēklapvalks ar izteiktām “bruņām” tā šūnās (garuma nogrieznis atbilst 150 μm). **B**–*Cypripedium calceolus* sēkla ar atšķirīgu sēklapvalku (garuma nogrieznis atbilst 150 μm).

Izmēģinot Van Waes un Debergh (1986) pamatbarotni ar un bez AO kā adsorbenta sēklu diedzēšanas barotnēs, tika noskaidrots, ka AO pievienošana samazināja uzdīgušo augu skaitu (5.att.). Tas norāda, ka *in vitro* kultūras iniciācijas fāzē adsorbenta klātbūtne nav ieteicama.



5. attēls. *Dactylorhiza baltica* sēklu dīgšana uz Van Waes et al. 1986 pamatbarotnes (**AO** – ar aktīvo ogli, **VW** – bez aktīvās ogles) laika posmā no ievadīšanas *in vitro* 2007. gada 9. novembrī.

Visu orhideju sugu sēklas diedzēja tumsā un atsevišķos gadījumos dīgšana ilga pat vairākus gadus, tādēļ bija svarīgi izsekot, lai kultivēšanas trauki neizzūst. Mūsu pētījuma rezultāti parādīja, ka sēklu dīgšanas stimulēšanai, kā arī mitruma nodrošināšanai (sākotnējos eksperimentos disku virsma ar sēklām papildus tika mitrināta ar sterilu destilētu ūdeni) metodes nomaiņa uz modificētas šķidrās barotnes pievienošanu bija efektīva, bet laikietilpīga (1 reizi /1–2 mēnešos, sēklu dīgšanas iniciēšanas periodā līdz pat 5 reizēm). Salīdzinot ar epifītiskajām orhidejām, kuru uzdīgšanai nepieciešama gaisma (Augu valsts bioloģiskās daudzveidības *in vitro* saglabāšanas nodaļas dati), zemes (angļu v.–*terrestrial*) orhidejas labāk dīgst tumsā (Rasmussen 1995). Dīgšanu veicinošais galvenais faktors dažādu mērenā klimata joslas augu sugām ir vides temperatūra, kas ietekmē sēklu miera perioda pārtraukšanu (Ņečajeva 2012, u.c.). Fizisko miera perioda ilgumu var pārtraukt vai samazināt arī mehāniska vai ķīmiska ietekme (Baskin 1998). Viens no faktoriem var būt arī laiks: *C. calceolus* sēklas, kas bija iesētas *in vitro*, sāka dīgt pēc 2–3 mēnešiem, bet atsevišķu sēklu dīgšana bija novērojama līdz pat 2 gadiem (Jakobsone 2009). Mūsu eksperimentos konstatējām dīgšanu barotnēs bez apstrādes ar pazemināto temperatūru; būtiska loma bija aminoskābēm, bet citokinīnu pievienošana visām sugām nebija nepieciešama. Eksperimentālā ceļā ir izdevies apbērt metodiku ievadīšanai *in vitro* sešām no astoņām pētāmajām orhideju sugām: *D. baltica*, *D. fuchsii*, *D. russowii*, *D. ochroleuca*, *L. loeselii*, *C. calceolus*.

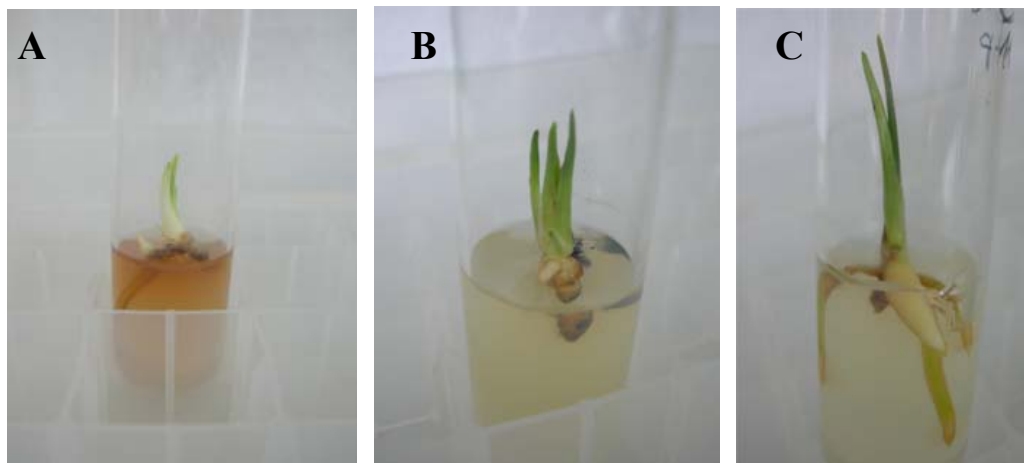
Augšanas un attīstības nodrošināšana *in vitro* [II;III;V]

Augu ekofizioloģija ir eksperimentāla zinātne, kas pēta fizioloģiskos mehānismus, kuri ir ekoloģisko pētījumu pamatā (Lambers et al. 2008). Apsekojot biotopus un vadoties no literatūras par *in situ* pētījumiem, ir mēģināts šīs zināšanas izmantot augu attīstības nodrošināšanai *in vitro* apstākļos. Svarīgākie faktori kultivēšanai ir barotnes makro- un mikroelementu sastāvs, vides pH, gaismas-tumsas režīms un temperatūra (Mitrofanova 2011).

Kultivēšanas barotnes

Katrai auga attīstības stadijai tika pielietotas atšķirīgas barotnes un to modifikācijas. Organisko piedevu noteikšana barotnēs ir komplicēta, pie tam eksistē atšķirības katrai sēklu populācijai un pat katras sēklas prasībās pret ķīmiskiem reaģentiem (Rasmussen 1995), kas mūsu gadījumā tika piemeklētas un noteiktas eksperimentālā ceļā, modificējot literatūrā publicētās pamatbarotnes. Viens no *in vitro* svarīgākajiem nemainīgajiem nosacījumiem ir barotnes pH un barotnes konsistence (Mitrofanova 2011). Ir atšķirīgi viedokļi par

fitohormonu pievienošanu iniciālajās barotnēs, piemēram, bija konstatēts, ka kinetīns inhibēja gan protokormu, gan rizoīdu veidošanos (Hadley 1970). Wotavova-Novotna (2007) pierādīja, ka auksīni veicināja sakņu veidošanos, bet citokinīni pastiprināja dzinumu attīstību un šūnu dalīšanos dažām *Dactylorhiza* sugām. *In vitro* augu virszemes daļu attīstību klasiskajā variantā nodrošina citokinīnu un auksīnu attiecība, kas vairākas reizes pārsniedz 1:1, t. i., tiem taksoniem, kam fitohormonu piedeva ir nepieciešama. Vejsadova (2006) publicējusi eksperimentu rezultātus, kas parādīja normālu attīstību zemes orhideju sugām *Dactylorhiza incarnata* subsp. *serotina* un *D. maculata* subsp. *maculata*, pievienojot kultivēšanas barotnei IES un zeatīnu attiecīgi 1,43 μ M un 0,72 μ M, kas aptuveni atbilst 0,25 un 0,15mg.L⁻¹, bet augsakņošanai 1,34 μ M NES kopā ar 1,11 μ M BAP. Augsakņošanas eksperiments autorei ildzis 12 mēnešus. Savukārt mūsu pētījumi liecināja, ka *Dactylorhiza* ģints sugas dīgstot veido sakni un tālāka auksīnu pielietošana nebija nepieciešama; turpmākā kultivēšanas procesā vecās saknes pamazām atmira un veidojās jaunas. Arī dabā pārsvarā saknes zemes orhidejām katru gadu veidojas no jauna un vecās atmirst (Smith, Read 1997). Mūsu nodaļas pētījumos konstatēts, ka *D. fuchsii* sākotnēji varēja kultivēt uz barotnēm bez augšanas regulatoriem, tuberīdiju un sakņu veidošanos novēroja jau pēc 3–6 mēnešiem no dīgšanas sākuma (Jakobsone 2008). Savukārt eksperimentālos pētījumos ar *C. calceolus* pēc 3–6 mēnešu inkubēšanas tumsā 5°C temperatūrā *in vitro* ar citokinīnu (BAP, kinetīnu vai zeatīnu) pievienošanu barotnēm tika iegūti *C. calceolus* augi, kurus pēc 4–5 mēnešiem izstādīja *ex vitro* (Klavina et al. 2009). Jāsecina, ka dzinumu attīstībai fitohormoni citokinīni nebija nepieciešami, ja šie augi domāti pārstādīšanai *ex vitro*; fitohormoni bija jāpievieno barotnei, lai uzturētu dzinumu ilgstoši juvenīlā stadijā, kā arī jaunu dzinumu veidošanās ierosināšanai. Mūsu pētījumi vēlreiz apliecina to, ka katrai orhideju sugai jāpiemēro atšķirīgas kultivēšanas metodes. Eksperimentu rezultāti ar *D. baltica* parādīja, ka jaunu dzinumu iniciāciju varēja iegūt ar fitohormonu kombināciju 0,2mg.L⁻¹ BAP + 0,05mg.L⁻¹ IES (6.A att.), bet kultivēšanas laikā bija sākusies barotnes krāsošanās, kas vēlāk izraisīja auga nekrozes. Ar 1,5g.L⁻¹ RE piedevu Fast (1974) barotnei daļa dzinumu juvenilizējās, un pēc nākošās pārstādīšanas *in vitro* daži no tiem veidoja jaunus dzinumus (6.B att.).



6. attēls. *Dactylorhiza baltica* pēc 1,5 mēnešu kultivēšanas *in vitro*: **A**–pamatbarotnei (Van Waes, Debergh 1986) pievienots $0,2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP + $0,05\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IES, uz saknes izveidojies jauns dzinums; **B**–pamatbarotnei (Fast 1974) pievienots $1,5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ RE, dzinuma attīstības fāze pirms proliferācijas; **C**–pamatbarotnei (Fast 1974) pievienots $1,0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ RE, dzinums ar labi attīstītu tuberīdiju un vitalitātes novērtējumu (4,5 balles).

Izvērtējot auga vitalitāti, labāko rezultātu uzrādīja variants, kam Fast (1974) pamatbarotnē bija pievienots $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ RE (6.Catt.). Literatūrā norādīts, ka RE satur vitamīnus un 10% aminoskābes (Rasmussen 1995), un šie slāpekļa organiskie savienojumi orhidejām kā simbiotiskajiem augiem ir vieglāk uzņemamā formā nekā slāpekļa neorganiskie savienojumi. Pievienojot barotnei RE, nebija novērotas sakņu un gumu nekrozes šajā eksperimentā. Savukārt fitohormona MT pievienošana barotnei nebija ieteicama *D. baltica* barotnēs, jo eksperimentos veidojās vidēji 25% sakņu un gumu nekrozes, kaut gan MT stimulēja jaunu dzinumumu veidošanos.*D. baltica* eksperimentu datu matemātiskās apstrādes rezultāti, izmantojot SPSS 17 programmu, apkopoti 1. un 2. tabulā [V].

1.tabula. BAP un rauga ekstrakta (RE) ietekme uz *D. baltica* auga kvalitātes rādītājiem *in vitro* (pamatbarotnes Van Waes, Debergh 1986 modifikācija), piemērojot Kruskala – Volisa testu.

*)Kruskala Volisa tests	Tuberīdijs	Sakņu skaits	Vitalitāte	Proliferācijas koeficients	Jauns dzinums	Nekrozes	Sakņu garums	Iepriekšējā barotne
Chi-Square	12,429	9,215	14,379	10,186	20,169	16,481	7,425	4,449
Asymp. Sig.	0,190	0,418	0,109	0,336	0,017	0,057	0,593	0,879

*) Kruskala Volisa testa rādītāji

2.tabula. Fitohormonu BAP, MT un IES ietekme uz *D. baltica* auga kvalitātes rādītājiem *in vitro* (pamatbarotnes Fast 1974 modifikācija), piemērojot Kruskala – Volisa testu.

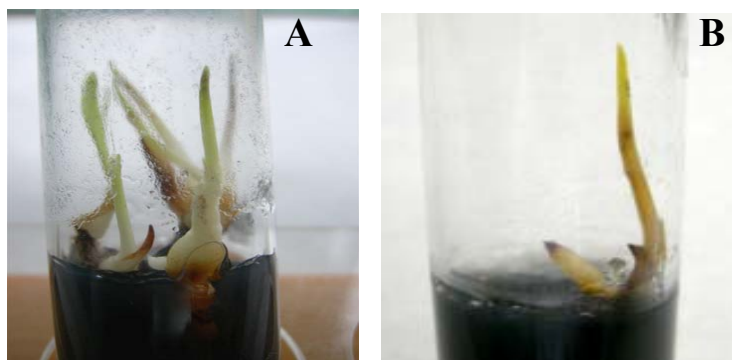
*)Kruskala Volisa tests	Tuberīdijs	Sakņu skaits	Vitalitāte	Proliferācijas koeficients	Jauns dzinums	Nekrozes	Sakņu garums	Iepriekšējā barotne
Chi-Square	6,861	6,072	20,496	14,427	8,339	17,233	3,154	18,300
Asymp. Sig.	0,652	0,733	0,015	0,108	0,500	0,045	0,958	0,032

*) Kruskala Volisa testa rādītāji

Paraugkopas būtiski atšķiras, ja *Asymp. Sig.* = $0,00 < 0,05$, tādēļ Van Waes, Debergh (1986) pamatbarotnes modifikācijas eksperimenta varianti ar BAP un RE būtiski atšķiras

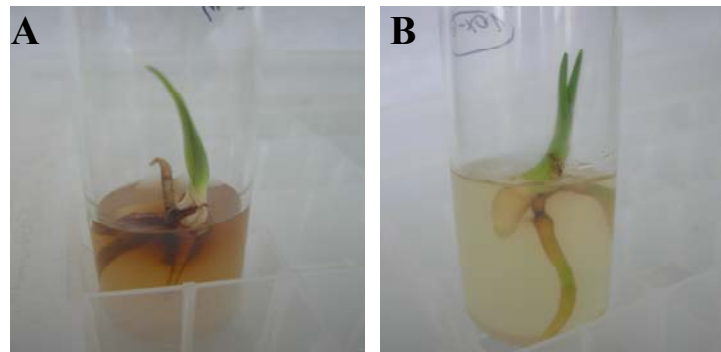
pēc jaunajiem dzinumiem (0,017), kas izveidojušies uz saknēm (1.tab.). Eksperimentu sērijā uz Fast (1974) pamatbarotnes modifikācijas ar fitohormonu BAP, MT un IES pievienošanu, varianti būtiski atšķīrās pēc vitalitātes (0,015), iepriekšējās barotnes sastāva (0,032) un nekrozēm (0,045) (2.tab.).

Eksperimentu varianti papildus tika izvērtēti, veicot divu paraugkopu salīdzināšanu ar Manna un Vitnija U-testu, kas uzrādīja, ka pēc šiem parametriem varianti savstarpēji būtiski neatšķīrās. Pamatojoties uz Manna un Vitnija testa rezultātiem, tika veikts arī Pīrsona korelācijas tests, lai noskaidrotu, kuri parametri savstarpēji korelē pozitīvi, bet kuri negatīvi. Rezultātā eksperimentos uz Van Waes, Debergh (1986) pamatbarotnes modifikācijas ticamības intervālā $p < 0,01$ būtiskākās negatīvās korelācijas ir starp vitalitāti un nekrozēm (-0,802), kā arī otra ciešākā negatīvā korelācija konstatēta starp sakņu skaitu un jauno dzinumu skaitu (-0,300). Vienīgā ciešā pozitīvā korelācija konstatēta starp tuberīdiju skaitu un vitalitāti (0,289). Eksperimentu sērijai uz Fast (1974) pamatbarotnes modifikācijas ar ticamības līmeni $p < 0,01$ Pīrsona korelācija uzrāda ciešu negatīvu korelāciju starp nekrozi un vitalitāti (-0,738), sakņu garumu (-0,389) un tuberīdijiem (-0,358). Savukārt vitalitāte pozitīvi korelē ar tuberīdijiem (0,487), sakņu skaitu (0,280) un sakņu garumu (0,230). Eksperimentālā darba rezultātu izvērtēšana pēc Kruskala-Volisa testa, Manna un Vitnija U-testa un Pīrsona korelācijas testa ļauj detalizētāk prognozēt turpmākos *in vitro* kultivēšanas eksperimentālās darbības virzienus. Šos pētījumus nepieciešams vēl turpināt. Atšķirībā no masveidā pavairojamiem kultūraugiem, t. sk. epifītisko orhideju kultūras šķirnēm, retajiem un apdraudētajiem augiem nepieciešama tāda attīstības un pavairošanās nodrošināšana *in vitro*, kas ir pietuvināta to dabiskiem procesiem. Kultivēšanas gaitā izvirzījās divas galvenās problēmas: audu nekrožu novēršana un jaunu augu iegūšana līdzīgi kā tas notiek *in situ*, kur pavairošanās ir neliela. Audu nekrozes izsauc pastiprināta fenolu izdalīšanās no augiem barotnē (Wotavová-Novotná 2007), kas tajā oksidējas veidojot hinonus, kuri augiem ir toksiski, kā rezultātā augu audi nekrotizējas. Klasiskā metode šā procesa novēršanai ir adsorbenta pievienošana. Parasti šim nolūkam dažādu augu kultivējamām barotnēm pievieno AO devās no 1 līdz 2g (Rasmussen 1995; Malmgren 1994; Stephan 1988; Vöth 1976). Promocijas darbā novērst audu nekrozes ar $1,5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ AO pievienošanu izdevās tikai sugai *D. russowii* (7.A att.).



7. attēls. AO ietekme uz orhideju kultivēšanu *in vitro*: **A**–*Dactylorhiza russowii* nekrozes nebija konstatētas; **B**–*Dactylorhiza baltica* – daļa labi attīstītu dzinumumu iet bojā no audu nekrozēm.

No sēkļu sēšanas līdz dīgsta stadijai kultivēšana notiek pilnīgā tumsas režīmā un tiek regulāri pārraudzīta, jo jaunie dīgsti var nekrotizēties. Augi pārstādāmi jaunās, katrai attīstības fāzei atbilstošās barotnēs ik pēc 3–6 nedēļām atkarībā no sugas, gan lai stimulētu normālu augšanu un attīstību, gan arī nekrožu novēršanai. Nekrozes dažādās auga kultivēšanas stadijās ir viena no svarīgākajām problēmām *in vitro*, jo tās var novest augu pie pilnīgas bojāejas [III]. Lai atrastu risinājumu šai problēmai, ar *in vitro* iegūtajiem modeļsugas *D. baltica* augiem veikti pirmie izmēģinājumi ar paaugstinātu Ca^{2+} devu barotnē. No literatūras zināms, ka augstā Ca^{2+} koncentrācija šūnapvalkā un šūnu membrānā lielākoties kalpo tās izturības nodrošināšanai un šūnu membrānu struktūras regulēšanai. Augsta fermenta poligalaktouronāzes aktivitāte, kas savukārt šķeļ pektīnu, tiek novērta tad, kad trūkst Ca^{2+} , kas ir par iemeslu šūnapvalka degradācijai, kā rezultātā augu audi kļūst “mīksti”, caurspīdīgi. Kalcijs ir nepieciešams katjonu-anjonu līdzsvaram, organisko un neorganisko vielu jonu savstarpējai mijiedarbībai (Pierik 1997). Uzsāktajos eksperimentos ar paaugstinātu Ca^{2+} saturu tas pievienots modificētai Norstog (1973) pamatbarotnei kalcija glukonāta monohidrāta ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{CaO}_{14} \times \text{H}_2\text{O}$) veidā. Šie izmēģinājumi salīdzinājumā ar Norstog (1973) pamatbarotni pierādīja būtisku nekrožu samazināšanos reģenerantu kultivēšanas procesā (8.att.)–vienreizēja paaugstināta kalcija deva ($2,28\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) saglabāja pēciedarbību, radot iespēju kultivēt orhidejas citokinīnu klātbūtnē, kas dod iespēju kultivēšanas procesā iegūt jaunus dzinumus [V].



8. attēls. *Dactylorhiza baltica* pēc kultivēšanas *in vitro* 1,5 mēnešus modificētā Norstog (1973) pamatbarotnē: **A**–ar neizmainītu kalcija devu veidojās nekrozes; **B**–ar paaugstinātu kalcija devu ($2,28\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

Apgaismojums un temperatūra

No izešanas *in vitro* līdz dīgstu iegūšanai ar normāli izveidotām saknēm, kultivēšana notiek pilnīgā tumsas režīmā. Tas saistīts ar to, ka arī dabā sākotnējā attīstība notiek augsnē. Ja zemes orhidejām šis posms *in situ* ilgst 3–4 un vairāk gadus atkarībā no sugas (Rasmussen 1995), tad *in vitro* apstākļos tas norit dažus mēnešus. Ja nav nepieciešama pavairošana vai uzturēšana sterilā kultūrā, rudenī asimbiotiskā kultūrā iesētās orhidejas jau pavasarī var izstādīt substrātā [V]. Gan saglabāšanas nolūkos augu sterilajā bankā, gan aklimatizācijai *ex vitro* iegūtos reģenerantus vēlams 2–4 mēnešus eksponēt pazeminātā temperatūrā ($5\pm 2^\circ\text{C}$) lēnās augšanas apstākļos un tumsā, lai tie izietu miera periodu.

3.3. Reģenerantu aklimatizēšana *ex vitro* [V]

Aklimatizācija ir auga indivīda morfoloģiskā un fizioloģiskā pielāgošanās, lai kompensētu dzīvotspējas samazināšanos pēc sākotnējās stresa reakcijas (Lambers et al. 2008). Tiek praktizētas dažādas *in vitro* augu aklimatizēšanas metodes, bet īpaši svarīgi ir uzturēt pastāvīgus aklimatizēšanas nosacījumus, lai augi izvairītos no stresa (Gordon 1991). Autors uzsver, ka ir pieci svarīgākie faktori, kuru kopums ir jānodrošina un jākontrolē, lai būtu nemainīgi aklimatizācijas procesā un tie ir: papildus gaisa mitrums (pirmajās 2 nedēļās līdz 95%–100%, 3. nedēļā pakāpeniski samazinot), substrāta barības vielas, gaismas režīms, gaisa cirkulācija un temperatūra. Lai sekmīgi reintroducētu *in vitro* iegūtos reģenerantus *ex situ*–*in situ* apstākļos NBD, veiktas augsnes analīzes un izvēlētas stādīšanas vietas, ņemot vērā mūsu lauka pētījumus *in situ*. Analizēti augsnes paraugi aklimatizācijas eksperimentam izvēlētajām trim vietām: no kultivētās dobes (1), mitrās pļavas dīķa malā (2) un pļavas (3), kurā aug *Dactylorhiza* ģints orhidejas. Augsnes analīžu rezultāti apkopoti 3.tabulā. Aklimatizācijas procesa laikā *in vitro* eksperimentāli iegūtajiem *D. baltica* reģenerantiem gaisa mitrumu nodrošināja ar divkārtu agroplēves pārsegumu substrātu kastēm (Nr.1–6), kontrolētā mākslīgās gaismas režīmā – pirmās 3 nedēļas 24h mākslīgā apgaismojumā un 23–25°C temperatūrā un 2 nedēļas āra apstākļos zem agroplēves.

