



SZENT ISTVÁN EGYETEM

***A Himantoglossum adriaticum* – adriai sallangvirág
ex situ szaporításának módszertani fejlesztése**

Doktori értekezés tézisei

Gilián Lilla Diána

Gödöllő

2020

A doktori iskola

megnevezése: Biológiai tudományi Doktori Iskola

tudományága: Biológiai tudomány

vezetője: Dr. Nagy Zoltán
Egyetemi tanár, DSc
Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,
Biológiai tudományi Intézet

Témavezető: Dr. Nagy János György
Egyetemi docens, PhD, Habil.
Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,
Biológiai tudományi Intézet, Növénytan Tanszék

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

Tartalom

1.	A MUNKA ELŐZMÉNYEI, KITŰZÖTT CÉLOK.....	1
2.	ANYAG ÉS MÓDSZER.....	3
2.1.	A <i>H. adriaticum</i> magok <i>in vitro</i> aszimbiotikus csíráztatási kísérletei	3
2.1.1.	Az <i>in vitro</i> aszimbiotikus csíráztatásához felhasznált <i>H. adriaticum</i> magok eredete, tárolása, mennyisége	3
2.1.2.	Az <i>in vitro</i> aszimbiotikus magvetés kísérletei, táptalaj módosítások	3
2.1.3.	Az <i>in vitro</i> aszimbiotikus magvetés, tárolás az első protokormok megjelenéséig.....	5
2.2.	A <i>H. adriaticum</i> növények <i>in vitro</i> aszimbiotikus nevelési kísérletei	6
2.3.	A <i>H. adriaticum</i> mikorrhiza gombapartnereinek meghatározása gyökérből	7
2.3.1.	A mikorrhiza gombák kitenyésztése különböző táptalajokon	7
2.3.2.	Az optimális pH meghatározása a kitenyésztett gombák számára	8
2.3.3.	A Petri-csészében kitenyésztett, izolálásra beadott gombafaj meghatározása molekuláris genetikai vizsgálatokkal.....	8
2.3.4.	<i>H. adriaticum</i> gombapartnereinek meghatározása molekuláris genetikai vizsgálatokkal, gyökérszegmensből.....	8
2.4.	A <i>H. adriaticum</i> magok szimbiotikus csíráztatási kísérletei.....	9
2.5.	Az <i>in vitro</i> nevelt <i>H. adriaticum</i> növények kiültetési kísérletei.....	10
2.6.	Az adatfeldolgozás módszerei	11
3.	EREDMÉNYEK.....	12
3.1.	A <i>H. adriaticum</i> <i>in vitro</i> aszimbiotikus csíráztatásának eredményei.....	12
3.1.1.	Csírázási eredmények a pH gradiens mentén	12
3.1.2.	Csírázási eredmények a KCl mennyiségének változtatása esetén, optimalizált pH-jú (pH 7) MFA táptalajon.....	13
3.1.3.	Csírázási eredmények az NH ₄ NO ₃ mennyiségének változtatása esetén, optimalizált pH-jú (pH 7) MFA táptalajon.....	13
3.2.	A <i>H. adriaticum</i> <i>in vitro</i> aszimbiotikus nevelési eredményei	14
3.2.1.	A kókuszvíz hatása a csíranövények fejlődésére	14
3.2.2.	Az ezüst-nitrát hatása a csíranövények fejlődésére.....	14
3.2.3.	Kókuszvíz + ezüst-nitrát együttes használatának hatása a csíranövények fejlődésére.....	14
3.2.4.	Az <i>in vitro</i> nevelt növények fejlődése különböző tartási (fény és hőmérsékleti) körülmények között	15
3.3.	A <i>H. adriaticum</i> mikorrhiza gombapartnereinek meghatározása és vizsgálatai	15
3.3.1.	A <i>H. adriaticum</i> mikorrhiza partnereinek kitenyésztése különböző táptalajokon	15
3.3.2.	A kitenyésztett gombák számára optimális pH meghatározásának kísérlete	16
3.3.3.	A meghatározásra beadott <i>H. adriaticum</i> gyökérből kitenyésztett gombafaj izolálási eredménye és a vizuálisan, mikroszkóp alatt meghatározott további fajok	16
3.3.4.	A beadott <i>H. adriaticum</i> gyökérszegmensből meghatározásra került gombapartnerek	17
3.4.	A <i>H. adriaticum</i> magok szimbiotikus csíráztatási és nevelési kísérleteinek eredményei	19
3.5.	Az <i>in vitro</i> nevelt <i>H. adriaticum</i> növények kiültetési kísérleteinek eredményei	20
3.6.	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	21
4.	KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	22
5.	FELHASZNÁLT IRODALOM.....	25
	PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK	27