3. tabula. Barības elementu saturs *Dactylorhiza baltica* aklimatizācijas eksperimentā NBD un Orhideju takā Engures dabas liegumā ⁽¹⁾.

Ķīmiskie elementi	Barības elementi (mg.L ⁻¹) 1M HCl izvilkumā			
	1.variants Kultivētā dobe	2.variants Mitrā pļava ūdenskrātuves malā	3.variants Mitrā pļava	Engure Orhideju taka
N	68	27	25	19
P	807	174	172	30
K	275	90	53	140
Ca	7375	13500	3035	3413
Mg	875	3750	788	413
S	21	21	21	20
Fe	1060	960	920	330
Mn	110	75	65	29
Zn	17	3,25	3,95	3,65
Cu	8	2,25	1,45	0,35
Mo*	0,05	0,04	0,06	0,04
B*	1	< 0,1	0,6	0,40
pH _{KCl}	6,85	7,15	6,74	5,50

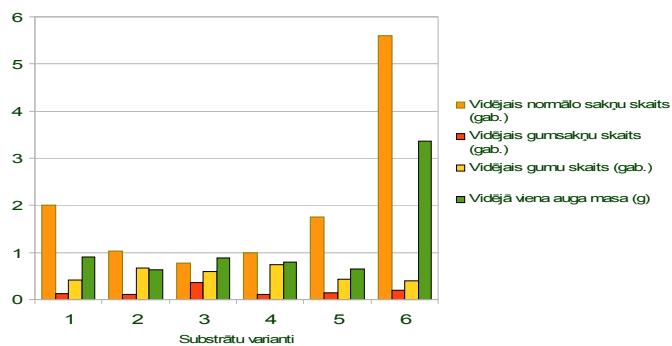
Metodes jutības robeža (*) ; mikroelementiem robežās 0,01–0,5 mg.L⁻¹.

¹⁾ Augsnes analīzes veiktas LU BI Augu minerālās barošanās laboratorijā, LZP projekta Nr. 09.1549 C sadaļas ietvaros.

Pēc augsnes analīžu rezultātiem redzams, ka visos NBD augsnes paraugos ir augsts kalcija, magnija, fosfora un dzelzs saturs salīdzinājumā ar Engures Orhideju taku. Tomēr apliecinājumu par iespēju *in vitro* pavairotās orhidejas pilnībā aklimatizēt *in situ* tuvinātiem apstākļiem mūsdiā vairāk pamatoja tas, ka 3. un it īpaši 2.varianta (mitra pļava ūdenskrātuves malā) deva tas, ka šajās pļavās jau savvaļā auga *Dactylorhiza* ģints sugas.

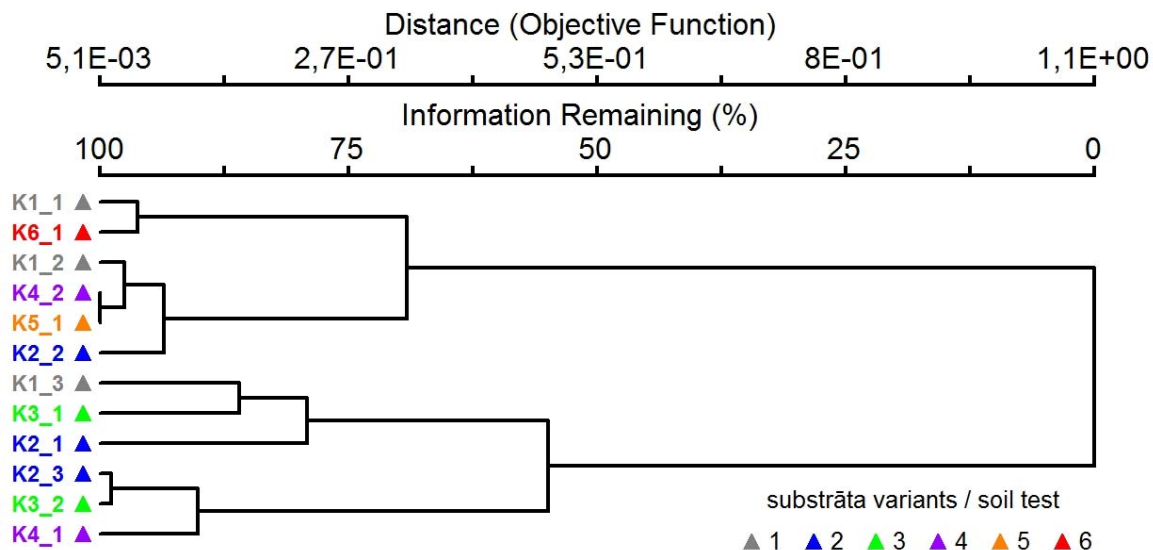


Ex vitro izstādīto *Dactylorhiza baltica* kvalitātes novērtējums dažādos substrātos



9. attēls. *Dactylorhiza baltica* (6.variants: velēnzemes un lapu komposts: daļēji sadalījušos augu daļu slānis zem sfagniem (1:5), ekspozīcija piecus mēnešus tumsā lēnās augšanas apstākļos 5°C) augi pēc piecu mēnešu aklimatizācijas *ex vitro* 2009. gadā. Pirms izstādīšanas NBD teritorijā rudenī veikta to kvalitātes novērtēšana.

Rezultāti tika izvērtēti pēc *D. baltica* piecu mēnešu aklimatizācijas sešos dažādos substrāta variantos (9.att.). Aklimatizācijas *ex vitro* pētījuma uzdevums bija noskaidrot, kā auga *in vitro* kultivēšanas apstākļi (barotnes sastāvs, temperatūra) ietekmēja *D. baltica* kvalitātes rādītājus. Iegūtos rezultātus apstrādāja ar PC-ORD 5.0 programmas daudzdimensijas Klāstera analīzes metodi (10.att.).

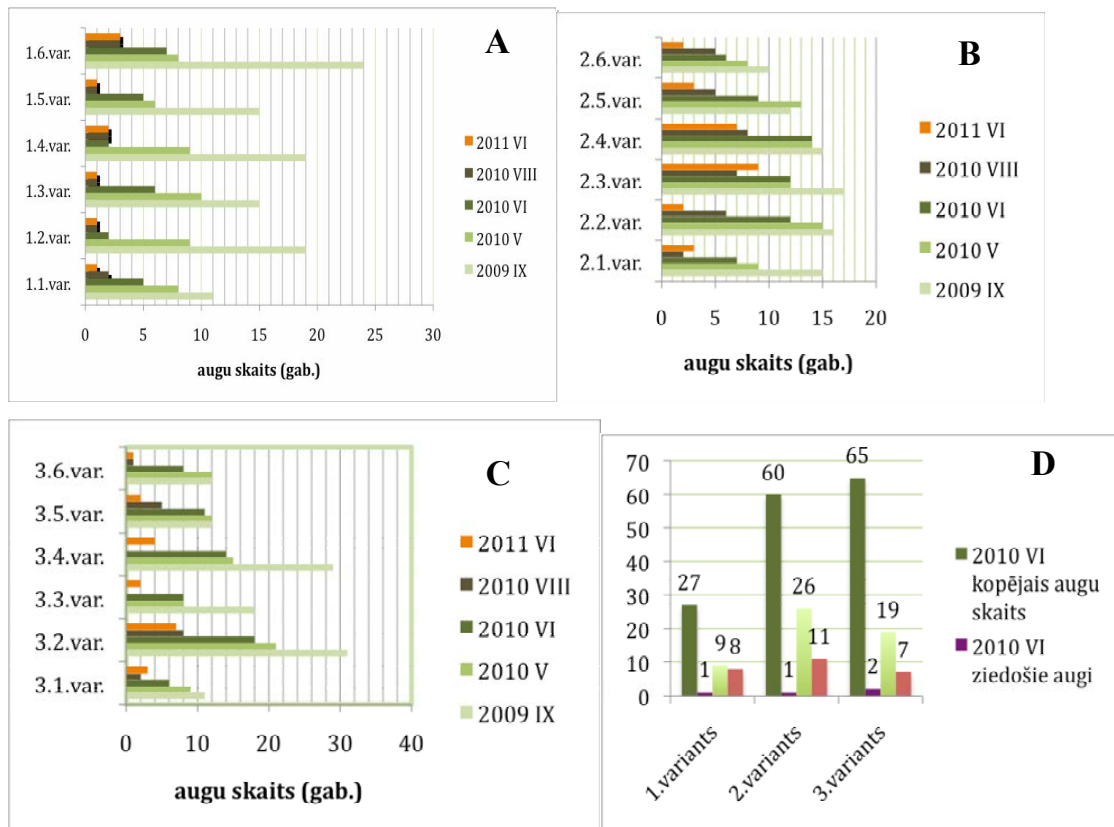


10. attēls. Klāstera dendrogramma ar *Dactylorhiza baltica* augu aklimatizēšanas rezultātiem, izvērtējot sešus substrātu (atšķirīgais krāsojums) un augu kultivēšanas *in vitro* variantus (K1–K6).

Lai atrastu sakarības starp augu aklimatizācijai izmantoto substrātu variantiem un *D. baltica* augu kvalitātes rādītājiem, Klāstera analīzē izvēlēts dalījums sešās grupās, izvērtējot pēc četriem faktoriem: pēc sakņu skaita, gumveida sakņu skaita (angļu val.–*droppers*), gumu skaita un auga vidējās masas (g). Izvērtējot iegūtos rezultātus jāsecina, ka substrātu atšķirības šajā gadījumā *D. baltica* augu kvalitātes rādītāju izvērtējumā nav būtiskas. Būtiski atšķiras K4.1.un K4.2.variānti, jo *in vitro* augu kultivēšanā bija izmantotas atšķirīgas barotņu modifikācijas, kas liek secināt, ka šajā eksperimentā kultivēšanas barotnes pirms auga aklimatizēšanas *ex vitro* būtiskāk ietekmēja auga vitalitāti nekā aklimatizēšanas substrātu izvēle. Izteikta atšķirība no pārējiem variantiem bija variantam Nr.3 (K3.1. un K3.2.), kas arī liecināja par *D. baltica* augu atšķirīgiem kultivēšanas apstākļiem *in vitro*, resp., kuri bija *in vitro* kultivēti ar paaugstinātu kalcija devu. Neskatoties uz to, ka substrātu variantos Nr.1.–5. *in vitro* augus izstādīja no kultivēšanas telpas ar 23–25°C un 16h apgaismojumu, bet substrātu variantā Nr.6 *in vitro* iegūtie augi tika stādīti *ex vitro* pēc 5 mēnešu ekspozīcijas 5°C tumsā, klāstera dendrogrammā ir redzama šo variantu līdzība (piem. K6.1. un K1.1.). Tātad būtu jāsecina, ka aklimatizācijai izvēlētie substrātu varianti ir līdzīgi. Tomēr pēc 5.B attēla redzams, ka 6.variāntam kvalitātes rādītāji ievērojami atšķirās, ko acīmredzot ietekmēja miera periods (piecus mēnešus 5°C, tumsā).

Rezultātā 2010. gadā 6.varianta augi pārziemoja sekmīgi, kā arī jau nākošajā gadā uzziedēja pirmie augi katrā no trim dažādajiem eksperimentālajiem stādījumiem NBD, ko nenovēroja citos variantos. Tas savukārt liecināja, ka uzziedēšanu ietekmēja nevis *ex vitro* eksperimentālo stādījumu variants, bet tieši *in vitro* kultivēšanas apstākļi pirms aklimatizācijas. Salīdzinoši augstāko vitalitāti 6.varianta augi saglabāja arī 2011. gadā.

2010. un 2011. gadu dati par *D. baltica* reintrodukciju *in situ* tuvinātajos apstākļos NBD parādīti 11.attēlā. Jau 2010. gada pavasarī *D. baltica* visos trijos NBD eksperimentālajos stādījumos pa vienam eksemplāram pirmo reizi uzziedēja. Pēc pārziemošanas 2010./2011. gadā *D. baltica* sekmīgi konkurēja ar citām sugām pļavā *ex situ* – *in situ* apstākļos (12.A att.). Eksperimenti kultivētā dobē tomēr neattaisnojās, jo vieta nebija piemērota. 2010. gada rudenī šajā dobē izdzīvojušie *D. baltica* augi, kas tika pārstādīti citā nožogotā NBD dobē pusēnā un 2011. gada pavasarī šie *D. baltica* stādi bija sekmīgi pārziemojuši (12.B att.).



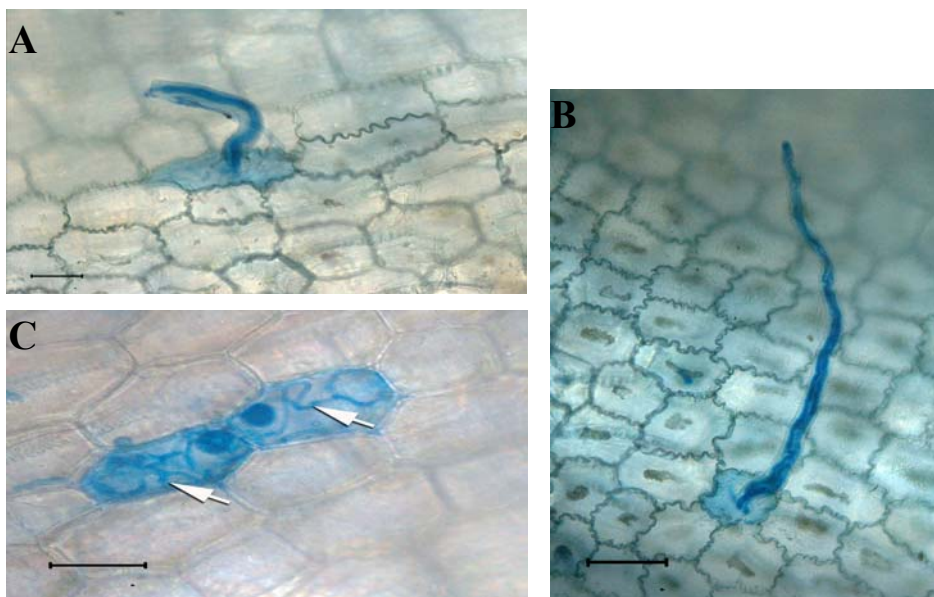
11. attēls. *Dactylorhiza baltica* izdzīvojušo augu skaits *ex vitro* apstākļos: **A** – kultivētā dobē; **B** – mitrā pļavā ūdenskrātuves malā, kas palaikam applūst; **C** – mitrā pļavā; **D** – kopējais izdzīvojušo un uzziedējušo augu skaits trīs dažādos *ex vitro* stādījumos.



12. attēls. *Dactylorhiza baltica* (6.variants) pēc pārziemošanas 2009. un 2010. gados: **A**—ar labi attīstītu ziedkopu un raksturīgo lapu pigmentāciju NBD eksperimentālā āra stādījumā (mitrā pļavā dīķa malā); **B**—ziedoši augi kultivētā dobē.

3.4. Mikorizas veidošanās aklimatizētiem *Dactylorhiza baltica* augiem [III;V]

Lai orhidejas aklimatizētos *ex vitro*, viens no svarīgākajiem faktoriem ir sekmīga mikorizas izveidošanās. Simbiozes procesā orhidejas uzņem barības vielas no sēnes (Cameron et al. 1999). Orhidejas un to simbiotiskās sēnes veido kopīgu sakņu un micēliju tīklu, kas kopā ar augsni veido ekosistēmas kopumu (Selosse et al. 2006). Darbā iegūtie rezultāti parādīja, ka aklimatizācijas procesā asimbiotiskos apstākļos iegūtie augi kolonizējās ar simbiontiem (13.att.).



13. attēls. *Dactylorhiza baltica in vitro* augu sakņu kolonizācija ar simbiontiem pēc piecu mēnešu aklimatizācijas *ex vitro*: **A**; **B**—4.variants [velēnzemes un lapu komposts : daļēji sadalījis augu daļu slānis zem sfagniem (1:3)]; mikorizas sēņu hifas kolonizējušās spurgaliņās; **C** – sakņu šūnas kolonizēšanās ar mikorizas sēņu hifām. Nogrieznis atbilst 30µm (**A** un **C**); 50µm (**B**).

Analizējamās sakņu fragmentos tika aprēķināti mikorizas kolonizēšanās pakāpes rādītāji: mikorizas intensitāte visā sakņu sistēmā (M%) un mikorizas frekvence jeb mikorizas struktūru sastopamības biežums (F%) visā sakņu sistēmā. Sešiem substrātu variantiem (Nr.1–6) veica statistisko datu apstrādi, izmantojot M% un F% parametrus, izmantojot datorprogrammu “Mycocalc” (4.tab.).

4. tabula. *Dactylorhiza baltica* sakņu klonizēšanās intensitāte (M%) un frekvence (F%) pēc piecu mēnešu aklimatizācijas *ex vitro* dažādos augsnes substrātos (Nr.1–6).

Variants	Nr.1	Nr.2	Nr.3	Nr.4	Nr.5	Nr.6
M%	0,2	11,7	0,4	1,1	0,6	7,2
F%	5	69	12	29	20	83

Paraugiem pēc aklimatizācijas *ex vitro* no substrātu variantiem Nr.2 [substrāts Nr.1 (grants : substrāts no pļavas, kur aug orhidejas : priežu mizu mulča (1:1:0.5)], segts ar meža augsni no daļēji satrudējušām lapām) un Nr.6 [velēzemes un lapu komposts : daļēji sadalījies augu daļu slānis zem sfagniem (1:5)] simbiozes intensitāte (M%) un mikorizas frekvence (F%) bija ievērojami augstāka nekā pārējos variantos (Nr.1;3;4;5), kas liecināja, ka 2. un 6.varianta substrātā ir komponenti, kas stimulēja mikorizāciju, iespējams, atbilstošas simbiotiskās sēnes vai to attīstībai labvēlīgi apstākļi. Tas, ka *in vitro* augi sekmīgi uzņēma saknēs simbiontus, parādīja arī pētījumi NBD analizētos *C. calceolus* paraugos jau pēc 2 mēnešu aklimatizēšanas *ex vitro*; veicot mikorizas pētījumus pēc publicētās metodes (Hayman 1970), sakņu mikorizācijas procents bija robežās no 1,0–8,9% (Klavina et al. 2009).

Lai pilnībā realizētu *in vitro* iegūto orhideju aklimatizāciju *ex vitro* un panāktu šo augu adaptāciju dabiskā vai dabiskai videi tuvinātos apstākļos, nepieciešami papildus pētījumi. Šobrīd veiksmīgi jau uzsākti *D. fuchsii* un *D. baltica* mikorizas pētījumi, kā arī tiks turpināti mikorizas pētījumi arī citām orhideju sugām [III;V].

3.5. *Liparis loeselii* populāciju ģenētiskā daudzveidība dažādos Latvijas biotopos [VII; VIII].

No pārbaudītajiem 18 uz retrotranspozoniem balstītajiem PCR praimeriem, tikai divi (2079 un 2415) uzrādīja augstu ģenētisko polimorfismu un līdz ar to bija piemēroti *L. loeselii* ģenētiskās daudzveidības izpētei.

5.tabula. Nukleotīdu sekvences, kuras raksturīgas diviem marķieriem un uzrāda *Liparis loeselii* ģenētiskās daudzveidības populāciju polimorfismu.

Praimera Nr.	(*) Nukleotīdu sekvences (5'→3')
2079	AGGTGGGCGCCA
2415	CATCGTAGGTGGGCGCCA

(*) Kalendar et al. 2010.

Abi praimerī kopumā veidoja 50 lokusus, ar praimerī 2415 tika iezīmēti 23 lokusi un ar praimerī 2079–27 lokusi (5.tab.). Iezīmēto lokusu polimorfisms bija atšķirīgs dažādos biotopos augušiem augiem un svārstījās no 48% līdz 84% (6.tab.).

6.tabula. Polimorfo lokusu daudzums *Liparis loeselii* populācijās.

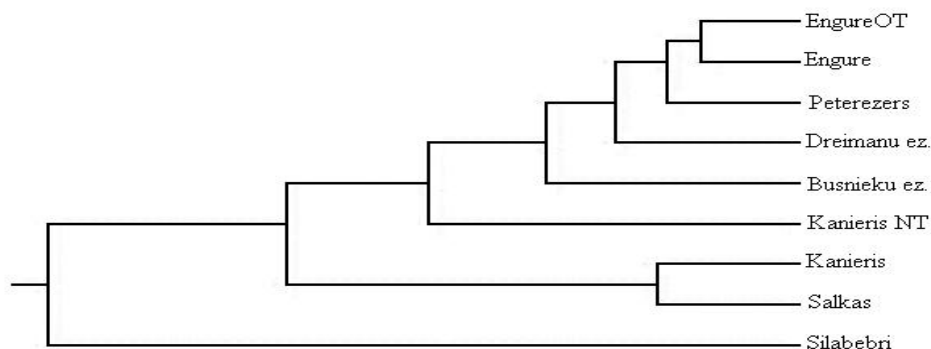
<i>L. loeselii</i> biotops	Polimorfo lokusu	
	skaits	frekvence (%)
Engures OT	32	64
Engure pie Lepstes	42	84
Krustkalni	28	56
Pēterezera viga, Slītere	24	48
Pārējos pētītajos biotopos	0	0

Polimorfo lokusu daudzums raksturo *L. loeselii* ģenētisko daudzveidību, ko izsaka ar Neja indeksu (Nei 1972). No visiem analizētiem lokusiem trīs lokusi bija raksturīgi tikai vienam *L. loeselii* ekotipam un netika konstatēti citās augtenēs augošajiem augiem. Veicot genotipēšanu tika konstatēti trīs „unikālie” lokusi ar marķieri 2415. Divi unikāli lokusi Nr.4 un Nr.13 tika konstatēti orhidejām no Engures OT un viens (Nr.16) no Kaņiera ezera apkārtnē augošajiem augiem (7.tab.).

7.tabula. *Liparis loeselii* unikālās alēles

Lokusa Nr.	Biotops	Alēļu frekvence (%)
4	Engures OT	13,4
13	Engures OT	50,0
16	Kaņieris	13,4

Iegūto rezultātu analīzei tika izmantotas datu matemātiskās apstrādes programmas: PopGene 1.31 un NTSYSpC 2.1 (14.;15.att.).



14. attēls. *Liparis loeselii* Latvijas populācijas ģenētisko daudzveidību raksturojošā dendrogramma.

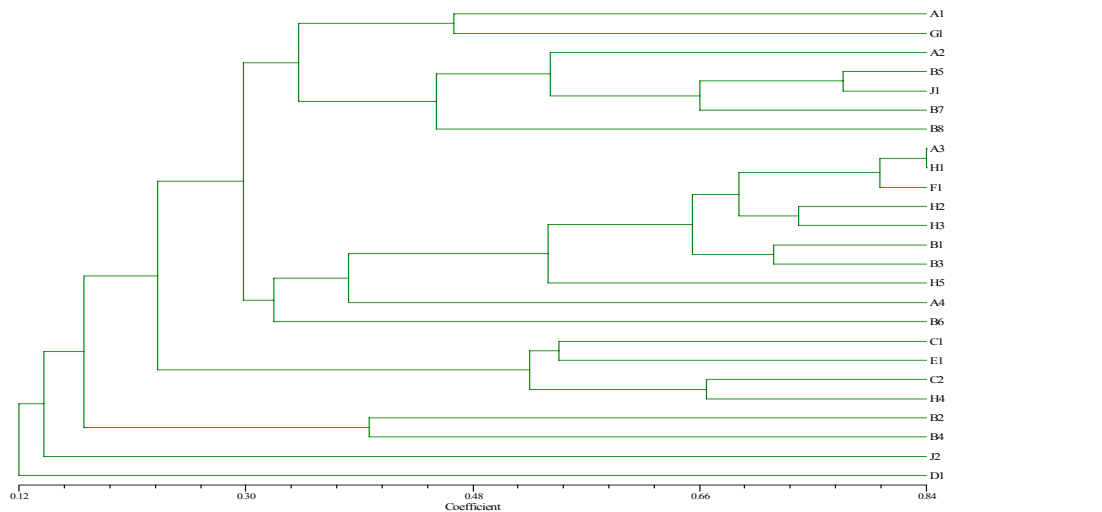
Paraugu ņemšanas vietas: 1.-Engure Orhideju taka (OT); 2.-Engure; 3.-Kaņiera ezers; 4.-Kaņiera ez. dabas taka (NT); 5. “Šalkas” grants karjers; 6.- Silabebri ezers; 7.- Būšnieku ezers; 8.- Dreimaņu ezers; 9.-Pēterezera viga (1.att.).

Dendrogramma parāda astoņās dažādās augtēs augošo analizēto augu ģenētisko līdzību. Dendrogrammā divas grupas veido ģenētiski savstarpēji līdzīgu indivīdu klāsterus: *L. loeselii* no Engures OT un Engures (pie Lepstes) ekotipi, kā arī no Kaņiera ezera – Ainažu apkaimes grants karjera („Šalkas”) ekotipiem. Indivīdi no Kaņiera ezera un Ainažu grants karjera populācijām ir ģeogrāfiski attāli, bet ģenētiski savstarpēji līdzīgi, uz ko norāda arī ģenētiskās distances (8.tab.), kuru vērtības svārstās no 0,092 līdz 0,374. Izteikti ģenētiski atšķirīgu indivīdu kopu veido astotās grupas klāstera atzars, kas raksturo indivīdus no Silabebru ezera populācijas. Ģenētiskās distances (8.tab.) vērtības svārstās no 0,317 līdz 0,654.

8. tabula. Ģenētiskās distances starp *Liparis loeselii* indivīdiem no dažādiem biotopiem

Biotops	Engure OT	Engure pie Lepstes	Kaņieris	Kaņieris NT	“Šalku” grants karjers	Silabebru ezers	Būšnieku ezers	Dreimaņu ezera pussala
Engure pie Lepstes	0,068							
Kaņieris	0,306	0,300						
Kaņieris NT	0,222	0,198	0,396					
“Šalkas” grants karjers	0,374	0,338	0,092	0,446				
Silabebru ezers	0,317	0,325	0,610	0,654	0,654			
Bušnieku ezers	0,138	0,213	0,313	0,301	0,478	0,616		
Dreimaņu ezera pussala	0,076	0,125	0,280	0,293	0,333	0,183	0,203	
Pēterezera viga	0,101	0,085	0,186	0,182	0,244	0,534	0,110	0,171

Ģenētiskās atšķirības starp šiem diviem ekotipiem, iespējams, varētu būt saistītas ar pielāgošanos augšanas apstākļiem, respektīvi, paaugstinātam ūdens līmenim, barības vielām, gaismai, kā arī ar dažādām mikorizas sēņu sugām, kā tas jau iepriekš minēts arī citu autoru darbos (Taylor and Bruns 1999; Bidartondo et al. 2004). Dendrogramma (15.att.), kurā parādīta visu analizēto augu ģenētiskā daudzveidība, raksturo *L. loeselii* Latvijas populācijas iekšējo ģenētisko struktūru.



15.attēls. Dendrogramma *Liparis loeselii* ģenētiskās struktūras izvērtēšanai populācijas iekšienē: A–Engures Orhideju taka (OT); B–Engure; C–Kaņiera ezers; D–Kaņiera ez. dabas taka (NT); E–“Šalkas” grants karjers; F–Silabebru ezers; G–Būšnieku ezers; H–Dreimaņu ezera pussala; J–Pēterezera viga.

Apkopojot dendrogrammā (15.att.) iegūtos rezultātus, nav novērojama paraugu grupēšanās atbilstoši to ievākšanas vietām. Dendrogrammā redzami divi lieli, samērā nošķirti klāsteru grupas atzarojumi un četras mazākas grupas, no kurām divi atzari ir atsevišķi atdalīti (D1–Kaņieris NT, J2 –Pēterezera viga) un šīs atradnes atrodas ģeogrāfiski attāli nošķirtas. Vēl ir izdalāms neliels klāstera apakšzars ar zemu strukturizāciju, kurā apvienoti savstarpēji līdzīgi *L. loeselii* indivīdi no dažādām atradnēm (Kaņiera ez. un „Šalkas”), kuras veidojušās bijušajās grants ieguves vietās. No tā izriet, ka *L. loeselii* populācijas iekšējā ģenētiskā daudzveidība vai augu ģenētiskā līdzība, iespējams, ir saistīta ar populācijas vecumu un augšanas apstākļiem. Piemēram, paraugu ņemšanas vietā grants karjerā „Šalkas” var izskaidrot ar to, ka biotops sācis veidoties no 1994. gada, kad izveidota grants ieguve un *L. loeselii* samērā ātri izplatījies pa visu, augšanai piemērotās grants karjera teritorijas daļu. Veģetācija raksturojas ar relatīvi zemu daudzgadīgo zālāju ar dominējošo sugu *Equisetum variegatum* [VIII; Tab.5]. *L. loeselii* polimorfisms tika konstatēts Būšnieku ezera un Kaņiera NT atradnēs, kuras ir nesen izveidojušās dabiskās sukcesijas rezultātā, ko izraisīja ezera aizaugšana un purva veidošanās šajās augtenēs. Veģetācija sastāv no daudzgadīgajiem augiem ar augstu vasas daļu, bet šo sugu daudzums pagaidām pieļauj *L. loeselii* populāciju eksistenci šajos biotopos. „Šalku” grants karjera atradnē augošajai *L. Loeselii* populācijai šobrīd ir optimāli augšanas apstākļi, un kā norāda arī citi autori, šādos apstākļos nav izteikta starpsugu konkurence, kas radītu papildus stresu (Rasmussen 1995; McMaster 2001; Pillon et al. 2007). Kopumā mēs varētu pieņemt hipotēzi, ka *L. loeselii* augi no dažādām Latvijas atradnēm ir ģenētiski līdzīgi. Lai

pārliciecināmi izvērtētu iegūtos rezultātus, nepieciešami tālāki pētījumi, iekļaujot jaunus *L. loeselii* biotopus un palielinot analizējamo paraugu skaitu.

SECINĀJUMI

- ❖ Eksperimentāli izstrādāta metodika orhideju ievadīšanai *in vitro* kultūrās sešām no astoņām pētītajām sugām: *Dactylorhiza baltica*, *D. fuchsii*, *D. russowii*, *D. ochroleuca*, *Liparis. loeselii*, *Cypripedium calceolus*.
- ❖ Pētījumos noskaidrots, ka nepieciešamais ķīmisko vielu kvalitatīvais un kvantitatīvais saturs augšanas un attīstības nodrošināšanai *in vitro* atšķiras gan katrai orhideju sugai, gan arī vienas sugas robežās atkarībā no augšanas un attīstības fāzes.
- ❖ Nekrožu novēršanai būtiska nozīme ir Ca glukonāta pievienošanai *Dactylorhiza* ģints sugu kultivēšanas barotnēm: vienreizēja paaugstināta Ca deva ($2,28\text{mg.L}^{-1}$) saglabāja pēciedarbību, radot iespēju kultivēt orhidejas citokinīnu klātbūtnē.
- ❖ Optimālākais variants aklimatizācijai *ex vitro* mūsu pētījumos ar *Dactylorhiza baltica* bija augiem, kas eksponēti pazeminātā temperatūrā (5°C) un tumsā piecus mēnešus: atsevišķi augi uzziedēja jau gadu pēc izstādīšanas NBD teritorijā visos eksperimentālajos stādījumos.
- ❖ *In vitro* iegūtie *Dactylorhiza baltica* augi pēc izstādīšanas visos substrātu variantos bija kolonizējušies ar simbiotiskajiem mikroorganismiem, kas nodrošināja to izdzīvošanu *ex vitro* apstākļos.
- ❖ *Liparis loeselii* augstas koncentrācijas un kvalitatīva DNS produkta iegūšanai ir piemērota modificētā Friar (2005) metode ar DNS divkārtšo izgulsnēšanu.
- ❖ *Liparis loeselii* populācijā konstatētā ģenētiskā daudzveidība nav saistīta ar paraugu augšanas atrašanās vietu. Konstatēta iespējama saistība starp augu ģenētisko līdzību un to augšanu līdzīgos augšanas apstākļos.
- ❖ Pētījumi, kas ietver orhideju asimbiotisko diedzēšanu, audzēšanu un pavairošanu, kā arī aklimatizāciju *ex vitro*, parāda, ka *in vitro* metodes ir būtiskas orhideju sugu iespējamai reintrodukcijai dabā - sugu daudzveidības saglabāšanai.

PATEICĪBAS

Vislielākā mana patīcība veltīta promocijas darba vadītājai Dr.biol. **Guntai Jakobsonai**, kura devusi lielu ieguldījumu manā promocijas darba vadīšanā, apmācībā un zinātniskajā darbībā.

Esmu ļoti pateicīga Nacionālā Botāniskā Dārza kolektīvam par sapratni un atbalstu, īpaši mūsu Augu bioloģiskās daudzveidības *in vitro* saglabāšanas nodaļas kolēģēm, personīgi Dr.biol. **Dacei Kļaviņai** un Dr.biol. **Dacei Megrei** par sadarbību un atbalstu. Īpašs paldies **Dainai Rozei** par sadarbību un ekspedīcijām. Liels paldies Viļņas Universitātes Botāniskā dārza kolēģei Dr.biol. **Stasei Dapkūnienei** par sadarbību.

Vislielāko pateicību veltu arī Bioloģijas Institūta Augu Ģenētikas Laboratorijas kolektīvam. Īpašs paldies Dr. habil. biol., prof. **Īzakam Rašalam** un Dr.biol **Dacei Graudai** par apmācību, sadarbību un doto iespēju veikt molekulārās analīzes. Mīļš paldies **Aijai Auziņai**,

Reinim Ornicānam un kursa biedrenēm **Litai Lapiņai** un **Andrai Miķelsonei** par atbalstu molekulāro analīžu veikšanā un konsultācijām.

Sirsnīgs paldies LU BF zinātniskā grāda pretendentei **Līgai Strazdiņai** par atbalstu un konsultācijām datu matemātiskā apstrādē un analizēšanā.

Vislielākais paldies manai angļu valodas pasniedzējai **Norai Kalnačai** par vairāku gadu apmācību, milzīgo izturību, apzinoties cik grūti ir pārmācīt manas vācu valodas iemaņas, par viņas atbalstu promocijas darba tapšanā un par konsultācijas nodarbībām doktorantūras studiju laikā.

Liels paldies Daugavpils Universitātei par dotajām iespējām un atbalstu, īpaši pateicos SBI direktorei Dr.biol., asoc.prof. **Inesei Kokinai** un visam kolektīvam par atsaucību un iespēju izmantot laboratorijas aprīkojumu sava darba ģenētikas sadaļas izstrādāšanā.

Mīļš paldies manai vislabākajai draudzenei **Anitai Cišai** par sniegto morālo atbalstu, īstajā brīdī uzmundrinošiem padomiem un rūpēm, un paldies ģimenei par sapratni.

Esmu pateicīga ikvienam ar kuru man bija iespēja tikties mācību un darba jomā vai kontaktēties zinātnisko konferenču laikā, kaut vai sadarbojoties īslaicīgi, bet esmu no tā visa guvusi milzīgu zināšanu mantojumu un pozitīvu pieredzi – Paldies VISIEM!

DAUGAVPILS UNIVERSITY



Inta Belogradova

Summary of the Doctoral Thesis

**BIOLOGICAL PARTICULARITY OF RARE AND
ENDANGERED ORCHID SPECIES OF LATVIA
*IN SITU AND IN VITRO***

Promotion for obtaining the doctoral degree in Biology
Subdiscipline: Ecology

Supervisor: Dr.biol. **G. Jakobsons**

Consultant of genetic studies:
Dr.biol. **Dace Grauda**

Daugavpils, 2012

The doctoral thesis was prepared at the Department of National Botanic Garden of Latvia from 2008. to 2011. Genetic studies was carried at the Institute of biology, University of Latvia in 2010. and 2012.



NATIONAL BOTANIC GARDEN



Institute of Biology, University of Latvia



IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ

This work has been supported by the European Social Fund within the Project
«Support for the implementation of doctoral studies at Daugavpils University»
Agreement Nr. 2009/0140/1DP/1.1.2.1.2/09/IPIA/VIAA/015

Partial payment with EU ESF.

Study program of Biology, subdiscipline Ekology

Supervisor: Dr.biol. **G. Jakobsons**, Nacional botanic garden

Consultant of genetic studies: Dr.biol. **Dace Grauda**, Institute of Biology

Official Reviewers:

Dr.biol. **Sigita Jurkoniene**, Institute of Botany, Laboratory of Plant Physiology, Nature Research Centre, Vilnius, Lithuania; sigita.jurkoniene@botanika.lt

Dr.biol., asoc.prof. **Inese Kokina**, Daugavpils University, inese.kikuma@biology.lv

Dr. biol. **Jevgenija Nečajeva**, University of Latvia, Department of Plant physiology
Sb20025@lu.lv

The thesis will be defended at the public session of the Doctoral Committee of Biology, Daugavpils University, at 12:00 on December 5, 2012, 13 Vienības Str., auditorium 311.

Doctoral thesis is available at the Library of Daugavpils University, 1/3 Saules Str., Daugavpils and electronic:

http://du.lv/zinatne/promocija/aizstavesanai_iesniegtie_promocijas_darbi

Head of the Promotion Council : Dr.biol., prof. **Arvīds Barševskis**

Comments are welcome to secretary of Promotion Council : Mg. Biol. Jana Paidere, e-mail: jana.paidere@du.lv
mob. 26002593

ISBN 978-9984-694-8

Inta Belogradova, 2012

CONTENS

TERMS AND NOMENCLATURE.....	46
INTRODUCTION.....	46
1. LITERATURE REVIEW.....	49
2. MATERIAL AND METODS.....	53
2.1. Materials.....	53
2.2. Research methods.....	53
2.2.1. Investigations <i>in situ</i> [I; II; V; VI].....	53
2.2.2 Investigations <i>in vitro</i> . [I; II; III; IV; V]	54
2.2.3. Acclimatization <i>ex vitro</i> [V].....	56
2.2.4. Mycorrhiza investigations [III;V].....	56
2.2.5. Detection of <i>Liparis loeselii</i> genetic diversity [VII; VIII].....	57
3. RESULTS AND DISKUSION.....	59
3.1. Research <i>in situ</i> [I; II; VI].....	59
3.2. Research <i>in vitro</i> [I; II; III; IV; V].....	61
3.3. Acclimatization of regenerants <i>ex vitro</i> [V].....	69
3.4. Formation of mycorrhiza in acclimatized plants of <i>Dactylorhiza baltica</i> [III;V].....	74
3.5. The genetic diversity of <i>Liparis loeselii</i> populations in different habitats of Latvia [VII; VIII].....	75
CONCLUSIONS.....	78
ACKNOWLEDGEMENTS.....	82
LIST OF REFERENCES.....	82

Organisations:

Ministry of Environmental Protection and regional development, s/a “National botanic garden” – NBG, Department of Plant Biological Diversity *In Vitro* Conservation.

Institute of Biology at the University of Latvia – LU BI, Plants Genetics Laboratory

Time and place of work doctoral thesis

The Doctorate paper was worked out and the results were analysed in NBG Department of Plant Biological Diversity *In Vitro* Conservation from 2008 to 2011. The genetic research was done in Plants Genetics Laboratory of LU BI in 2010 and 2012. The usage of technical equipment (Thermo Nanodrop 1000) in 2010 to detect the DNA quality was performed in the SBI Biotechnological Laboratory at Daugavpils University.

The research of mycorrhiza was done in 2008 cooperation with the Department of Plant Physiology at the University of Latvia.

Terms and nomenclature

NBG - National Botanic Garden
DU – Daugavpils University
LU BI – Institute of Biology of University of Latvia
ABA – Abscisic acid
ACE –4.5 % of Cl disinfectant solution
AFLPs – Amplified fragment length polymorphism
AC – activated charcoal
BAP – 6-Benzylaminopurine
C - carbon
Ca – calcium
CTAB – cetyltrimethylammonium bromide
DNA – Desoxyribonucleic acid
IAA - β - Indoleacetic acid

IRAP - Inter – retrotransposon amplifid polymorphism
OT – Orchid Trail
PVP- 40 – polyvinilpyrrolidone
PCR- Polimerase chain reaction
RAPD – Random amplified polymorphic DNA
LTR – Long Terminal Repeats
MT - meta-Topoline
N – nitrogen
NT – Natural Trail
NAA - α -Naphthaleneacetic acid
YE – Yeast extract
RNA – Ribonucleic acid
SSR - Simple sequece repeat
TTH – 2, 3, 5 triphenyltetrazolium chloride

INTRODUCTION

Importance of studies

One of the most endangered plant families not only in Latvia, but also in other countries in the world is wild orchid family (Orchidaceae). 26 orchid species of the 32 growing in Latvia have been recommended for protection and included in Latvian Red Book (Andrušaitis 2003), as well as 25 of them are protected by the national legislation of Latvia. In Europe, the orchid species protection is set by EU Directive 92/43/EEC on the conservation of natural habitats and of wild fauna and flora. Attributing the category of danger and the requirements by legislation is just a part of species protection preventive events, but they do not solve the question of real protection of these species. Therefore besides setting the status of protective territories for natural habitats of endangered species, that is, *in situ*, it is necessary to protect them also in closed territories *ex situ* – plantings in botanic gardens and also in laboratory conditions *in vitro*, creating the taxa bank that is,

outside their natural habitat. For especially rare and endangered species the *ex situ* methods are most often the only ones, which can provide their existence outside the natural habitats and conservation of biological diversity. These methods on the whole will help to create the taxa bank not only within the state, but also it will give the opportunity to cooperate in this field with specialists from the Baltic countries, as well as to develop the cooperation in the world scale. According to the International Botanical Garden Programme of plant protection (BGCI 2000), botanic gardens participate in the planning of national strategies of biological diversity, investigate and provide the plant species preservation *ex situ*. If subtropical and tropical orchid species are comparatively easy to cultivate *in vitro* (Department of Plant Biological Diversity *in vitro* Conservation, NBG data, late 1980-s, early 1990-s), then terrestrial orchids each needs specific cultivation conditions *in vitro*. The introduction of Latvian wild orchid species *in vitro* culture is connected with the ensuring of asymbiotic germination (orchid seeds germinate only at the presence of symbiotic microorganisms), which additionally complicates the seed germination process. Therefore *in vitro* must replace all set of conditions, which is provided in nature by symbionts. Mycorrhiza is essential also in all orchid development processes in the soil (Rasmussen 1995; Weston et al. 2000 u.c.). This, in its turn, creates the necessity of biological research of the species, especially in the solution of methodological questions in aseptic conditions. Besides, the very minute orchid seeds do not have endosperm and the embryo consists of a few cells. This means that the seed has minimum adsorptive surface, which can essentially affect seed germination (Rasmussen 1995). Morphogenetic research in the initial development stages in natural conditions is not practically possible; therefore *in vitro* methods give the opportunity to follow this development stage, beginning with the seed germination until the development of the first over ground shoot, which depending on the species can last for several years. Detailed biological research of orchid species in Latvia has not been done. For the first time in Latvia, the research of wild orchids *in vitro* were started in 2006 in NBG Department of Plant Biological Diversity *in vitro* Conservation within the project of Latvian Council of Science.

For the understanding of species vitality, very important is the inner genetic structure of species, which is one of the types of adjustability for living in the changing environment. Such investigations of *Liparis loeselii* have been done in several countries: Germany, England, NW France, Poland, Canada, the USA, etc. (Lande 1988; Vos et al.1995; Hedrick, Kalinowski 2000; Pillon et al. 2007, Rolfsmeier 1993, etc.). The population of *L. loeselii* in Latvia has not been researched in this aspect. Therefore the knowledge about the genetic diversity of the species and its structure is a necessary precondition for the workout of further species conservation strategy (Lande 1988).

Novelty of the research

- This doctoral thesis did detailed biological research of wild orchids for the first time in Latvia, because each orchid species has its own very specific requirements for growth and development ensuring in sterile conditions. In NBG, *in vitro* cultures were studied six orchids species in different development stages.
- There was approbated tetrazolium test (TTH) method for Latvian wild orchid species seeds to test embryos vitality what is necessary for evaluating the testing initial media.
- *In vitro* obtained plants were acclimatized in experimental plantations in the territory of NBG. Successful process of acclimatization was connected not only with environmental conditions, but also with colonisation with symbionts.
- Genetic research of *Liparis loeselii* has been started for the first time in Latvia, using the world newest molecular methods - retrotransposon markers based (IRAP) molecular method (Kalendar et al. 2010) to detect the genetic diversity of eight habitats in Latvia.

The main theses put forward for defence

1. The necessary prescription of culture media for growth and development of orchids *in vitro* differs both for each orchid species and within one species depending on the stage of development.
2. The media for germination *in vitro* must contain chemical compounds, which are ensured in nature by symbiotic fungi.
3. The successful acclimatization of plants acquired *in vitro* depends on culture media and exposition in lowered temperature before transplanting in soil *ex vitro*.
4. *Liparis loeselii* population of Latvia is genetically diverse and IRAP method is appropriate for genetic diversity analysis of *L. loeselii* research.
5. Orchid biology research creates the opportunity to create the taxa bank *ex situ*, i.e. *in vitro* and in expositions in botanic gardens, what serves as an essential additional guarantee for conservation of species' diversity.

The aim of study

Biological research of rare and endangered orchid species in Latvia, to realise the protection of these species and conservation of biological diversity using *in vitro* methods.

The main tasks of the research:

1. Inspect the orchid populations *in situ*.
2. Collect orchid seeds from different habitats and do embryo vitality test (TTH) before the sowing *in vitro*.
3. Elaborate *in vitro* methods what ensured orchid germination, growth and vegetative development to preserve biological diversity of orchid species *ex situ*.

4. Start acclimatization experiments to create the plantations of *in vitro* obtained orchids in the botanic garden and detect their root colonisation with symbiotic fungi.
5. Modify DNA method to acquire qualitative DNA product of rare orchid species *Liparis loeselii* and make PCR based universal IRAP retrotransposon primer choice to detect genetic diversity of population of *L. loeselii*.

Research specificity

International programme about plant protection in botanical gardens (BGCI, 2000) was worked out basing on Rio de Janeiro Convention of biological diversity (CBD). Latvia has accepted the Rio Convention as the base for long-term strategy in the conservation of biological diversity in Botanical Gardens. In 2010 in Nagoya (Japan), there was accepted a new updated strategy in conservation of biological diversity. Latvia is one of 180 countries, which are included in this process. Long-term plan provides that by 2020 at least 75% of the endangered species will have been ensured with conservation in *ex situ* collections.

Wild flora protection in Latvia is regulated by the national system of laws and regulations. The protective status of a species in laws and regulations of Latvia is stated by the rarity and danger of the species both in national and EU level. National laws and regulations of Latvia have worked in and therefore binding to them requirements of EU directives and regulations. In EU level the orchid species protection is set by EU Directive 92/43/EEC on the conservation of natural habitats and of wild fauna and flora. The requirements of the Directive have been included in the national legislation of Latvia. Only non-harmful methods to the species or its habitat were used in this study, observing the requirements of the national legislation of Latvia. The *in vitro* plants of *Dactylorchiza baltica* obtained from collection in NBG were used in physiological studies, which require large quantities of individuals.

1. LITERATURE REVIEW

Characteristics of the orchid family

In the world the Orchidaceae Juss. family is one of the biggest with more than 30000 species (Buttler 2007). The 32 orchid species found in Latvia grow in bogs, wet meadows, forests, also in slopes of ditches; separate species – in dune sands (Andrusaitis 2003). The fruit is capsule which contains about 3 to 4 million seeds. Orchids are characterised by long development cycle (Cepurīte 2005). For example, it takes 6 – 10 years for *Cypripedium calceolus* to grow until flowering (Kober 1972; Fast 1974); clone of this species can live for many years due to rootstocks (Kull 1988). Orchids can propagate both in vegetative and generative ways. Vegetative way is used only by those species which have rhizomes (Buttler 2007). Orchids can have both cross-pollination and self-pollination. Orchid pollination research includes a whole scientific field which in general characterises exactly the orchid genera and what is specific to each particular species separately (*O. insectifera*, *C. calceolus*

etc.), which has been described in detail in publications (Van der Pijl, Dadson, 1996). For example, the flower of *O. insectifera* imitates fully developed female of wasp species *Argogorytes mystaceus* L. or *A. fargei* and extracts pheromones, as the result of which the male wasp *Argogorytes mystaceus* L. does pseudocopulation and pollinates (Faegri, Van der Pijl 1982). Orchid seeds are very minute, dusty, without endosperm. Seeds sizes in the literature are indicated as 0.07 to 0.40 mm wide and from 0.11 to 1.97 mm long, depending on the species. Seed germination needs the presence of symbiotic fungi. Waterproof seed-coat allows the seeds to be in the soil for longer time in intact condition. Seed-coats for their structure can be divided in three types: 1) which after seed ripening are able to soak up water; 2) waterproof seed-coats with lipid layer; 3) waterproof seed-coats with “carapace” which contain cutine, different polysaccharides and suberine. To achieve the germination of the orchid species whose seed-coats contain “carapace” is a big problem. It is important to note that there exists the gradation of germination conditions in the requirements for certain conditions among different seeds of one and the same species (Rasmussen 1995).

Symbiosis

We must notice that in autumn there is formed significantly more biomass (fallen leaves, faded grass *etc.*). In early winter there is a significant stimulation of fungal activity which in total creates important preconditions for the mycotrophic sprout to start its development (Rasmussen 1995). In the germination and protocorm stage the plants receive from the fungi N, P and C, as well as water, whereas adult plants supply the fungi with C, because they start photosynthesis (Dearnaley 2007; Gebauer, Meyer 2003; Trudell et al. 2003). Fungi can also be as the mediator between the orchid and the tree, getting from the tree the substances necessary for them and the tree species must be suitable for being the host plant. (McKendrick et al. 2000, Dearnaley 2007; Kottke, Chacón 2009).

Asymbiotic germination in sterile cultures

Seeds must change from protein storing phase to protein mobilisation or germination (Rasmussen 1995). Further, it is necessary to clarify the factors which prevent and which promote seed germination in sterile conditions. Researchers consider that the lowered temperature obviously activates metabolic systems, which are responsible for organogenesis in the sprouts. It is considered that lowered temperature decreases the amount of free abscisic acid (ABA) and increases the amount of endogenous cytokinins in the embryo cells. It is thought that in nature the seed germination is prevented by ABS which is placed in the seed-coat. If the sprouts are small, it is necessary to have such vitamins as pantothen acid, thiamine and pyridoxine (Rasmussen 1995). Liquid media can promote the seed-coat turgescence and absorption of nutrient elements. Besides, soaking provides washing the inhibitory substances out of the seed-coat. For the germination process the source of N is very important. Some orchid species germination does not necessarily need non-organic

nitrogen, but for some others it even prevents germination. Specific organic combinations which are usually used in orchid media, as yeast extract and peptone, have indefinite components (Dijk 1988). Detection of organic additives in media is complicated and depends on several factors, because thermal processing (autoclaving) can change their contents. It means that some amino acids which are present in the contents of yeast extract are very essential for orchid germination and they are synthesized neither by the germ, nor by symbionts. Germination effectiveness depends also on that, what kind of inner resources and features the seeds have. However, it has not yet been detected, which exactly components are the ones that replace mycorrhiza in asymbiotic cultures. Besides, there exist differences for each seed population and even for each seed's requirements to chemical reagents (Rasmussen 1995). In nature the first development stage of orchids (2–4–10 years) takes place in the soil, that is, in conditions in which photosynthesis is not possible and together with that also the admission of carbon. Not sufficiently investigated is the influence of Ca^{2+} on the orchid germination. Ca^{2+} makes a special interest because many of European orchids grow in calcareous soil. This ion has some influence on cell membrane features and it interacts with different growth regulators, especially with cytokinins (George et al. 1988). Modifying orchid mediums, there is a tendency to decrease the amount of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ from 1000 mg.L^{-1} to less than 100 mg.L^{-1} . There are prescriptions where non-organic Ca^{2+} is not added at all. Andersons (1990) adds a little of Ca^{2+} with Ca pantothenate to Luck medium. Hypothetically we could conclude that asymbiotic germination uses particularly low concentrations of Ca^{2+} , to increase the cell membrane penetrability also for calciphil species to support their germination because in nature it is ensured by symbionts. On the whole we can say that there is quite a lot of contradictory information about creating the germination conditions *in vitro* cultures, but there are very few published data about further cultivation processes *in vitro* for European wild orchid species.

Provision of cultivation conditions

For orchid cultivation there are often used organic additives, such as peptone, coconut milk, potato broth, pineapple juice, fresh beer yeast etc. But in cases when we cannot set the substance to be added and its dosage exactly, these complex organic compounds can give the opportunity to provide orchid vitality and development *in vitro*. In experiments with *Dactylorhiza* genus species to induce the differentiation of pseudobulb, there was used the combination of BAP and NAA (Wotavová-Novotná et al. 2007). Growing *in vitro* gives the opportunity to follow each orchid development phase and control the conditions of outer environment: contents of nutrients, temperature, light intensity and the length of light-darkness regime (Cherevchenko et al. 2008).

Acclimatisation for *ex vitro* conditions

There are few literature data about the acclimatisation of wild orchid species acquired *in vitro* for *ex vitro* conditions. In investigations about *Cephalanthera falcata* acclimatisation *ex vitro* (Yamato, Iwase 2008), the plants acquired *in vitro* after planting in the substrate were incubated in the temperature of 4 °C for 6 months. After this incubation the plants were planted in nature. In one year 44,4 % of plants had developed shoots and some individuals had flowered. In five years low vitality percentage was stated – only 3 %. Authors explain this fact mainly with the problems of symbiosis formation (Smith et al. 1997).

Genetic research

L. loeselii is considered to be self-pollinated plant (Van der Pilj, Dodson 1966; Rolfsmeier 2007), but others researchers described different opinions– self-pollinated ever crosspollination (Catling 1980). Therefore good knowledge about the species genetic diversity and its structure is a necessary prerequisite to preserve the species because it reflects the condition and species vitality potential (Lande 1988). Genetic diversity and structure of these species in northwest France and the United Kingdom were researched by using Amplified genome fragment length polymorphism (AFLPs). The results of this research showed that even geographically distant populations could be similar. Recently made multilocus markers (AFLPs) intensify the fragment length polymorphism (Vos et al.1995), which have already testified their usability in population genetics, for rare or endangered species (Juan et al 2004; Travis et al.1996). Great genome of *L. loeselii* does not allow doing the genetic research of this species successfully, using such widely known DNA microsatellite markers as RAPD, AFLP, SSR. Therefore several authors as an alternative recommend using plasmid (mitochondrion, chloroplast) markers. For orchid analysis there is also used the sequencing of separate DNA gene regions, but it is a restricted because of high expenses, therefore there are used universal retrotransposon markers developed in 2010. Universal retrotransposon markers differ from other kinds of markers, because they are usually dispersed in genome, therefore it is the base of retrotransposon usage in the detection of orchid species genetic diversity (Schulman 2007). Retrotransposon class, depending on if the mobile genetic element in both sides of its sequence contains equally long terminal repeats (LTR), is divided into two sub-classes: retrotransposons containing LTR and retrotransposons non-containing LTR (Kubis et al.1998; Benetzen 2000; Turcotte et al. 2001; Queen et al. 2004; Sangeeta 2010; Ragupathy et al. 2010). LTR containing retrotransposons themselves encode the reverse transcriptase and integrase, and endonuclease (for example, RN-ase). Such replication mechanism is similar to retroviruses with the difference that retrotransposons do not form infectious structures which, when leaving the cell, infect other cells (Havecker et al. 2004). Retrotransposons move around the genome using intermediate products of RNA, which with the help of reverse transcriptase

before integration into the genome is transcribed to DNA (Turcotte et al. 2001; Miller 2004). With such way of retrotransposon replication it is possible to multiply DNS material, significantly increasing genome. For isolating the DNA out of plants with high metabolic contents, the most suitable has been claimed the method by Frier (2005) and methods for DNA isolation (Zimmer, Roalson 2005).

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials

Rare and endangered orchid species from *Dactylorhiza*, *Liparis*, *Ophrys* and *Cypripedium* genera were selected for this study. Within the scientific research in the period from 2007 to 2011 there were made expeditions in different regions of Latvia, and there were inspected seventeen wild orchid findings or near Lake Būšnieki near “Ovīši”, eastern shore of Lake Engure near Lepste, Orchid Trail in Lake Engure nature protected area (two findings), bog Pēterezers in Slītere preserve, bog Jaunciems in Ances bog and forest protected area, Lake Silabebri near Ļaudona, Lake Svētes on Dreimaņi peninsula in Krustkalni nature preserve, „Šalku” gravel-pit near Ainaži, Ķemeri national park (three findings around Lake Kaņieris), nature protected area by Lake Pape near Brušvīti, east shore of Lake Tosmāre and in bog Baltezers near Brocēni.

In total, eight orchid taxa were used in this research: *Dactylorhiza baltica* (Klinge) N. I. Orlova; *Dactylorhiza fuchsii* (Druce) Soó; *Dactylorhiza russowii* (Klinge) Holub; *Dactylorhiza incarnata* subsp. *incarnata* (L.) Soó; *Dactylorhiza ochroleuca* (Wüstnei ex Boll) Holub, which by some botanists is characterised as a separate species, but the others call it *D. incarnata* subsp. *ochroleuca* (Wüstnei ex Boll) P.F. Hunt et Summerh.; *Liparis loeselii* (L.) Rich; *Ophrys insectifera* (L.); *Cypripedium calceolus* (L.).

Dactylorhiza baltica was selected as the modelling species in physiological study *in vitro*, because already from the seeds of *D. baltica* sown in 2007 there were got *in vitro* plants in sufficient amount to be able to do series of experiments. In comparison with other species, this species in the Baltic region is found more often; in most of cases it grows as separate individuals or in small numbers, very rich findings have been found more rarely (Kuusk et al. 2003). Latvia is the richest region of this species distribution in the temperate zone of Europe (Tutin et al. 1980).

2.2. Research methods

2.2.1. Investigations *in situ* [I; II; V; VI]

In the eastern part of Lake Engure near Lepste there are marked fields (findings in their natural borders) for fields investigations in two rare orchid species – *Ophrys insectifera* 28m² (57° 17.190N, 23° 09.032E) and *Liparis loeselii* 19m² (57° 17.175N, 023° 08.991E), in which during 2008 – 2011 there was done counting of flowers, capsules and fixing the morphological data of plants, observed particular plants, to selectively collect the seed

material for sowing *in vitro*. Besides from the orchids growing *in situ*, the seeds from NBG collection were sampled for this study.

2.2.2 Investigations *in vitro*

Embryo vitality test [IV]

There were during expeditions observed distinct differences in seed ripening times among populations in different regions of Latvia. To detect seed germination vitality, there was approbated a test with 1% TTH (Dixon et al. 2003) and the embryo vitality in seeds of eight species was detected. Exposition time with TTH + Tween 20 24h in 30⁰C temperature, darkness, as a result TTH coloured the vital embryos in brownish-red colour.

Different literature sources tell that for doing this test there are used different seed sterilisation agents: natrium hypochloride (NaOCl) or calcium hypochloride (Ca(OCl)₂) (Van Waes, Debergh 1986). Seed vitality was detected in this test by using a modification of this method: the first processing liquid mentioned in the method was replaced by Cl⁻ containing household disinfection liquid ACE in concentrated or dissolved with distilled water 1:2. Exposition time– 7, 10, 15, 20 and 25 minutes. Experimentally there was specified the most optimal seed coat decolourised time and the liquid concentration for different orchid species to preserve the seed germination in the most extent. After decolourization the seeds were rinsed in filter paper discs 3 times in sterilised distilled water each time for 5min, but in the fourth rinsing time they were left to soak for two hours. The acquired samples for result assessment were looked under the microscope, calculated vital embryos which were coloured in brownish-red colour, and estimated percentage of embryo vitality in correlation with total number of seeds in the selected vision sector. There was used microscope Carl Zeiss – SteREO Discovery V8, which was equipped with digital camera AxioCam Mrc5 for getting pictures, magnifier MБC1 was used to count the vital embryos.

Seed sterilisation and sowing *in vitro* [I; II; III; IV]

Partly ripe seeds were used for seeding in sterile cultures in different stages of readiness (white seeds, not separated from placenta; white seeds, dry; cream to brown colour seeds) and fully ripe seeds as well. If seeds were partly ripe and the capsule did not have micro cracks, the capsule was sterilised by soaking in 96% ethanol and burning, because the inner side of a capsule is sterile. The ripe seeds were sterilised with Cl⁻ containing household disinfection liquid ACE in concentrated way or with distilled, sterilised water (1:2); sterilisation time 7–25 minutes. The necessary sterilisation mode for each species seeds was set experimentally. For initial and cultivation media experiments there were used basic media: Fast (1974); Norstog and Van Waes (cited after Rasmussen 1995) and their modifications (NBG laboratory data), which were adapted to different orchid species. The seeds were sowed both on filter paper in test tubes with liquid medium, and on agarised

medium with lowered contents of agar–0.3%. During the time, the liquid medium was added by a separately prepared medium, but in the second variant on the agarised there was dropped liquid medium for ensuring the wetness. If the seeds were partial mature and capsule has not micro-crack, that sterilisation by soaking in 96% ethanol and burning, because inside of capsule is sterile. Fully ripe seeds were sterilised in folded filter paper discs, rinsed 4–5 times in sterile distilled water (leaving in the last rinsing for 2h). Open sterile filter paper discs were put in cultivation vessels on agarised medium surface, in sterile conditions, periodically adding liquid with different organic substances to promote germination.

Cultivation *in vitro* [II; III; V]

Cultivation vessels with sowed seeds were put in darkness at 23–25°C. When the seeds germinated and protocorms reached approximately 1–2mm in diameter, they were re-planted on cultivation media and put in darkness again. Every week the sowings *in vitro* were checked to detect the germinated individuals, regularly replacing the new plants on new medium according to their development stage, as well as in necessity (media drying out by the time) to add the substances with liquid medium. When the sprouts develop roots, cultivation vessels were put into light camera with daylight lamps in light-darkness mode (16h light/8h darkness). We have select the visually biggest and strongest plants and have put in darkness mode in cold camera at 5°C; maximum exposition time up to 5 months.

To state the influence of medium additives on the plant development, there was done a series of experiments, as the basic media using Fast (1974) (A variants) and Van Waes (cited after Rasmussen 1995) (B variants) prescriptions, in total 20 variants, selecting *D. baltica* as the model object:

- YE - 0; 0.5; 1; 1.5 and 2 g.L⁻¹ (A-1) or together with BAP, 0.2 mg.L⁻¹, which was added to each variant with YE (A-2).
- BAP – 0; 0.1; 0.2 and 0.3 mg.L⁻¹ (B-1) or together with IES, 0.05 mg.L⁻¹ (B-2) at each variant with BAP.
- MT 0.1; 0.2 and 0.3 mg.L⁻¹ (B-3).

Experiment lasted for 1.5 months. The results were assessed by such parameters: number of roots, total length of roots, new shoot initiation, medium colouring level (from 1 to 5 points), plant necrosis level (percentage of plant), total plant vitality (from 1 to 5 points). Data were analysed by using SPSS 17 programme. As the data of our experiment do not correspond with the standard SPSS 17 programme division, there were used non-parametric methods. At first, with Kruskal-Wallis test there were compared all sample clusters, of which there were selected those sample clusters that showed essential difference in particular parameters. These selected sample clusters were further analysed with Manna-

Whitney U-test. In the end there was done Pearson correlation assessment to check how the sample clusters differ in a particular parameter – correlate positively or negatively [V].

To prevent plant necroses, which could not have been avoided adding AC to the medium, we started to work out other methods as well, to solve this problem. The first experiments were done with increased Ca^{2+} doses in cultivation media of *D. baltica*, using calcium gluconate monohydrate ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{CaO}_{14} \times \text{H}_2\text{O}$) [V].

2.2.3. Acclimatization *ex vitro* [V]

Acquired regenerates of modelling species of *D. baltica* sowed in 2007 were planted in substrate in May 2009 in 6 different substrate variants and the boxes covered with polythene which prevents wetness vaporisation, were put on shelves under daylight lamps. pH level of all substrates was stabilised to pH 6.8 by chalking.

1. gravel: substrate from the meadow where orchids grow: pine bark mulch (1:1:0.5);
2. substrate No. 1, covered with forest soil from partly decomposed leaves;
3. substrate No. 1, covered with mixture of meadow soil and pine bark mulch (1:1:1);
4. compost of turf and leaves: layer of partly decomposed plant parts under sphagnum (1:3);
5. compost of turf and leaves: layer of partly decomposed plant parts under sphagnum (1:5).
6. compost of turf and leaves: layer of partly decomposed plant parts under sphagnum (1:5).

In variants No.1–5 the plants acquired *in vitro* were planted out of the cultivation room at 23–25°C and in 16h light and 8h darkness mode. In variant No. 6 plants acquired *in vitro* were planted *ex vitro* after being exposed for 5 months at 5°C in darkness.

One month later boxes with plants planted *ex vitro* were moved to open field conditions. Additional fertiliser was not used. Variants (1.3; 2.1; 2.2; 2.3; 3.1; 3.2; 4.1; 4.2; 5.1; 6.1) were assessed in September 2009 (Fig.10) according to the following indicators: number of roots per plant, number of droppers per plant, number of tubers per plant, total weight of plants (g).

The acquired results were processed with PC-ORD 5.0 programme multi-dimension Cluster analysis method. After the assessment the *D. baltica* plants of all 6 acclimatization trial variants acclimatized *ex vitro* in September 2009 were replanted in the territory of NBG in 3 variants: cultivated flowerbed (1), wet meadow on pond shore (2), wet meadow, in which orchids of *Dactylorhiza* genera grow (3). The last two variants were close to *in situ* conditions. In these variants for the plantings the meadow turf layer was turned over, ground, covered with small peat layer. Simultaneously, there were taken samples for soil analyses. In 2010 and 2011 there were inspected plants survived the winter, registered their

amount of survival and characterised the peculiarities of their development in all vegetation period.

2.2.4. Mycorrhiza investigations [III;V]

Mycorrhiza detection method was adopted in 2008, using the samples of *D. fuchsii* roots (8 biological repeats). Samples of *D. baltica* roots (6 biological repeats) were collected from each acclimatization experiment, different substrate variants 5 months after the start of experiment (2009). *D. fuchsii* root samples were fixed with FEE solution – 37% formalin, ice acetic acid, 96% ethanol, distilled water (10:5:50:35, v/v/v/v). At first, fixed FEE samples were gradually dehydrated with solutions of ethanol and terc-buthanol, after that there was done histovax infiltration in them (Ruzin 1999). Anatomic cross-sections (25µm) were done by rotation microtome (Leica RM 2145). Deparaffination was done by solutions of xylene and ethanol and the sections were coloured in the mixture of astra blue and safranine (astra blue 0.5% in acetic acid: safranine in water, 5:1, v/v) (Braune et al. 1999) and toluidine blue (Norriss et al. 1994). After colouring the sections were dehydrated with the solutions of ethanol and xylene and put into Canadian balsam (Ruzin 1999).

To detect root mycorrhiza symbionts of *D. fuchsii* and *D. baltica*, there was used Hayman's (1970) method. At first, root fragments were rinsed in running tap water, and then heated for 1h in 10% KOH solution. After that, roots were rinsed in running tap water and coloured with 0.05% triptane blue colour (5min). Roots were kept in lacto-glycerol (mixture of lactic acid, glycerine and distilled water, 1:1:1, v/v/v). Mycorrhiza intensity (M%) and mycorrhiza structure occurrence frequency (F%) in all root system was calculated using computer programme "Mycocalc" (Trouvelot et al. 1986). The specimen were assessed and photographed by light microscope Leica DM5500B, which was equipped with digital camera Leica DFC490; with camera Canon PowerShot S70.

2.2.5. Detection of *Liparis loeselii* genetic diversity [VII; VIII]

For the genetic analysis, samples of *L. loeselii* (leave parts 10mm x 10mm of leaves without visible insect damage) were collected in June and first week of July, 2010. Totally there were collected 54 samples from 9 different habitats of Latvia (Fig.1)

Leave parts of *L. loeselii* were put into plastic Petri plates in filter paper discs soaked with distilled water and kept cool up to 10°C. Within two to four hours the samples were delivered to LU BI Plant genetics laboratory. Samples were dried in thermostat at 45°C/16h. To protect the dried samples from the room humidity, Petri plates were additionally covered with polythene and kept in darkness at room temperature.

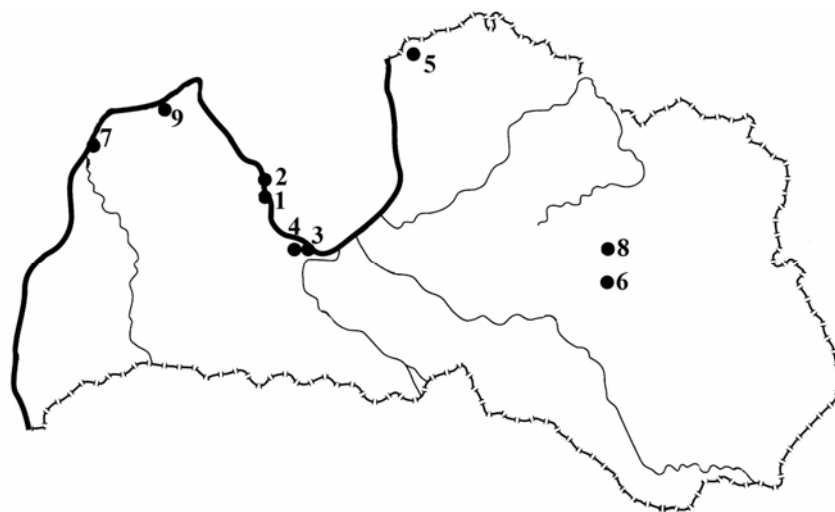


Figure 1. Samples selection places in 2010 for the genetic diversity detection of *Liparis loeselii* population: 1.-Engure Orchid Trail (OT); 2.-Engure; 3.-Lake Kaņieris; 4.-Lake Kaņieris Nature Trail (NT); 5. “Šalkas” gravelpit; 6.- Lake Silabebri; 7.- Lake Būšnieki; 8.- Lake Dreimaņi; 9.- Bog Pēterezers.

There was extracted DNA from dried leaves (51 samples) and from green leaves (3 samples), which were collected in NBG Department of Plant Biological Diversity *in vitro* conservation, taken from *L. loeselii* plants (seeds collected in the finding at bog Pēterezers in Slītere and sowed *in vitro* in 2008). There were done five DNA distinguishing repeats, using two different DNA distinguishing methods - Saghai-Marroof (1984) method and modified Friar (2005) method [VII]. To detect the DNA concentration, there were used two spectrophotometric methods of DNA concentration detection with Thermo Nanodrop -1000 and Ependorf BioPhotometer. To do further analyses, there were selected samples with DNA concentration 6.0–187.0 ng.μL⁻¹ and DNA quality was set with agarose gel electrophoresis method. DNA quality was set with agarose gel electrophoresis method (agarose gel concentration 1.5% and power intensity 70V, time of electrophoresis 1h 30min). Gel was put into 1xTAE buffer liquid float, which previously had been added colour – 20μl ethidium bromide 10% solution, colouring time 40min in stirring mode, after that the samples were put in distilled water float for 10min in stirring mode. Gel was lighted with UV Itec Limited STX-20.M device, which was equipped with digital camera to get the pictures.

To get PCR quality there were selected 18 universal retrotransposons from Kalendar (2010) collections, which in other plant species had shown the highest level of polymorphism. To get the PCR product with Gene Amp® PCR System 9700 device, there was chosen and installed the programme with 30 cycles: denaturation 95°C/3min, which was

followed by 30 cycles repeating consecutively (denaturation 95°C/40s, primer sticking 50°C/40s and elongation 68°C/60s, cycle final elongation 72°C/10min and soaking at 4°C. In each boxes of PCR plate filled with total capacity 25µl: 4µl DNA and 21µl MIX; a control sample box with distilled and deionised (d.d.) water. After performing, the PCR the acquired DNA threads were analysed with agarose gel electrophoresis method, in each PCR plate column to the existing 25µl of PCR product adding 5µl of colouring substance (6x Mass Loading Gel Solution). Agarose gel concentration 3% and power intensity 70V, time of electrophoresis 5h 30min. Gel was put into 1xTAE buffer liquid float, which previously had been added colour – 20µl ethidium bromide 10% solution, colouring time 40min in stirring mode, after that the samples were put in distilled water float for 10min in stirring mode. Gel was lighted with UV Itec Limited STX-20.M device, which was equipped with digital camera to get the pictures. To analyse the populations of *L. loeselii*, there were selected two polymorph primers. The acquired results were analysed with data processing programmes (POPGENE 1.31. and NTSYSpc 2.1) to detect the genetic diversity of *L. loeselii* [VIII].

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Research *in situ* [I; II; V; VI]

In field research there was done inspection of different habitats with the goal to assess the vitality of rare orchid species in different habitats, to get ready for the research *ex situ* and select the most qualitative plants for seed collection to be infused *in vitro* from the different habitats, as well as acquiring material for genetic analyses.

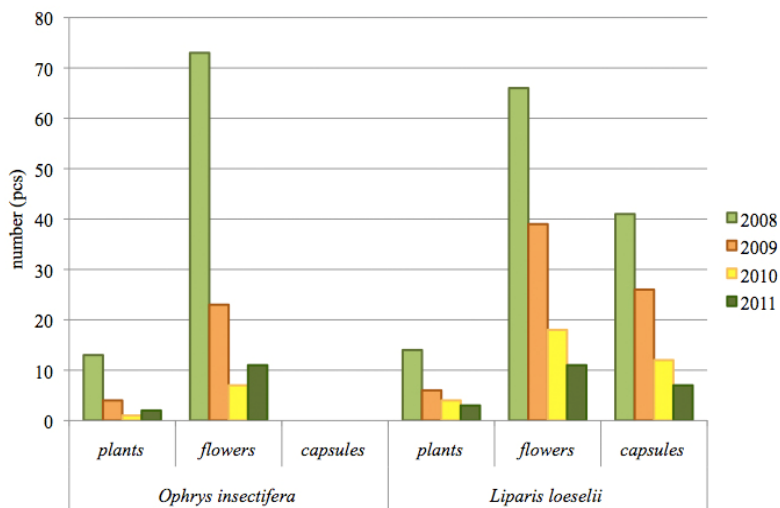


Figure 2. Registration of plants, flowers and mature capsules of *Ophrys insectifera* (Threat category 1) and *Liparis loeselii* (Threat category 3) in orchid deposits in Engure near Lepste.

In the period from 2008 to 2011 in field research in Engure near Lepste the number of registered *O. insectifera* and *L. loeselii* individuals, as well as their flowers and capsules

has rapidly decreased during the years (Fig.2), which could testify of unfavourable influence of environmental factors on orchid species in this habitat (Mark of EU significance protected habitat group – 7230; habitat classifier in Latvia: C.2.1.12.) (Auniņš u.c. 2010). Calcareous fens are especially rich with species, and a rare habitat in Latvia is calcareous fens with *Schoenus ferrugineus* and *Cladium mariscus*, which are found in all three orchid deposits in Engure, and they are especially protected habitats both in Latvia and else in Europe. This type of habitats is usually connected with near springs, and they are characterised by waters rich with minerals and often containing carbonates, which take in also the sand. The vegetation is formed depending on the type of spring water which flows out – rich with iron, calcium or sulphur, and it differs from the rest of the fen territory. Because of the permanently increased level of mist, in the places of probable spring sediments there is also accumulation of peat layer (Pakalne u.c. 2008).

During this period it was observed that species of *O. insectifera* also showed decrease of plants and flowers (Fig.1), capsules began to form, but unlike *L. loeselii* they did not mature, as the over ground parts of the plant necrotised within some weeks getting infected by pathogen microorganisms, which can probably be explained by the increase of rainfall during the seeds maturation period the end of July and early August [VI]. Natural area of the particular species is more connected with Mediterranean coast climate where summers are hot and mostly dry. Until now the danger of *O. insectifera* in the scientific literature has been seen in the context of pollinators (Vandewoestijne et al.2009; Gutowski, 1989; Louis, 1992) and lighting changes (Dorland and Willems 2002; 2006), therefore our research about the impact of climate on this species and the acquired first results must be considered as innovation [VI]. To explain the reasons of *O. insectifera* danger in Latvia in detail, there are necessary the comparisons of these data during the period of several years. Literature sources tell that orchids in novel habitats often colonize more effectively when connected to common mycorrhizal networks, which serve to redistribute nutrients to seedlings and weaker plants (Nara and Hogetsu 2004). Scientists' observations testify that, for example, *C. calceolus* can successful colonise new habitat which has been changed under human economic activities (Shefferson, Kull 2007). Investigations with several orchid species have shown that orchid mutual cooperation with symbionts serves to help the overcoming of plant environment stress (McCormick et al. 2004; Otero et al. 2002; Otero et al. 2004), which helps the plants to adapt the changes of environment conditions (McCormick et al. 2006). Our research with *L. loeselii* it was stated that in “Šalkas” gravel pit near Ainaži the population had successfully colonised the new biotope which had started to form just since 1994, when this gravel deposits was formed. In this particular case we can conclude that the population development can be promoted by all complex of conditions –

sufficient light and wetness, as well as other factors.

3.2. Research *in vitro*

Valuation results of embryo vitality [IV]

Embryo vitality test was started in 2009; it was approbated in the NBG Department of Plant biological diversity *in vitro* conservation and used practically to:

1. Check seed vitality within particular population in years;
2. Do controlling test in laboratory conditions for modified initial media to see their suitability for the particular orchid species.

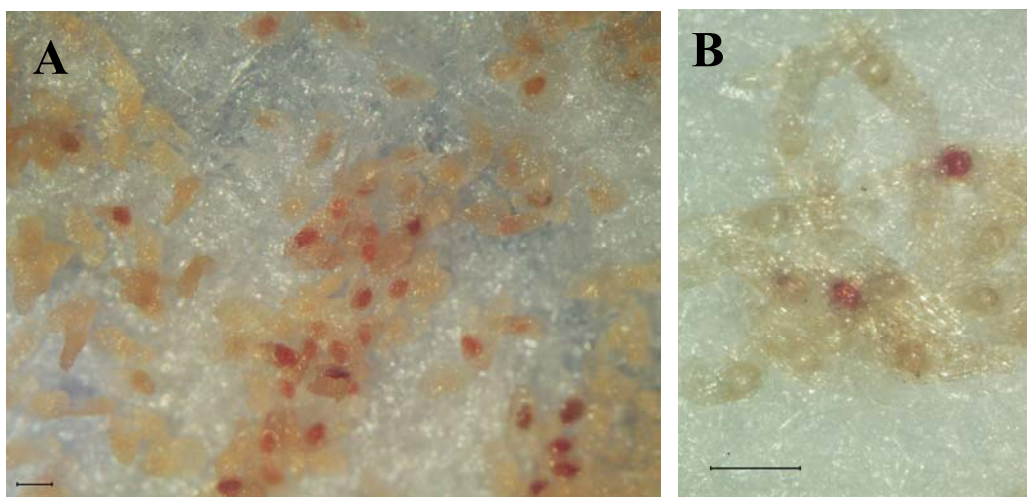


Figure 3. With TTH coloured alive embryos: **A** - *Liparis loeselii* (line segment corresponds to 200 μ m); **B** - *Cypripedium calceolus* (line segment corresponds to 0.5 mm).

Embryo vitality test allowed predicting in advance the probable seed vitality from the particular seed material before sowing *in vitro* (Fig.3). The acquired results testified that embryo vitality in each species differed both by collecting place and time, and by different years. The test served also for seed vitality check: it was stated that seeds of *L. loeselii* which were collected in autumn 2009, being to hold in closed culture vessels at the temperature of 4°C, also after one year had not lost the embryo vitality (30%). To do the TTH test described in the literature, the decolourised time, i.e., length of sterilisation with 5% Ca(OCl)₂ + 1% Tween 80, was different for each species – it varied from 8min to 1h to bleach the seed-coat successfully and the embryo to be still alive. The necessary time of first processing of *C. calceolus* seeds – 25min, for *D. incarnata* - 16 min (Van Waes, Debergh 1986). Our experiment of necessary seed bleaching time, as a result of which the embryos keep their vitality, was using the ACE solution (1:2) for *L. loeselii* 10 min, for *D. ochroleuca* 10min; in concentrated ACE solution - for *C. calceolus* 12–15min, for *O. insectifera* 10 min. Experimental work experience with orchids has great significance when doing trials *in vitro* with various level of seed ripeness. Under changing climatic factors in different regions of Latvia there were also observed distinct differences in seed maturation among populations. The seed material collected in expeditions for sowing *in vitro* testified

of different seed maturation level at the same time: in 2008 at Lake Būšnieki the seeds of *L. loeselii* were still connected to the placenta; at the same time at Krustkalni the seeds were over-ripe, with well-developed seed-coat [III; IV]. Embryo vitality test allowed controlling the results of germination of the collected seeds *in vitro*.

Aseptic germination of seeds *in vitro* [I;II;III;IV]

There was experimentally set the necessary time for seed sterilisation before sowing *in vitro* and the concentration of ACE solution for different orchid species, which was the same as in TTH test, to provide sterility and at the same time preserve the embryo vitality at the maximum: in undiluted disinfecting ACE we could sterilise *C. calceolus* for 12–15min, *O. insectifera* for 10min; in 50% ACE solution - *C. calceolus* – for 25min, other species – for 10min. It has been mentioned in literature that seed-coats of several species can contain cutine, suberine, different polysaccharides, forming “carapace” (Rasmussen 1995). It can create a serious problem for such seeds germination *in vitro* cultures. Soaking for the selected most optimal time in concentrated ACE solution, at the same time there was achieved sterilisation of *C. calceolus* and *O. insectifera* seeds and scarification of seed-coat. As one of the delaying factors of germination is the ABA, existing in the seed-coat, which works as inhibitor (Van Waes 1984, quoted after Rasmussen 1995). For our research to rinse the ABA existing in the seed-coat, the seeds were additionally stored for 2h in sterile distilled water. Getting the seed photos in the microscope, it was possible to fix the seed-coat “carapace” also visually (Fig.4A). Like seed-coat structure of *C. calceolus* was not spy (Fig.4B).

Initially using the liquid media and sowing on filter paper bridges in test tubes, when unopened capsules were sterilised by soaking in 96 % ethanol and set on fire, there was provided their total sterility [I; II]. This method was used for sowing partly mature seeds in sterile mediums without agar. Liquid media gave the opportunity to supplement the nutrient solution or to move the filter paper bridge with seeds to the test tubes with newly made media. However, this method also showed some drawbacks: partly mature seeds may not receive sufficient amount of nutrients and physiologically active substances, which is necessary for each species in their initial development. Besides, as it has been mentioned in literature, liquid media change pH more rapidly than agarised, as a result of which necroses appear and the tissues die (Cherevchenko et al. 2008). Therefore during the work there was worked out new seed sowing methodology, when the sterilisation of totally mature seeds was done in filter paper discs, which were put on agarised initial media. Using this method of sowing *in vitro*, it was possible to protect the filter paper discs partly from drying, periodically humidify them with dilute medium solution.



Figure 4. Orchid seeds: **A** - *Ophrys insectifera* seeds from NBG. Seed with well-developed embryo (left side) and undeveloped embryo (right side). Seed-coat with big “carapace” in its cells (line segment corresponds to 150 μ m). **B** – *Cypripedium calceolus* seed with different seed-coat (line segment corresponds to 150 μ m).

Trying the basic medium of Van Waes and Debergh (1986) with and without AC as adsorbent in media for germination, it was cleared that adding of AC decreased the number of sprouted plants (Fig.5). It shows that in the initial phase of *in vitro* culture the presence of adsorbent is not advisable.

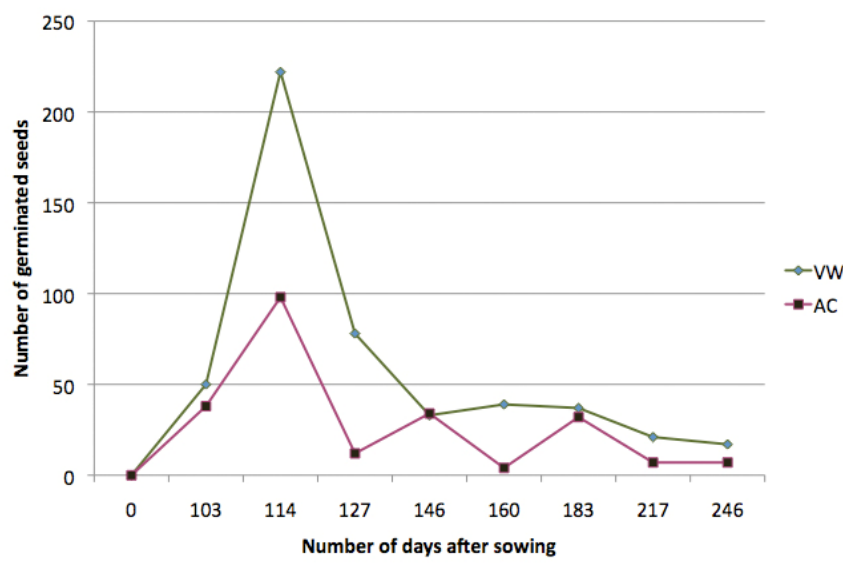


Figure 5. *Dactylorhiza baltica* seed germination on Van Waes et al. 1986 basic medium (with active charcoal - **AC** and without active charcoal – **VW**) in the period from sowing *in vitro* on 9 November 2007.

Seeds of orchid species were sprouted in darkness and in separate cases the germination took even after several years, therefore it was important to inspect that the cultivation vessels do not get dry. Our research results showed that to stimulate seed germination, as well as to provide wetness (in initial experiments the disc surface with seeds was additionally moisturized with sterile distilled water), the change of method to adding modified liquid medium was efficient, but time-taking (1 time/1-2 months, seed initiating

period up to 5 times). In comparison with epiphytic orchids, for the germination of which it was necessary to have the light (Data of the Department of Plant biological diversity *in vitro* conservation), terrestrial orchids better germinate in darkness (Rasmussen 1995). The main factor of germination for different plant species of temperate climate zone is the temperature of environment, which affects termination of dormancy period (Nečajeva 2012, etc.). Physical dormancy period can be stopped or reduced also by mechanical or chemical influence (Baskin 1998). One of the factors can also be time: seeds of *C. calceolus*, which were sowed *in vitro*, started to germinate 2–3 months later, but germination of separate seeds was observed even up to 2 years later (Jakobsone 2009). In our experiments we found germination without processing with lowered temperature in medium which contained an essential part of amino acids, but the addition of cytokines to all species was not necessary. The approbation of acquired initiation of *in vitro* culture was successful with six of eight investigated orchid species: *D. baltica*, *D. fuchsii*, *D. russowii*, *D. ochroleuca*, *L. loeselii*, *C. calceolus*.

Ensuring of growing and development *in vitro* [II;III;V]

Plant eco-physiology is an experimental science, which investigates physiological mechanisms, which are in the base of ecological research (Lambers et al.2008). Inspecting habitats and being guided by the literature about research *in situ*, it has been tried to use this knowledge for provision of plant development *in vitro* conditions. The most important factors for cultivations are medium components of macro- and microelements, environmental pH, light-darkness mode and temperature (Mitrofanova 2011).

Cultivation media

For each stage of plant development there were used different media and their modifications. Detection of organic additives in media is complicated, besides, there exist differences in each population and even in each seed's requirements for chemical reagents (Rasmussen 1995), which in our case were selected and set in experimental way by modifying basic media published in literature. One of the most important permanent circumstances of *in vitro* is medium's pH and its consistency (Mitrofanova 2011). There are different opinions about the addition of phytohormones in initial media, for example, it was stated that kinetine inhibited the formation of both protocorm and rizoides (Hadley 1970). Wotavova-Novotna (2007) proved that auxins stimulated root formation, but cytokines intensified sprout development and cell division for some of *Dactylorhiza* species. The development of plant over ground parts *in vitro* in the classical variant is ensured by the proportion of cytokines and auxins, which exceeds 1:1 by several times, that is, for that taxa which need the addition of phytohormones. Vejsadova (2006) has published the results of experiments, which show normal development of terrestrial orchid species *Dactylorhiza incarnata* subsp. *serotina* and *D. maculata* subsp. *maculata*, adding IAA and zeatine in the

cultivation medium correspondingly $1.43\mu\text{M}$ and $0.72\mu\text{M}$, which approximately corresponds to 0.25 and $0.15\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, but for rooting $1.34\mu\text{M}$ NAA together with $1,11\mu\text{M}$ BAP. The author had the rooting experiment lasted for 12 months. In our turn, the experiments show, that species of *Dactylorhiza* genera, when germinating, form the root and further usage of auxins is not necessary; in further cultivation process the old roots gradually die and new ones are formed. Also in the nature, mostly the roots of terrestrial orchids are formed again every year and the old one dies (Smith and Read 1997). *D. fuchsii* could initially be cultivated on mediums without growth regulators, formation of tubers and roots was observed already 3–6 months after the beginning of germination (Jakobsone 2008). However, in experimental research with *C. calceolus* 3–6 months after incubation in darkness at 5°C temperature *in vitro* with the addition of cytokine (BAP, kinetine or zeatine) to media, there were got plants of *C. calceolus*, which 4–5 months later were planted *ex vitro* (Klavina et al. 2009). We can conclude that for the plantlet development, phytohormones cytokines were not necessary, if these plants are meant to be planted *ex vitro*; phytohormones had to be added to the medium to keep the sprout in longer juvenile stage, as well as to initiate new shoot formation. Our research confirms once more that each orchid species has to be used different cultivation methods. The results of the experiments with *D. baltica* showed that the initiation of new shoots was able to get with a combination of phytohormones BAP $0.2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + IAA $0.05\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Fig. 6.A), but during cultivation there had started the medium colouring, which later created plant necroses. With the addition of YE $1.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ to medium Fast (1974) a part of plantlets juvenilised and in the next re-planting there followed growth and development of separate individuals. (Fig.6.B).

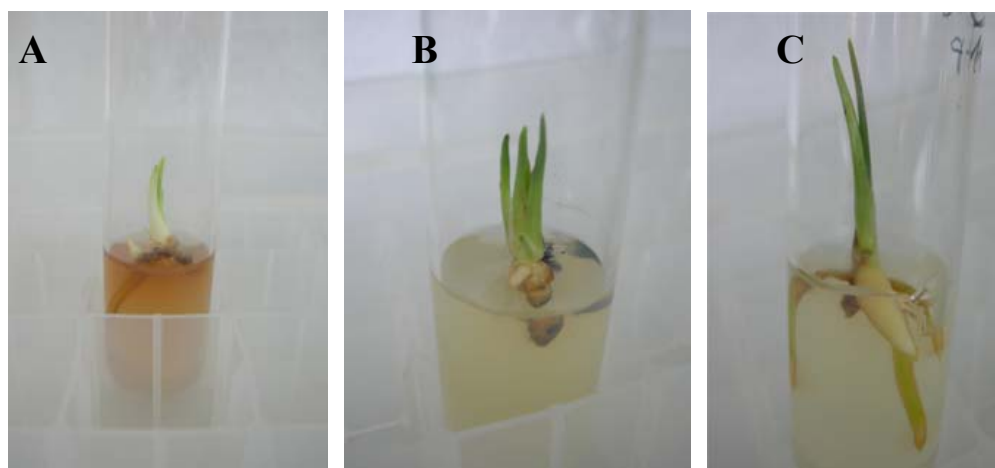


Figure 6. *Dactylorhiza baltica* after 1.5 month cultivation *in vitro*: **A** – basic medium (Van Waes et al. 1986) was added BAP, $0.2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + IAA, $0.05\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, on the root there has appeared a new sprout; **B** – basic medium (Fast 1974) was added $1.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ YE, sprout development phase before proliferation; **C** – basic medium (Fast 1974) was added $1.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ YE, sprout with well developed tubers and vitality assessment (4.5 points).

Assessing the plant vitality, the best result was seen in the variant which had the Fast (1974) basic medium 1 g.L⁻¹ YE added (Fig.6.C). Literature points that RE contains vitamins and 10% of amino acid (Rasmussen 1995), and these nitrogen organic combinations for orchids as symbiotic plants are easier to receive than non-organic combinations of nitrogen. Adding the medium RE, the root and tuber necroses were not observed. In its turn, addition of phytohormone MT to the medium is not advisable in *D. baltica* media, because in the experiments there were formed 25% of root and tuber necroses although MT stimulated the creation of new shoots. The mathematical processing results of experiments with *D. baltica*, using SPSS 17 programme, have been summarised of mathematical treatment results in tables 1 and 2 [V].

Table 1. The influence of BAP and yeast extract on *D. baltica* plantlet quality indicators *in vitro* (basic medium Van Waes, Debergh 1986 modification), adapting Kruskal–Wallis test.

*)Kruskal Wallis test	Tubers	Number of roots	Vitality	Proliferation rate	New sprout	Necroses	Root length	Previous medium
Chi-Square	12,429	9,215	14,379	10,186	20,169	16,481	7,425	4,449
Asymp. Sig.	0,190	0,418	0,109	0,336	0,017	0,057	0,593	0,879

*) Parameters of Kruskal Wallis Test

Table 2. The influence of BAP, MT and IAA on *D. baltica* plantlet quality indicators *in vitro* (basic medium Fast 1974 modification), using Kruskal–Wallis test.

*)Kruskal Wallis test	Tubers	Number of roots	Vitality	Proliferation rate	New sprouts	Necroses	Roots length	Previous medium
Chi-Square	6,861	6,072	20,496	14,427	8,339	17,233	3,154	18,300
Asymp. Sig.	0,652	0,733	0,015	0,108	0,500	0,045	0,958	0,032

*) Parameters of Kruskal Wallis Test

The sample groups differ essentially if *Asymp. Sig.* = 0.00 < 0.05, therefore experimental variants of Van Waes, Debergh 1986 basic medium modification with BAP and YE essentially differ in new sprouts (0.017), which have formed on roots (Tab.1). In the series of experiments on Fast 1974 basic medium modification with addition of phytohormones BAP, MT and IAA, the variants essentially differed in vitality (0.015), previous media (0.032) and necroses (0.045) (Tab.2).

Experimental variants were additionally assessed by making comparison of two sample groups with Mann-Whitney U-test, which showed that in these parameters variants mutually did not differ essentially. Basing on the results of Mann-Whitney test, there was also done Pearson correlation test to find out which parameters mutually correlate positively and which - negatively.

As a result in experiments on Van Waes, Debergh (1986) basic medium modification in the credibility interval $p < 0,01$ the most essential negative correlations are between vitality

and necroses (-0.802), as well as the second closest negative correlation was stated between the number of roots and number of new shoots (-0.300). The only close positive correlation was stated between number of tubers and vitality (0.289). For the series of experiments on basic medium Fast (1974) modification, at credibility level $p < 0.01$, Pearson correlation shows close negative correlation between necrosis and vitality (-0.738), root length (-0.389) and tubers (-0.358). In its turn, vitality closely positively correlates with tubers (0.487), number of roots (0.280) and root length (0.230).

The assessment of experimental work results using Kruskal-Wallis test, Mann-Whitney U-test and Pearson Correlation test allows predicting further *in vitro* cultivation experimental work direction in more detail. This research is necessary to be continued. Unlike the mass-micropropagated plants including epiphytic orchid sorts, rare and endangered plants need such development *in vitro*, like in the natural environment. In the cultivation process there were put forward two main problems: prevention of tissue necroses and obtaining new plants in similar way, as it is *in situ*, where the multiplication is small. Tissue necrosis is caused by increased emission of phenols from plants in the medium (Wotavová-Novotná 2007), which get oxidised there creating quinones, which are toxic for plants. As a result, plants get necrotised. Classical method to prevent this process is the addition of adsorbent. Usually for this reason different plant cultivation media are added AC dosed by 1–2g (Rasmussen 1995; Malmgren 1994; Stephan 1988; Vöth 1976). In the Doctorate paper to prevent tissue necroses with the addition of 1.5g.L^{-1} AC was successful only for the species *D. russowii* (Fig.7.A).

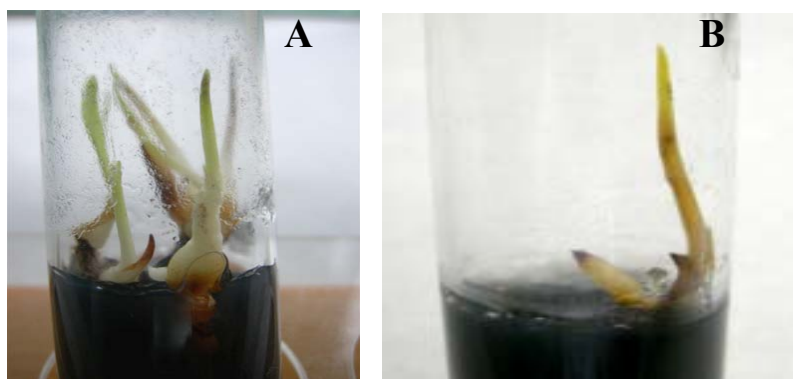


Figure 7. The influence of AC on orchid cultivation *in vitro*: **A** – *Dactylorhiza russowii* necroses were not found; **B** – *Dactylorhiza baltica* – a part of well developed shoots die of tissue necroses.

From the seed germination to sprout stage the cultivation takes place in complete darkness mode and is regularly supervised, because new sprouts can get necrotised. Plants are to be replanted in new media, suitable for each development phase every 3–6 weeks depending on species for both stimulating normal growth and development and for

preventing necroses. Necroses in different plant cultivation stages are one of the most important problems *in vitro*, as they can lead the plant to the complete destruction [III].

To find a solution to this problem, there were done test with plants of modelling species *D. baltica* acquired *in vitro* including the increased dosage of Ca^{2+} in the medium. It is known from the literature that high concentration of Ca^{2+} in the cell wall and cell membrane mostly serves to provide its endurance and to regulate cell membrane structure. High activity of the enzyme polygalactouronasis, which in its turn splits pectin, is observed when there is lack of Ca^{2+} which is the reason of cell wall degradation, as the result of which plant tissues become “soft”, transparent. Calcium is necessary for cation-anion balance, organic and non-organic ions being in mutual cooperation (Pierik 1997).

In the first experiments with the increased contents of Ca^{2+} it was added to Norstog (1973) basic medium as calcium gluconate monohydrate ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{CaO}_{14} \times \text{H}_2\text{O}$). These tests, in comparison with Norstog (1973) basic medium, proved the essential decrease of necroses in regenerant cultivation process (Fig.8) – single, increased dosage of Ca (2.28g.L^{-1}) kept its after impact, creating the opportunity to cultivate orchids presenting cytokines, which gives an opportunity to get new shoots in the cultivation process. [V].

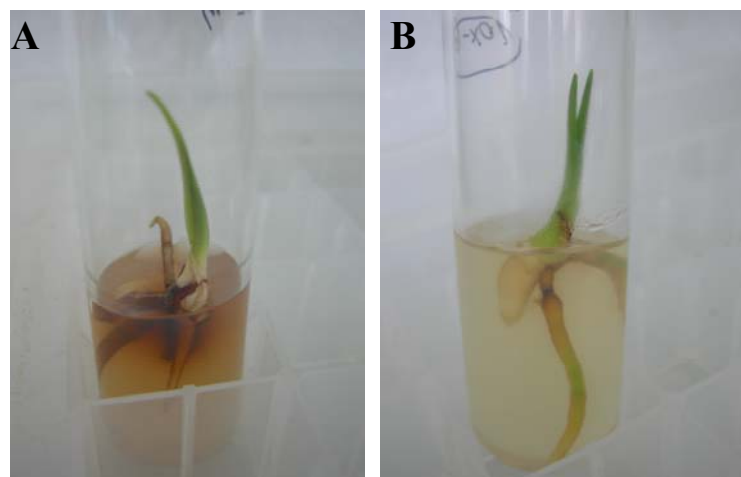


Figure 8. *Dactylorhiza baltica* after cultivation *in vitro* for 1.5 months in modified Norstog (1973) basic medium: **A** – with unchanged dosage of calcium, there formed necroses; **B** – with increased dosage of calcium (2.28g.L^{-1}).

Lighting and temperature

From sowing *in vitro* to getting sprouts with normally formed roots the cultivation is done in total darkness mode. It is connected with the fact that also in the nature the initial development takes place in the soil. If for the terrestrial orchids this stage *in situ* lasts for 3–4 and more years depending on species (Rasmussen 1995), *in vitro* conditions it happens for some months. If multiplication or keeping in sterile culture is not necessary, in Autumn the orchids sowed in asymbiotic culture will be ready for planting in substrate already in spring [V]. Both for preservation reasons in plant sterile bank, and acclimatization *ex vitro*

the acquired regenerants are advisable to be put for 2–4 months in lowered temperature ($5\pm 2^{\circ}\text{C}$) at slow growth conditions and darkness, for them to survive the stillness period.

3.3. Acclimatization of regenerants *ex vitro* [V]

Acclimatisation is an individual plant's morphological and physiological adaptation to compensate the reduction of vitality after initial stress reaction (Lambers et al. 2008). There are practised different plant acclimatisation *in vitro* methods, but it is especially important to keep permanent acclimatisation conditions for the plants to avoid stress (Gordon 1991). The author accentuate that there are five most important factors which must be provided and controlled to keep permanent in the acclimatisation process, and they are: additional air humidity (first two weeks up to 95%–100%, decreasing gradually in the 3rd week), substrate nutrients, light mode, air circulation and temperature. To reintroduce successfully the plantlets acquired *in vitro* in *ex situ-in situ* conditions [semi-natural meadows] in NBG, there were made soil analyses and selected planting places, considering our field research *in situ*. For the acclimatization experiment there were analysed soil samples from the three selected places: (1) from the cultivation bed, (2) wet meadow at the pond shore and (3) meadow where the orchids of *Dactylorhiza* genera grow. Soil analyses results are summarised in Table 3. During the acclimatisation process *in vitro* for the experimentally got plants of *D. baltica* the air humidity 80% and air circulation was provided by double agrofilms on the boxes of substrate (No.1–6), controlled light mode – first 3 weeks for 24h in artificial light and at 23–25°C temperature and 2 weeks in outside conditions under the covered materials.

Table 3. Nutrient contents in the acclimatization experiment for *Dactylorhiza baltica* in NBG and Orchid path in Engure nature protected area. ⁽¹⁾.

Nutrient	Variant 1. Cultivation bed	Variant 2. Wet meadow at pond shore	Variant 3. Wet meadow	Engure Orchid path
N	68	27	25	19
P	807	174	172	30
K	275	90	53	140
Ca	7375	13500	3035	3413
Mg	875	3750	788	413
S	21	21	21	20
Fe	1060	960	920	330
Mn	110	75	65	29
Zn	17	3,25	3,95	3,65
Cu	8	2,25	1,45	0,35
Mo*	0,05	0,04	0,06	0,04
B*	1	< 0,1	0,6	0,40

pH _{KCl}	6,85	7,15	6,74	5,50
-------------------	------	------	------	------

Methods sensitivity limit (*) ; for microelements ranging 0.01–0.5 mg.L⁻¹.

¹⁾ Soil analyses made in LU BI Plant mineral nutrition laboratory, within Latvian Council of Science project Nr.09.1549 Part C.

According to the results of soil analyses it is seen that in all samples of NBG soil there is high level of calcium, magnesium, phosphorus and iron in comparison of Engure Orchid Trail. However, the confirmation of the opportunity to adapt orchids multiplied *in vitro* totally for conditions close to acclimatize *in situ*, in our opinion, was more proved by the fact that in variant 3 and especially in variant 2 (wet meadow at the pond shore) these meadows already had these species of *Dactylorhiza* genera growing wild in them.

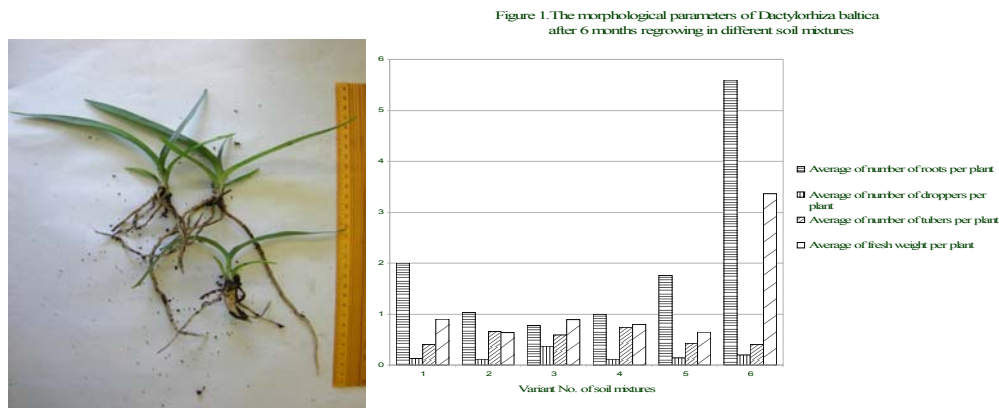


Figure 9. *Dactylorhiza baltica* (Variant 6: turf soil and leaves compost: partly decomposed layer of plant parts under sphagnum (1:5), exposition for five months in darkness in conditions of slow growth at 5°C) plants after five months acclimatisation *ex vitro* in 2009. Before planting in NBG territory in autumn there was done their quality assessment.

The results were assessed after the five months acclimatisation of *D. baltica* in six different substrate variants. (Fig.9) The task of the acclimatisation research *ex vitro* is to clear out how the different cultivation conditions of the plant *in vitro* (contents of medium, temperature) affected the quality indicators of *D. baltica*. The acquired results were processed with multi-dimension Cluster analysis method of PC-ORD 5.0 programme (Fig.10).

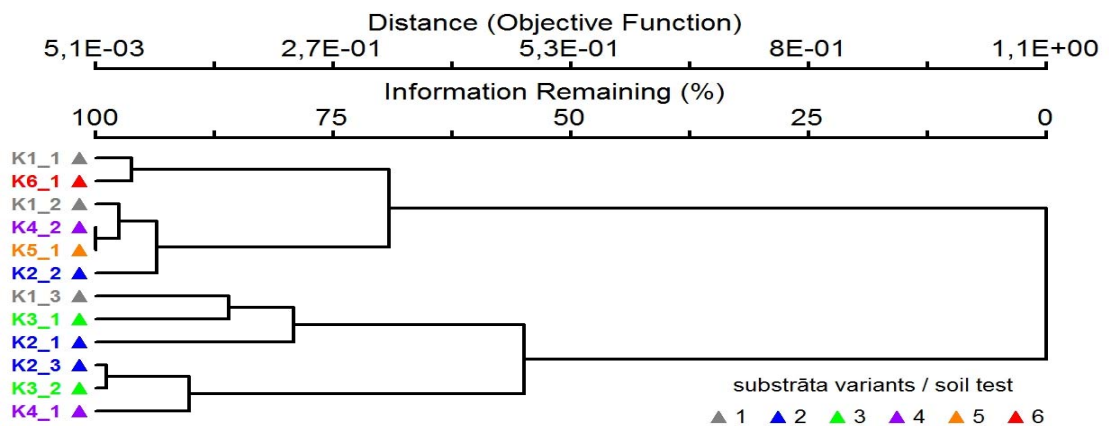


Figure 10. Cluster dendrogram with *Dactylorhiza baltica* plant acclimatisation results, assessing six substrate variants (coloured symbols) and the cultivation experiment variants (K1–K6).

To find coherences between substrate variants used for plant acclimatisation and plant quality indicators of *D. baltica*, Cluster analysis used division of six groups, assessing four factors: number of roots, number of droppers, number of tubers and average mass of plant (g).

Assessing the acquired results we can conclude that the differences of substrates in this case of assessing quality indicators of *D. baltica* plants are not so essential. Essentially

differ variants K4.1. and K4.2., because for cultivation *in vitro* plants there were used different modifications of media, which makes us to conclude that in this experiment the cultivation media before plant acclimatisation *ex vitro* more essentially affected plant vitality than the selection of acclimatisation substrates. Strict difference from the other variants belonged to variant No.3 (K3.1 and K3.2), which also testifies of different cultivation conditions of *D. baltica* plants *in vitro*, i. e. which ones were *in vitro* cultivated with the increased dose of calcium.

Regardless of the fact, that in substrate variants No.1–5 *in vitro* the plants were planted from the cultivation room with 23–25°C and 16h light, but in substrate variant No.6 the plants acquired *in vitro* were planted *ex vitro* after 5 month exposition at 5°C in darkness, cluster dendrogram shows the similarity of these variants (for example, K6.1 and K1.1). Therefore we could conclude that the substrate variants selected for acclimatisation are similar. However, in Figure 7.B it is seen that variant No.6 had significantly different quality indicators, which was evidently affected by period of dormancy (five months at 5°C in darkness). As the result, in 2010 plants of variant 6 spent the winter successfully, as well as already next year there flowered the first plants in each of the three different experimental plantings in NBG. In its turn, it testifies that the flowering was affected not by experimental planting variant, but by cultivation conditions *in vitro* before acclimatisation. Plants of variant 6 kept the comparatively higher vitality also in 2011.

Data of years 2010 and 2011 about the reintroduction of *D. baltica* in conditions close to *in situ* in NBG are shown in Figure 11.

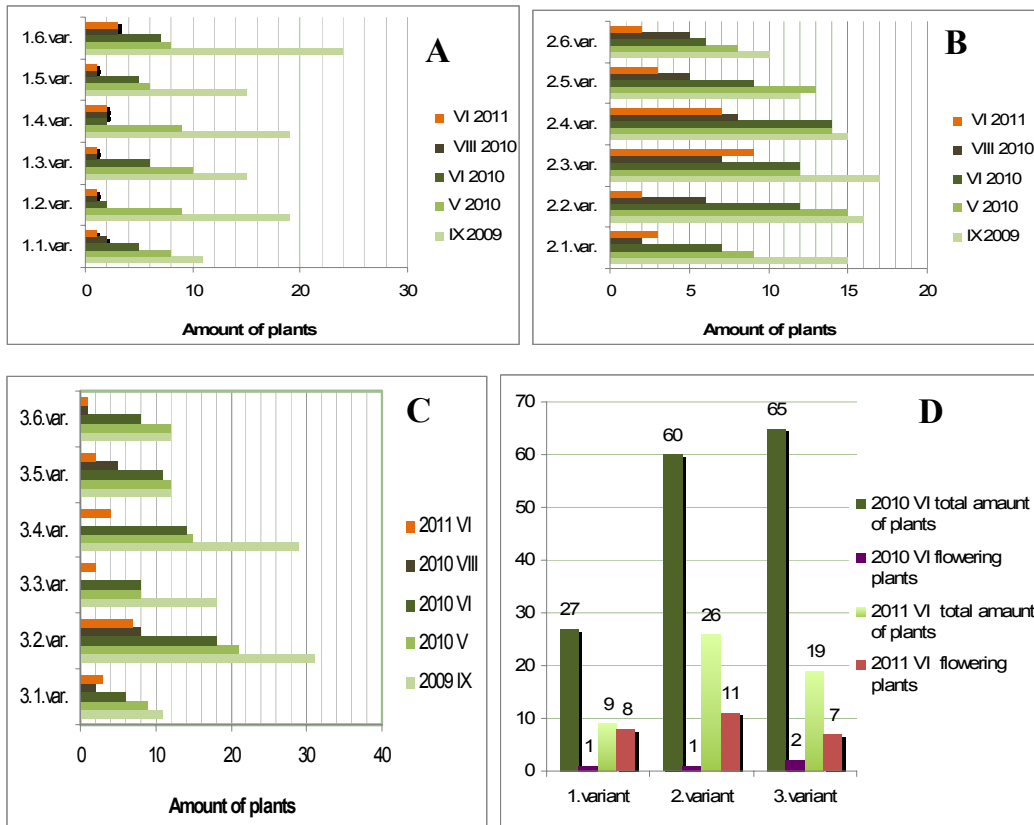


Figure 11. The number of survived *Dactylorhiza baltica* plants in *ex vitro* conditions: **A** – cultivation bed; **B** – wet meadow at pond shore, which is occasionally flooded; **C** – wet meadow; **D** – total number of survived and flowered plants in three different *ex vitro* plantings.



Figure 12. *Dactylorhiza baltica* (Variant 6) after winter survival in 2009 and 2010: **A**–with mature flower head and characteristic pigmentation of leaves in NBG experimental outdoor planting (wet meadow at pond shore); **B**–flowering plants in cultivation bed.

Already in spring 2010 *D. baltica* flowered in all three experimental plantings of NBG, each having one individual for the first time. After spending the winter of 2010/2011, the reintroduced plants of *D. baltica* successful competed with other species in the meadow *ex situ* – *in situ* conditions (Fig.12.A). However, experiments in cultivation bed did not cover the expectations, as the place was not suitable. In Autumn 2010 the survived plants of *D. baltica*, which were replanted in closed bed in NBG in half-shadow, had successful survived the winter in spring 2011 (Fig.12.B).

3.4. Formation of mycorrhiza in acclimatized plants of *Dactylorhiza baltica* [III;V]

For the orchids to get acclimatised *ex vitro*, one of the most important factors is a successful formation of mycorrhiza. In the process of symbiosis the orchids get nutrients from fungi (Cameron et al. 1999). Orchids and their symbiotic fungi form common network of roots and mycelium, which together with the soil form the ecosystem body (Selosse et al. 2006). The results acquired in the work showed that in the acclimatisation process the plants acquired in asymbiotic conditions got colonised with symbionts (Fig.13).

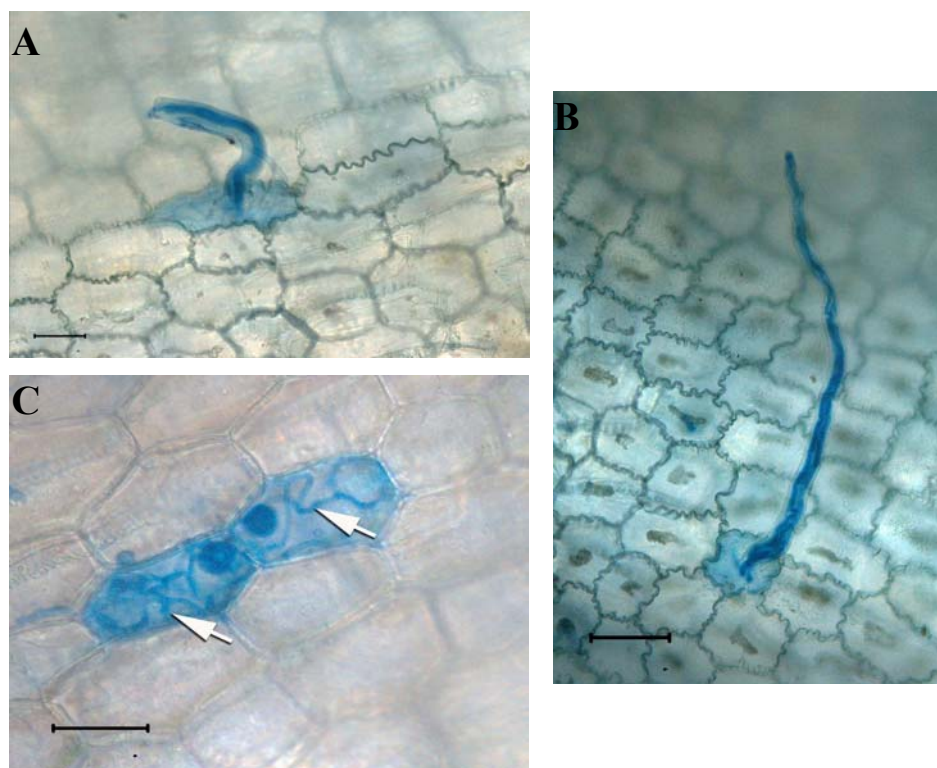


Figure 13. Colonisation of *Dactylorhiza baltica* *in vitro* plant roots with symbionts after five month acclimatisation *ex vitro*: **A; B**–Variant 4 [turf soil and leaves compost : partly decomposed layer of plant parts under sphagnum (1:3)]; mycorrhiza fungi hyphas have colonised in root hair; **C** – root cells colonisation with mycorrhiza fungi hyphas. Line segment corresponds to 40x30µm (A and C); 20x50µm (**B**).

For the root fragments selected for analysis there were calculated the indicators of mycorrhiza colonisation level: mycorrhiza intensity in all root system (M%) and mycorrhiza

frequency or mycorrhiza structure occurrence frequency (F%) in all root system. Six substrate variants (No.1–6) had statistical data processing done, using the parameters M% and F%, using the computer programme “Mycocalc” (Tab.4).

Table 4. The intensity of *Dactylorhiza baltica* root colonisation (M%) and frequency (F%) after five months acclimatization *ex vitro* in different soil substrates (No.1–6).

Variants	Nr.1	Nr.2	Nr.3	Nr.4	Nr.5	Nr.6
M %	0,2	11,7	0,4	1,1	0,6	7,2
F %	5	69	12	29	20	83

The samples after acclimatisation *ex vitro* from substrate variants No.2 [substrate No.1 (gravel: substrate from the meadow where orchids grow: pine bark mulch (1:1:0.5)], covered with forest soil of partly decomposed leaves) and No.6 [turf land and leaves compost: layer of partly decomposed plant parts under sphagnum (1:5)] symbiosis intensity (M%) and mycorrhiza frequency (F %) is significantly higher than in other variants (No.1;3;4;5), which testifies that in variants No. 2 and No. 6 substrate there are components which stimulated mycorrhiza development, probably corresponding symbiotic fungi or conditions favourable to their development. The fact that plants *in vitro* successful get symbionts in their roots, is shown also by the research in NBG analysed samples of *C. calceolus* already after 2 months of acclimatisation *ex vitro*, doing mycorrhiza research according to the published method (Hayman 1970), the percentage of root mycorrhization was ranging from 1.0–8.9% (Klavina et al. 2009).

To realise total acclimatisation *ex vitro* of the orchids acquired *in vitro*, and achieve the adaptation of these plants in natural conditions or conditions close to natural, it is necessary to have additional research. At the moment there have been started successful research of *D. fuchsii* and *D. baltica* mycorrhiza, and there will be continued mycorrhiza research also in other orchid species [III;V].

3.5. The genetic diversity of *Liparis loeselii* populations in different habitats of Latvia [VII; VIII]

From the checked 18 on retrotransposons based PCR primers, only two primers (2079 and 2415) showed high genetic polymorphism and therefore were suitable for the genetic diversity research of *L. loeselii*.

Table 5. Nucleotide sequences which are characteristic to two markers and show the population polymorphism of *Liparis loeselii* genetic diversity.

Primer No.	(*) Nucleotide sequences (5'→3')
2079	AGGTGGGCGCCA
2415	CATCGTAGGTGGGCGCCA

(*) Kalendar et al. 2010.

Both primers totally formed 50 loci, with primer 2415 there were marked 23 loci and with primer 2079–27 loci (Tab.5). Polymorphism of the marked loci was different in plants grown in different biotopes and varied from 48% to 84% (Tab.6).

Table 6. Number of polymorph loci in *Liparis loeselii* populations.

Habitats with <i>L. loeselii</i>	Polymorphic loci	
	number	frequency (%)
Engure OT	32	64
Engure near Lepste	42	84
Krustkalni	28	56
Bog Pēterezers in Slītere	24	48
Other investigated habitats	0	0

Polymorphic loci characterise the genetic diversity of *L. loeselii*, which is indicated by Nei index (Nei 1972). Of all analysed loci, only three loci were characteristic to only one *L. loeselii* population and could not be found in other habitats. Doing the genotyping, there were found in total three “unique” loci and with the marker 2415. Two unique loci No.4 and No.13 were found in orchids of Engure OT habitats and one (No.16) in plants growing in Lake Kaņiera surroundings (Tab.7).

Table 7. *Liparis loeselii* unique alleles.

Loci No.	Habitats	Allele frequency (%)
4	Engure OT (Orchid Trail in Engure)	13.4
13	Engure OT (Orchid Trail in Engure)	50.0
16	Kaņieris (the lakeshore of Lake Kaņieris)	13.4

For the result analysis there were used data mathematical processing programs: PopGene 1.31 and NTSYSpc 2.1 (Fig.14; 15).

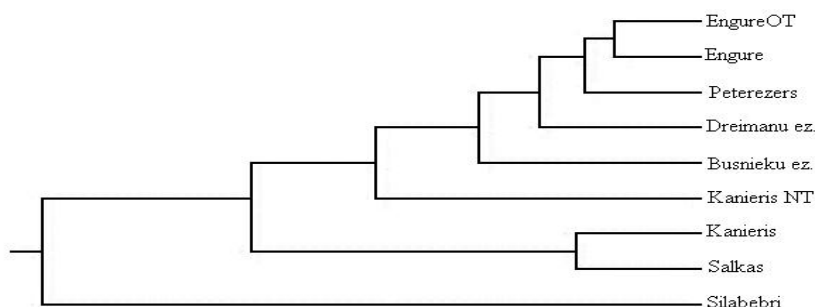


Figure 14. Dendrogram characterising *Liparis loeselii* population genetic diversity.

Dendrogram shows the genetic similarity of the analysed plants growing in eight different habitats. Dendrogram shows two groups, which form genetically mutually similar clusters of individuals: from Engure Orchid Trail (Engure OT) and Engure (near Lepste) populations, as well as from Lake Kaņieris – Ainaži gravel pit ecotypes. Individuals from

Lake Kaņieris and Ainaži gravel pit population are geographically distant, but genetically mutually similar, which can be seen also by genetic distance (Tab.8). Branch of the eighth group cluster forms a set of distinctly genetically different individuals, which characterise individuals from Lake Silabebri population.

Table 8. Genetical distances among *Liparis loeselii* individuals from different habitats.

Habitats	Engure OT	Engure near Lepste	Kaņieris	Kaņieris NT	Gravel pit "Šalkas"	Lake Silabebri	Lake Būšnieki	Lake Dreimaņi
Engure near Lepste	0.068							
Kaņieris	0.306	0.300						
Kaņieris NT	0.222	0.198	0.396					
Gravel pit "Šalkas"	0.374	0.338	0.092	0.446				
Lake Silabebri	0.317	0.325	0.610	0.654	0.654			
Lake Būšnieki	0.138	0.213	0.313	0.301	0.478	0.616		
Lake Dreimaņi	0.076	0.125	0.280	0.293	0.333	0.183	0.203	
Pēterezers bog	0.101	0.085	0.186	0.182	0.244	0.534	0.110	0.171

Genetic differences between these two ecotypes, probably, could be connected with adaptation to growing conditions, that is, increased water level, nutrients, light, as well as different species of mycorrhiza fungi, as it was previously mentioned also in other authors' works (Taylor and Bruns 1999; Bidartondo et al. 2004).

Dendrogram (Fig.15), which shows the genetic diversity of all analysed plants, characterises the inner genetic structure of *L. loeselii* population in Latvia.

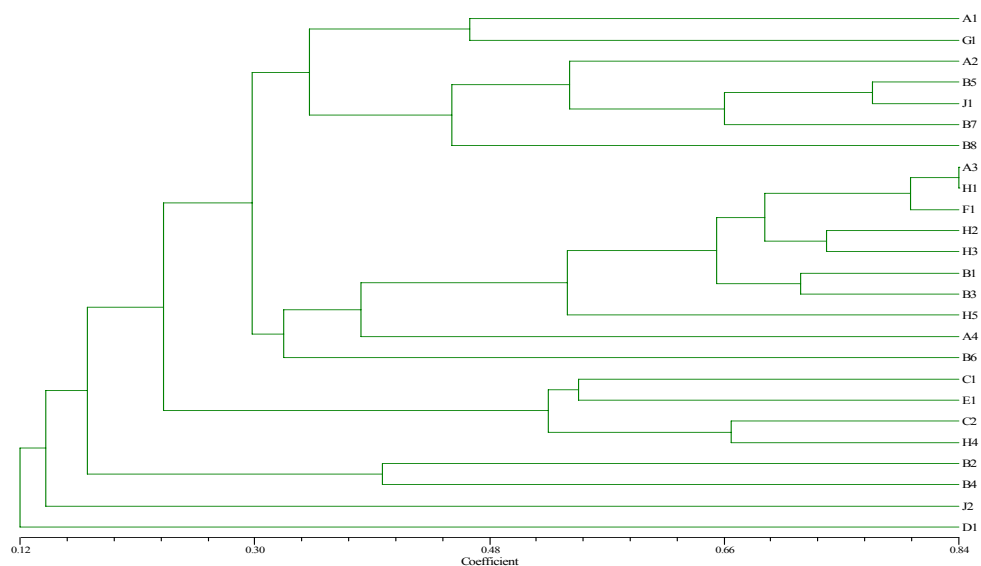


Figure 15. Dendrogram to assess the genetic structure of *Liparis loeselii* within the population: A–Engureš Orchid Trail (OT); B–Engure near Lepste; C–Lake Kaņieris; D–Lake Kaņieris Nature Trail (NT); E– Gravel pit Šalkas”; F–Lake Silabebri; G– Lake Būšnieki; H–Lake Dreimaņi; J– Bog Pēterezers.

The dendrogram (Fig.15) of summarised results does not show sample grouping according to the sample collection places and analysed samples from different habitats take position in one and the same dendrogram branches. The dendrogram (Fig.15) shows two superior branches and four smaller groups, two of them (D1 – Lake Kaņieris Nature Trail, J2 – Bog Pēterezers) are located separately. Showed two groups, which form genetically mutually similar clusters of individuals: from Engure OT and Engure near Lepste populations, as well as from Lake Kaņieris – gravel pit “Šalkas” (Ainaži) ecotypes. Individuals from Lake Kaņieris and “Šalkas” gravel pit population are geographically distant, but genetically mutually similar, which can be seen also by genetic distance (Tab.8), which values vary from 0,092 līdz 0,374. Branch of the other group cluster forms a set of distinctly genetically different individuals, which characterise individuals from Lake Silabebri population. Values of genetic distance vary from 0.317 to 0.654 (Tab.8). This results that the inner genetic diversity or plant genetic similarity of *L. loeselii* population is probably connected with the age of population and growing conditions. Vegetation is characterised by relatively low perennial grassland with the dominating species *E. variegatum* [VIII; Tab.5]. Genetic differences between these two ecotypes, probably, could be connected with adaptation to growing conditions, that is, increased water level, nutrients, light, as well as different species of mycorrhiza fungi, as it was previously mentioned also in the works of other authors (Taylor and Bruns 1999; Bidartondo et al. 2004). Polymorphism of *L. loeselii* by the Lake Būšnieki and Kaņieris NT is a natural succession – also formed not long time ago, it was caused by the lake overgrowing and bog formation in this habitat. Vegetation consists of higher perennial grass, but their amount is still small and at the moment this *L. loeselii* population, in gravel pit “Šalkas”, has optimal growing conditions, there is not distinct competitiveness among species, which could create stress, these conditions have been described by others authors (Rasmussen 1995; McMaster 2001; Pillon et al. 2007).

CONCLUSIONS

- ❖ There has been experimentally worked out methodology for orchid sowing *in vitro* for six out of eight researched species: *Dactylorhiza baltica*, *D. fuchsii*, *D. russowii*, *D. ochroleuca*, *Liparis loeselii*, *Cypripedium calceolus*.
- ❖ Research explained that the necessary qualitative and quantitative contents of culture media compounds to provide growth and development *in vitro* differs for both each orchid species and within one species depending on the stage of growth and development.
- ❖ To eliminate necroses, essential meaning has the addition of Ca gluconate to cultivation medium for species of *Dactylorhiza* genera: single, increased dosage of calcium (2.28

mg.L⁻¹) kept the after impact, creating the opportunity to cultivate orchids presenting with cytokines.

- ❖ The most optimal variant for acclimatization *ex vitro* in our research with *Dactylorhiza baltica* belonged to the plants which were put in lowered temperature (5 °C) and for five months in darkness: separate plants flowered already in a year after being planted in the territory of NBG in all field experiments.
- ❖ The acquired *in vitro* plants of *Dactylorhiza baltica* after planting in all variants of substrate had colonised with symbiotic microorganisms, which provided their survival in *ex vitro* conditions.
- ❖ For high concentration and quality DNA product obtaining from *Liparis loeselii* the modified Friar (2005) extraction method with double sedimentation of DNA was the most suitable.
- ❖ To get the high concentration and quality DNA product of *Liparis loeselii*, the suitable method was modified Friar (2005) method with double sedimentation of DNA.
- ❖ The genetic diversity found in the population of *Liparis loeselii* is not connected with sample habitat location. There was found a probable connection between plant genetic similarity and their growing in similar growing conditions.
- ❖ Research which include orchid asymbiotic germination, growing and development, as well as acclimatisation *ex vitro*, show that *in vitro* methods are essential for orchid species possible reintroduction in nature – to preserve species diversity.

The approbation of the research results

The research results acquired in the doctoral thesis have been reflected in 7 scientific publications, 1 manuscript, 13 international conference theses and about the research there have been given 13 reports in international scientific conferences.

Reports in international conferences and published thesis:

The presenting author is underlined.

1. Congress of EastCentGard II, Warsaw/Rogow, Poland, 2007. Poster „The conservation possibilities of endangered orchid species of Latvia and Lithuania.” (Jakobsone G., Dapkūnienē S., Cepurīte B., Belogradova I.). Published thesis: *Book of Abstracts*, 44-45.
2. 2nd World Scientific Congress: Challenges in Botanical Research and Climate Change. The Netherland, Delft, 2008. Poster “Conservation of *Liparis loeselii* (L.) Rich. in protected areas of Latvia and National Botanic Garden”. (Jakobsone G., Gavrilova G., Belogradova I., Aleksejeva L.). Published thesis: *Book of Abstracts*, 79.
3. 22nd expedition of the Baltic Botanists, Daugavpils, Latvia, 2008. Poster “*Dactylorhiza fuchsii* as model object in *in vitro* culture study for development of terrestrial orchids.” (Jakobsone G., Belogradova I., Megre D.). Published thesis: *Abstracts and Excursion Guide*, 21.
4. Daugavpils University International Scientific Conference No.51, Daugavpils,

- Latvia, 2009. Report „The necessity of biological research of wild orchid species in Latvia *in vitro*. (Belogradova I., Jakobson G.). Published scientific conference theses, 36.
5. 5th International Conference "Research and conservation of biological diversity in Baltic Region". Daugavpils, Latvija, 2009. Poster “Methodological solution of problems in investigation of Latvia's wild orchid species *in vitro*” (Belogradova I., Jakobson G., Megre D.). Published thesis: *Book of Abstracts*, 22.
 6. Daugavpils University International Scientific Conference No.52, Daugavpils, Latvia, 2010. Report „The investigation of preservation perspectives of wild and endangered orchid species in Latvia: *in vitro* culture acquisition from seeds, cultivation and acclimatization *ex vitro*” (Belogradova I., Jakobson G.). Published scientific conference theses (DU, DVD format), 52.
 7. FESP XVIII, Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology, Valencia, Spain, 2010. Poster „Protection of rare wild orchid species in Latvia *ex situ*” (Belogradova I., Jakobson G., Roze D., Megre D.). Published thesis: *Book of Abstracts*, 97.
 8. XXIII Conference – Expedition of the Baltic Botanists, Haapsalu, Estonia, 2010. Poster „*Dactylorhiza baltica in vitro* and *in vivo*” (Jakobson G., Belogradova I., Roze D., Megre D.). Published thesis: *Abstracts and Excursion guides*, 23.
 9. Daugavpils University International Scientific Conference No.53, Daugavpils, Latvia, 2011. Report „Usability of retrotransposon-based molecular markers to assess genetic diversity *Liparis loeselii*”. (Belogradova I., Grauda D., Jakobson G., Rashal I.). Published scientific conference theses, 16.
 10. 6th International Conference “Research and conservation of Biological diversity in Baltic region”, Daugavpils, Latvija, 2011. Poster “The different habitat types with *Liparis loeselii* populations in Latvia” (Roze D., Jakobson G., Strode L., Belogradova I., Višņevska L., Kreile V.). Published thesis: *Book of Abstracts*, 110.
 11. International Conference for Academic Disciplines, University of Malta, Gozo Campus, Malta, 2011. Poster “Some aspects of the ecology of *Ophrys insectifera*” (Roze D., Belogradova I., Jakobson G., Megre D.). *Abstracts in CD-R*.
 12. 6th Planta Conference Actions for Wild Plants. W.Szafer institute of Botany PAS, Krakow, Poland, 2011. Poster “The possible ecological reasons of the threat for *Liparis loeselii* populations in Latvia”. (Roze D., Jakobson G., Belogradova I., Megre D., Kreile V.). Published thesis: *Book of Abstracts*, 62.
 13. 5th Baltic Congress of Genetics, Kaunas, Vytautas Magnus University, Lithuania, 2012. Stand report “Genetic diversity of Latvian *Liparis loeselii* population”,

(Belogradova I., Grauda D., Lapina L., Jakobsons G., Roze D., Rashal I.). Book of Abstracts, 25.

Promotion paper – the set of publications which is based on 5 published and 3 scientific articles inserted for publication, of them 7 in internationally reviewed journals and 1 prepared manuscript [VIII] to be submitted for publication in internationally indexed journal in Lithuania within the V Congress of Baltics Genetics in October 2012.

LIST OF PUBLICATIONS:

[I]

Jakobsons G., Dapkūnienė S., Cepurīte B., **Belogradova I.** 2007. The conservation possibilities of endangered orchid species of Latvia and Lithuania. *Monographs of Botanical Gardens* (European botanic gardens together towards the implementation of plant conservation strategies), Warsaw/Rogow, Poland, Vol.1: 65–68.

[II]

Jakobsons G., Gavrilova, G., **Belogradova, I.**, Megre, D., Aleksejeva, L. Conservation of *Liparis loeselii* (L.) Rich. in protected areas of Latvia and National Botanic Garden. (2nd World Scientific Congress), Delft. 2008. (In print).

[III]

Jakobsons G., **Belogradova I.**, Megre D. 2010. *Dactylorhiza fuchsii* as model object in *in vitro* culture study for development of terrestrial orchids. *Acta Biologica Universitatis Daugavpiliensis*. Suppl. 2: 41–48.

[IV]

Belogradova I., Jakobsons G. 2010 Latvijas savvaļas orhideju sugu bioloģiskās izpētes nepieciešamība *in vitro*. Proceedings of 51st international scientific conference of Daugavpils University, Daugavpils: DU akadēmiskais apgāds “Saule”, 90–94.

[V]

Jakobsons G., **Belogradova I.**, Roze D., Megre D. *Dactylorhiza baltica in vitro and in vivo*”, *Acta Biologica Universitatis Daugavpiliensis*, 2010. (In print, DU acceptance:23.08.2012).

[VI]

Roze D., **Belogradova I.**, Jakobsons G., Megre D. 2011. Some aspects of the ecology of *Ophrys insectifera*. International Conference for Academic Disciplines University of Malta. *International Journal & Arts and Sciences*, ASV, CD-Rom. ISSN:1944-6934:4(19): 107–120.

[VII]

Belogradova I., Grauda D., Jakobsons G., Rashal I. 2012. Usability of retrotransposon-based molecular markers to assess genetic diversity *Liparis loeselii*. *Acta Biologica Universitatis Daugavpiliensis*, Daugavpils, 12(1): 40–43.

[VIII]

Belogradova I., Grauda D., Lapina L., Jakobsons G., Roze D., Rashal I. Genetic diversity of Latvian *Liparis loeselii* population. (*Manuscript, 2012*). 5th Baltic Congress of Genetics, Kaunas, Vytautas Magnus University, Lithuania, 2012. The article will be submitted for publication after conference in Lithuania, on November 2012, Internationally indexed the scientific journal (ISI Master Journal List).

ACKNOWLEDGEMENTS

As the author of Doctorate paper, I would like to express gratitude to my Doctorate paper scientific advisor Dr.biol. **Gunta Jakobson**, who has given a great contribution in consulting my Doctorate paper, teaching and scientific work. I am very grateful to the staff of National Botanical Garden for understanding and support, especially to the colleagues of our Plant Biological Diversity Conservation *in vitro* department, personally : Dr.biol. **Dace Kļaviņa** and Dr.biol. **Dace Megre** for cooperation, support and encouragement. Special thanks to **Daina Roze** for cooperation and expeditions.

Big thanks to the colleague from Vilnius University Botanical garden Dr.biol. **Stase Dapkūniene** for cooperation.

The biggest thanks go to the staff of Biology Institute Plant Genetics Laboratory: Dr. hab. prof. **Issak Rashal**, special thanks to Dr.biol **Dace Grauda** for teaching, cooperation and the given opportunity to do molecular analyses. Thanks very much to **Aija Auziņa**, **Reinis Ornicāns**, study mates **Lita Lapiņa** and **Andra Miķelsone** for support in doing molecular analyses, data mathematical processing and consulting.

Sincere thanks to LU BF scientific degree candidate **Līga Strazdiņa** for support and consulting in data mathematical processing and analysis.

The biggest thanks to my English teacher **Nora Kalnača** for consulting and the enormous stamina in the process of Doctorate paper formation, as well as for cooperation and consulting classes during all the doctorate studies, and her patience several year to teach a lesson out of my German language to English language.

Big thanks to Daugavpils University for the given opportunities in the scientific field and support, particular thanks to SBI director Dr.biol., asoc.prof. **Inese Kokina** and all the staff for responsiveness and the opportunity to use the laboratory equipment in the workout of the genetics part of my paper.

Big gratitude to my friend **Anita Ciša** for the given moral support, cheerful advice in the right time and care during all the study period. Thanks to my family for support, patience and understanding.

I am grateful to anybody who I had the opportunity to meet and cooperate during the studies, in the scientific field or get in touch during the scientific conferences. Although the cooperation might have been short, I have acquired huge amount of knowledge and work experience from all that – thank you all!

IZMANTOTĀS LITERATŪRAS SARAKSTS LIST OF REFERENCES

Anderson A. B. 1990. Asymbiotic germination of seeds of some North American orchids. In: North American native terrestrial orchid propagation and production. (ed. C. E. Sawyers), Chadds Ford, Pennsylvania: Brandywine Consedrvancy, 75–80.

- Andrusaitis G. (ed.) 2003. Red Data Book of Latvia. Rare and threatened plants and animals. Vascular plants. Riga: Institute of Biology of University of Latvia, 3: 691.
- Arditti J. (ed) 1982. Orchid biology, reviews and perspectives. II. Cornell University Press, Ithaca, New York, 447.
- Arditti J. (ed.) 1992. Fundamentals of orchid biology. Permissions Department, Inc.: John Wiley and Sons: New York, U.S.A., 668.
- Arditti J., Ghani A. K. A. 2000. Tansley Review No. 110. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist*, 145: 367–421.
- Auniņš A. (red.) 2010. Eiropas Savienības aizsargājami biotopi Latvijā. Noteikšanas rokasgrāmata. Rīga: Latvijas dabas fonds, 320.
- Baroniņa V. 1994. Latvijas daba. 1. Rīga: Latvijas enciklopēdija, 255.
- Baskin J. M., Baskin C. C. 1998. Some considerations for adoption of Nikolajeva's formula system into seed dormancy classification. *Seed Science Research*, 18:131–137.
- Bateman R. M., Hollingsworth P. M., Preston J., Yi-Bo L., Pridgeon A. M., Chase M. W. 2001. Orchidaceae: Phylogenetics. In: *Genera Orchidacearum, Volume 2 Orchidaceae (part one)* (eds. Pridgeon A. M., Cribb P. J., Chase M. W., Rasmussen F. N). Oxford: Oxford University Press, 224–232.
- Bateman R. M., Hollingsworth P. M. 2004. Morphological and molecular investigation of the parentage and maternity of *Anacamptis x albuferensis* (*A. fragrans* x *A. robusta*), a new hybrid orchid from Mallorca. Spain, *Taxon*, 53: 43–54.
- Bennetzen J. L. 2000. Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. *Plant Molecular Biology*, 42: 251–269.
- Bidartondo M. I., Burghardt B., Gebauer G., Bruns T. D., Read D. J. 2004. Changing partners in the dark: Isotopic and molecular evidence of ectomycorrhizal liaisons between forest orchids and trees. *Proceedings of the Royal Society of London, B, Biological Sciences*, 271: 1799 – 1806.
- Bradford K. J., Nonogaki H. 2007. *Seed Development, Dormancy and Germination*. UK: Blackwell Publishing Ltd., 367.
- Braune W., Leman A., Taubert H. 1999. *Pflanzenanatomisches Praktikum I*. Berlin: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 368.
- Buttler K. P. 2007. *Field guide to orchids of Britain and Europe*. (Consultant-ed. Davies P.). Ramsbury, Marlborough: The Crowood Press Ltd., 288.
- Butler J. M. 2002. *Forensic DNA Typing: Biology and Technology behind STR Markers*. Academic Press, London, 335.
- Cameron K. M., Funk V. 1999. A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: evidence from RBCL nucleotide sequences. *Smithsonian Contributions to Botany No. 61*: 1 – 79.
- Cameron K. M., Chase M. W., Whitten W. M., Kores P. J., Jarrell D. C., Albert V. A., Yukawa T., Hills H. G., Goldman D. H. 1999. Evidence from rbcL nucleotide sequences. *American Journal of Botany*, 86: 208–224.
- Catling P. M. 1980. Rain-assisted autogamy in *Liparis loeselii* (L.) L. C. Rich. (Orchidaceae). *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 107: 525–529.
- Cepurīte B. 2005. Latvijas vaskulāro augu flora. 7: Orhideju dzimta (Orchidaceae). Rīga: LU BI Botānikas laboratorija, 73.
- Cherevchenko T. M., Lavrentyeva A. N., Ivannikov R. V. 2008. *Biotechnology of tropical and subtropical plants in vitro*. Scientific Book Project, Kyiv, Ukraine: Nauka Dumka, 560.
- Dearnaley J. D. W. 2007. Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza*, 17: 475–486.
- Dijk E. 1988. Mykorrhizen der Orchidee. III. Physiologische Aspekte bezüglich Kohlenstoff und Stickstoff. *Die Orchidee*, 39: 196–200.
- Dixon K. W., Kell S. P., Barrett R. L., Cribb P. J. (ed.) 2003. *Orchid conservation*. Kota Kinabalu: Natural History Publications (Borneo) Kota Kinabalu, 268.
- Dorland E., Willems J. H. 2006. High light availability alleviates the costs of reproduction in *Ophrys insectifera* (Orchidaceae). *Journal Europäischer Orchideen*, 38: 501–518.
- Dutra D., Kane M. E., Richardson L. 2009. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Cyrtopodium punctatum*: a propagation protocol for an endangered Florida native orchid. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 96: 235–243.
- Fast G. 1974. Über eine Methode der kombinierten generativen-vegetativen Vermehrung von *Cypripedium*

calceolus. Die Orchidee, 25: 125–139.

Faegri K., Van der Pijl L. 1979. The principles of Pollination Ecology. Oxford New York: Pergamon Press Ltd., 377.

Feschotte C., Jiang N., Wessler S. R. 2002. Plant transposable elements: where genetics meets genomics. Nature Reviews Genetics, May 3(5): 329–341.

Friar E. A. 2005. Isolation of DNA from plants with large amounts of secondary metabolites. Methods in Enzymology, 395: 3–14.

Gutowski J. M. 1990. Pollination of the orchid *Dactylorhiza fuchsii* by longhorn beetles in primeval forests of northeastern Poland Biology Conservation, 51: 287–297.

Gamborg O. L. 1970. The effects of amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture. Plant Physiology, 45: 372–375.

George E. F., Puttock D. J. M., George H. J. 1988. Plant culture media. 2. Commentary and analysis. Edington, Weatbury: Exegetics Ltd., 420.

Gebauer G, Meyer M. 2003. ¹⁵N and ¹³C natural abundance of autotrophic and myco-heterotrophic orchids provides insight into nitrogen and carbon gain from fungal association. New Phytologist, 160: 209–223.

Goldman D. H. 1999. A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: evidence from rbcL nucleotide sequences, 86: 208–224.

Gordon D. M. 1991. Variation and Change in Behavioral Ecology. Ecology, Ecological Society of America, 72: 1196–1203.

Hayman D. S. 1970. Endogene spore numbers in soil and vesicular - arbuscular mycorrhiza in wheat as influenced by season and soil treatment. Transactions of the British Mycological Society, 54: 53–63.

Havecker E. R., Gao X., Voytas D. F. 2004. The diversity of LTR retrotransposons. Genome Biology, 5: 225.

Hadley G. 1970. Non-specificity of symbiotic infection in orchid mycorrhiza. New Phytologist 69: 1015–1023.

Hedrick P. W., Kalinowski S. T. 2000. Inbreeding depression in conservation biology. Annual Reviews Ecology and Systematics, 31: 139–162.

Jakobsone G. 2008. Morphogenesis of wild orchid *Dactylorhiza fuchsii* in tissue culture. Acta Universitatis Latviensis, ser. Biology, 745: 17–23.

Jakobsone G. 2009. Germination and development of some terrestrial orchids *in vitro*. Acta Horticulturae, 812: 533–537.

Janečková P., Kindlmann P. 2002. Key factors affecting flowering performance and growth of *Dactylorhiza fuchsii*. In: Trends and fluctuations and underlying mechanisms in terrestrial orchid populations. The Netherlands: Backhuys, 99–113.

Juan A, Crespo M. B., Cowan R. S., Lexer C., Fay M. F. 2004. Patterns of variability and gene flow in *Medicago citrina*, an endangered endemic of islands in the western Mediterranean as revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP). Molecular Ecology, 13: 2679–2690.

Kabucis I. (red) 2001. Latvijas biotopi. Klasifikators (Habitats of Latvia. Classifier). Rīga: Preses nams, 96.

Kano K. 1968. Acceleration of the germination of so-called hard-to-germinate orchid seeds. American Orchid Society Bulletin, 37: 690–698.

Kalendar R., Schulman A. H. 2006. IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting. Nature Protocols, 1: 2478–2484.

Kalendar R., Antonius K., Smýkal P., Schulman A. 2010. iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. Theoretical and Applied Genetics, 121: 1419–1430.

Kalendar R., Grob T., Regina M., Suomeni A., Schulman A. 1999. IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. Theoretical and Applied Genetics, 98: 704–711.

Ket N. V., Hahn E. J., Park S. Y., Chakrabarty D., Paek K. Y. 2004. Micropropagation of an endangered orchid *Anoectochilus formosanus*. Biology Plantarum, 48: 339–344.

Knudson L. 1924. Further observations on non-symbiotic germination of orchid seeds. Botanical Gazette, 77: 212–219.

Knudson L. 1946. A new nutrient solution for orchid seed germination. American Orchid Society Bull, 15: 214–217.

Klavina D., Druva-Lusite I., Gailite A. 2009. Asymbiotic cultivation *in vitro* of the endangered Orchid *Cypripedium calceolus* (L.) and some aspects of *ex vitro* growth. Acta Horticulture, 812: 539–544.

- Kober V. 1972. *Cypripedium calceolus* – Anzucht aus Samen. Die Orchidee, 26: 27–30.
- Kottke I., Chacón–Suárez J. P. 2009. Mutualistic, root-inhabiting fungi of orchids identification and functional types. In: Proceedings of the Second Scientific Conference on Andean Orchids (eds Pridgeon A. M, Suarez J. P). Ecuador: Loja, 84–99.
- Kull T. 1988. Identification of clones in *Cypripedium calceolus* (L.) (Orchidaceae). Proceeding of the Estonian Academy of Science Biology, 37: 195–199.
- Kull T. 2002. Population dynamics of North Temperate Orchids. In: Orchid Biology: Reviews and Perspectives. (Arditti J. ed.), The Netherlands: VIII Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 139–165.
- Kubis S. E., Heslop-Harrison J. S., Desel C., Schmidt T. 1998. The genomic organization of non-LTR retrotransposons (LINEs) from three Beta species and five other angiosperms. Plant Molecular Biology, 36: 821–831.
- Kulikov 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.
- Kuusk V., Tabaka L., Jankevičiene R. 2003. Flora of the Baltic Countries. Compendium of Vascular Plants. Tartu: Estonian Agricultural University, 405.
- Lambers H., Chapin F. S.III, Pons T. L. 2008. Plant Physiological Ecology. New York: Springer, 604.
- Lande R. 1988. Genetics and demography in biological conservation. Department of Ecology and Evolution, University of Chicago, IL 60637; 16; 241: 1455–1460.
- Louis R. T. 1992. Trends in the pollination ecology of the Orchidaceae: evolution and systematics. Canadian Journal of Botany, 70: 642–650.
- Lucke E. 1971. The effect of biotin on sowings of *Paphiopedilum*. Bullation of the American Orchid Society, 40: 24–26.
- Lucke E. 1977. Naturstoffzusätze bei der asymbiotischen Samenvermehrung der Orchideen *in vitro*, Die Orchidee, 28: 185–191.
- Литвинов М. А. 1967. Определитель микроскопических почвенных грибов. Москва: Академия Наук СССР, 303.
- Leopold A. C. 1983. Volumetric components of seed imbibition. Plant Physiology, 73: 677–680.
- Masuhara G., Kimura S., Katsuya K. 1988. Seasonal changes in the mycorrhizas of *Betilla striata* (Orchidaceae). Transactions of the Mycological Society of Japan, 29: 25–31.
- McCormick M. K., Whigham D. F., O’Neill J. 2004. Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. New Phytologist, 163: 425–438.
- McIntyre D. K., Veitch G. J., Wrigley J. W. 1974. Australian orchids from seeds II. Improvement in techniques and further successes. American Orchid Society Bulletin, 43: 52–53.
- McKendrick S. L. 1996. The effects of shade on seedlings of *Orchis morio* and *Dactylorhiza fuchsii* in chalk and clay soil. New Phytologist, 134: 343–352.
- McKendrick S. L., Leake J. R., Read D. J. 2000. Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: transfer of carbon from ectomycorrhizal *Salix repens* and *Betula pendula* to the orchid *Corallorhiza trifida* through shared hyphal connections. New Phytologist, 145: 539–548.
- McMaster R. T. 2001. The population biology of *Liparis loeselii*. Loesel’s Twayblade in a Massachusetts Wetland. Northeast Naturalist, 8: 163–178.
- Medina R. D., Flachsland E. A., Gonzalez A. M., Terada G., Faloci M. M., Mroginski L. A. 2009. *In vitro* tuberization and plant regeneration from multimodal segment culture of *Habenaria bractescens* (Lindl.), an Argentinean wetland orchid. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 97: 91–101.
- Mitrofanova A., Pavlovic V., Mishra B. 2011. Prediction of Protein Functions with Gene Ontology and Interspecies Protein Homology Data. IEEE /ACM Trans. Comput. Biology Bioinform. 8: 775–784.
- Möller O. 1967. Der Vegetationsrhythmus von *Orchis mascula*. Die Orchidee, 18: 67–79.
- Möller O. 1985. Die Mineralsalze der Standortböden der europäischer Orchideen, Die Orchidee, 36: 118–121.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology of Plant, 15: 473–497.
- Nakamura S. I. 1962. Zur Samenkeimung einer chlorophyllfreien Erdorchidee *Galeola septentrionalis* (Reichb.) Zeitschrift für Botanik, 50: 487–497.

- Nara K., Hogetsu T. 2004. Ectomycorrhizal fungi on established shrubs facilitate subsequent seedling establishment of successional plant species. *Ecology*, 85: 1700–1707.
- Nei M. 1972. Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 106: 283–292.
- Norris J. R., Read D., Varma A. K. 1994. *Techniques for Mycorrhizal Research Methods in Microbiology*. San Diego, CA: Academic Press Inc, 928.
- Nečājēva J. 2012. Jūras piekrastes augu dīģšanas ekofizioloģija: sēklu miera periods un vides faktoru ietekme. Promocijas darbs, Rīga: LU, 94.
- Norstog K. 1973. New synthetic medium for the culture of preature barley embryous. *In Vitro*, 8: 307–308.
- Otero J. T., Ackerman J. D., Bayman P. 2002. Diversity and host specificity of endophytic Rhizoctonia-like fungi from tropical orchids. *American Journal of Botany*, 89: 1852–1858.
- Otero J. T., Ackerman J. D., Bayman P. 2004. Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. *Molecular Ecology*, 13: 2393–2404.
- Pakalne M. (ed.) 2008. *Mire Conservation and Management in Especially Protected Nature Areas in Latvia*. Riga: Jelgava Printig House, 183.
- Pierik R. L. M. 1997. *In vitro* culture of higher plants. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 63–65.
- Pillon Y., Qamaruz-Zaman F., Fay M. F., Hendoux F., Piquot Y. 2007. Genetic diversity and ecological differentiation in the endangered fen orchid (*Liparis loeselii*). *Conservation Genetics*, 8: 177–184.
- Probert, R. J., Smith R. D. 1986. The joint action of phytochrome and alternating temperatures in the control of seed germination in *Dactylis glomerata*. *Physiologia Plantarum*, 67: 299–304.
- Probert R. J., Smith R. D., Birch P. 1987. Germination responses to light and alternating temperatures in European populations of *Dactylis glomerata* (L. V.). The principal components of the alternating temperature requirement. *New Phytologist*, 102: 133–142.
- Queen R. A., Gribbon B. M., James C., Jack P., Flavell A. J. 2004. Retrotransposon-based molecular markers for linkage and genetic diversity analysis in wheat. *Molecular Genetical Genomics*, 271: 91–97.
- Ragupathy R., Banks T., Cloutier S. 2010. Molecular characterization of the Sasanda LTR copia retrotransposon family uncovers their recent amplification in *Triticum aestivum* (L.) genome. *Molecular Genetics and Genomics*, 283: 255–271.
- Rasmussen H. N. 1995. *Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plant*. New York: Cambridge University Press, 444.
- Rolsmeier S. B. 1993. The Saline Wetland-Meadow Vegetation and Flora of the North Platte River Valley in the Nebraska Panhandle. *Transactions of the Nebraska Academy of Sciences and Affiliated Societies*, 124.
- Rolfmeier S. B. 2007. *Liparis loeselii* (L.) Rich (yellow widelip orchid) a technical conservation assessment. USDA Forest Service, rocky Mountain Region. [Online, 43].
- Ruzin S. E. 1999. *Plant microtechnique and microscopy*. New York Oxford: Oxford University Press, 322.
- Saghai-Marouf M. A., Soliman K. M., Jorgensen R. A., Allard R. W. 1984. Ribosomal spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proceedings of National Academy of Science, USA*, 81: 8014–8019.
- Sangeeta N. Parankusam S., Kharshiing E. V., Sharma R. 2010. Inhibition of the Ubiquitin–Proteasome Pathway Alters Cellular Levels of Nitric Oxide in Tomato Seedlings. *Molecular. Plant*, 3: 854–869 first published (Online) 10.1093/mp/ssq033.
- Schulman A. H., Flavell A. J., Ellis T. H. N. 2004. The application of LTR retrotransposons as molecular markers in plants. *Molecular Biology Methods*, 260: 145–173.
- Schulman A. H. 2007. *Euphytica Molecular markers to assess enetic diversity*. Springer Science + Business Media B.V., *Euphytica*, 158: 313–321.
- Selosse M. A., Duplessis S. 2006. More complexity in he mycorrhizal world. *New Phytologist*, 172: 600–604.
- Shefferson R. P., Kull T., Tali K. 2007. Dormancy is associated with decreased adult survival in the burnt orchid, *Neotinea ustulata*. *Journal of Ecology*, 95: 217–225.
- Smith S. E., Read D. J. 1997 *Mycorrhizal symbiosis*. Amsterdam-Boston-London-New York Oxford-Paris-San Diego-San Francisco-Singapore-Sydney-Tokyo: Academic Press, an imprint of Elsevier Science, 605.
- Stephan G. 1988. Ergebnisse der asymbiotischen Samenvermehrung von *Spiranthes spiralis* (L.C. Rich) und einige darüber hinausgehende Betrachtungen, *Die Orchidee*, 39: 19–25.

- Taylorson R. B., Hendriks S. B. 1977. Dormancy in seeds. *Annual Review of Plant Physiology* 28: 331–354.
- Taylor L. D., Bruns T. D. 1997. Independent, specialized invasion of ectomycorrhizal mutualism by two nonphotosynthetic orchids. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 94: 4510–4515.
- Thompson D. I., Edwards T. J. 2006. Evaluating asymbiotic seed culture methods and establishing *Disa* (Orchidaceae) germinability *in vitro*: relationships, requirements and first-time reports. *Plant Growth Regulation*, 49: 269–284.
- Travis S. E., Maschinski J., Kein P. 1996. An analysis of genetic variation in *Astragalus cremnophylax* var. *cremnophylax* a critically endangerend plant, using AFLP markers. *Molecular Ecology*, 5: 735–745.
- Trouvelot A., Kough J. L., Gianinazzi-Pearson V. 1986. Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae* (eds. Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S.). Paris: INRA Press, 217–221.
- Trudell S. A., Edmonds R. L. 2003. Nitrogen and carbon stable isotope abundance nature and host-specificity of certain achlorophyllous plants. *New Phytologist*, 160: 391–401.
- Tutin T. G., Heywood V. H., Burges N. A., Moore D. M., Walters S. M., Webb D. A. 1980. *Flora Europaea*. Vol. 5. Cambridge: University Press, 452.
- Turcotte K., Srinivasan S., Bureau T. 2001. Survey of transposable elements from rice genomic sequences. *The Plant Journal*, 25: 169–179.
- Vandewoestijne S., Róis A. S., Caperta A., Baguette M., Tyteca D. 2009. Effects of individual and population parameters on reproductive success in three sexually deceptive orchid species. *Plant Biology*, 11: 454–463.
- Van der Pilj L., Dodson C. H. 1966. *Orchid flowers: their pollination and evolution*. Coral Gables, Florida: University of Miami Press, 604–606.
- Van Waes J. M., Debergh P. C. 1986. *In vitro* germination of some Western European orchids. *Physiology of Plant*, 67: 253–261.
- Vejsadova H. 2006. Factors affecting seed germination and seedling growth of terrestrial orchids cultured *in vitro*. *Acta Biologica Cracoviensis, Series Botanica*, 48: 109–113.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting *Nucleic Acids Research*, Oxford University, 23: 4407–4414.
- Vöth W. 1982. Die 'augeborgten' Bestäuber von *Orchis pallens* L.. *Die Orchidee*, 33: 196–203.
- Weinert M. 1990. Keimungsfördernde Faktoren bei schwerkeimenden europäischen Orchideen. 1. Bodenpilze und Agarbedeckung. *Die Orchidee*, 41: 127–133.
- Wagner J., Hansel A. 1994. *In-vitro* seed germination of *Cypripedium calceolus* (L.) at various embryogenic stages. *Angewandte Botanik*, 68: 5–9.
- Watts N. R., Sackett D. L., Ward R. D., Miller M. W., Wingfield P. T., Stahl S. S., Steven A. C. 2000. HIV-1 Rev Depolymerizes Microtubules to Form Stable Bilayered Rings. *Journal Cell Biology*, 150: 349–360.
- Weston C., Yee B., Hod E., Prives J. 2000. Agrin-induced acetylcholine receptor clustering is mediated by the small guanosine triphosphatase Rac and Cdc 42. *Journal Cell Biology*, 150: 205–212.
- Wotavová-Novotná K., Kindlmann P. 2007. Effects of sugars and growth regulators on *in vitro* growth of *Dactylorhiza* species. *Biology Plantarum*, 51: 198–200.
- Yamato M., Iwase K. 2008. Introduction of asymbiotically propagated seedlings of *Cephalanthera falcata* (Orchidaceae) into natural habitat and investigation of colonized mycorrhizal fungi. *Ecological Research*, 23: 329–337.
- Zimmer K., Hynson N. A., Gebauer G., Allen E. B., Allen M. F., Read D. J. 2007. Wide geographical and ecological distribution of nitrogen and carbon gains from fungi in pyroloids and monotropoids (Ericaceae) and in orchids. *New Phytologist*, 175: 166–175.
- Zimmer, E.A., Roalson, E.H. 2005. *Molecular Evolution Producing the Biochemical Data*. Part B, Volume 395, USA: Academic Press, Elsevier, 896.