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, KITŰZÖTT CÉLOK

Doktori értekezésem témája a magyarországi vadon élő orchideafajok *ex situ* szaporításának lehetőségei. A közel 880 nemzetséget (CHASE et al. 2015) és 25-30.000 fajt számláló *Orchidaceae* – kosborfélék a növényvilág legfajgazdagabb családjá (CHASE et al. 2003; PILLON és CHASE. 2007). Ezzel egyidejűleg talán ez az egyik legnagyobb faji diverzitással rendelkező, viszont az egyik legsebezhetőbb növénycsoport is (CLEMENTE 2009). Az *Orchidaceae* családba lágyszárú, évelő fajok tartoznak, életformájuk alapján lehetnek epifita (fán lakó), litofita (sziklalakó), és teresztris (talajlakó) fajok. A talajban vagy fákon gyökerező orchideák között ugyanakkor érdemes említést tenni a kúszó életformáról is, amely a trópusokon, különösen a *Vanillioideae* alcsaládban igen elterjedt. A mérsékelt égövön vadon kizárólag teresztris fajokat találunk, így hazánkban is, talajlakó orchideafélék élnek. Magjaik aprók, endospermium hiányában egyedül képtelenek a csírázásra, ehhez úgynevezett orchid mikorrhizákra, szimbiota gombapartnerekre van szükségük. *Ex situ* csíráztatásuk és termesztésbe vonásuk még a szakemberek számára is igen nagy kihívást jelent. Rendkívüli szépségük miatt és az emberi faj örökös nagyravágyása és egzotikumok iránti vonzódása miatt egyre több próbálkozás indul el a termőhelyüktől távoli szaporításuk és nevelésük irányában.

Mindezek mellett, legtöbbjük nagyon érzékeny a környezetük legkisebb változására is. Ezért is váltak ilyen gyorsasággal és ekkora mértékben veszélyeztetett fajokká. Az elmúlt közel 30 év során egyre növekvő tendenciával csökkennek az európai teresztris orchidea fajok természetes élőhelyei (BARMAN és DEVADAS 2013), amely során a populációk csökkenése egyre több esetben visszafordíthatatlan, és vezet az adott populáció teljes kihalásához. A természetes élőhelyek csökkenése nem csak az emberi beavatkozásoknak köszönhető, hanem a klímaváltozásnak is, amely hatására az élőhelyek abiotikus és biotikus egyensúlyának megváltozása az orchidea populációkra is jelentős, leggyakrabban negatív hatást gyakorol.

A gyűjtési, birtoklási vágy okozta nagyfokú kereskedelem hatására több faj is kipsztlással fenyegetetté vált. Ennek megakadályozásában óriási szerepe van az 1973-ban, Washingtonban kiadott CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna) egyezménynek, mely az összes orchideafajt védelem alá helyezte, kereskedelmük a megfelelő védettségi kategória (Appendix I, Appendix II.) szerint szabályozottá vált (MATHEW és BURTON 1994). A fentiekkel egybecseng hazánk 1996. évi LIII. törvénye (a természet védelméről), miszerint Magyarországon minden orchideafaj *ex lege* védett.

A Biológiai Sokféleség Egyezményt, mely Rió de Janeiroban 1992-ben jött létre, Magyarország az 1995. évi LXXXI. törvénnyel hirdette ki. Az Egyezmény szellemében hazánk kötelezettséget vállalt a magyarországi fajok, biológiai rendszerek sokféleségének megőrzésére.

A 9. cikkely az *ex situ* megőrzés köteleességéről szól. Hazai orchideáink *ex situ* megőrzésével kapcsolatos kutatásaimat és dolgozatomat is ennek az Egyezménynek szellemében végeztem és készítettem el.

Doktori kutatásaim során a fent említett tényezők okán a hangsúlyt a hazánkban előforduló veszélyeztetett orchideafajok, kiemelten a fokozottan védett *Himantoglossum adriaticum ex situ* védelmére helyezve, munkám főbb célkitűzései a következők voltak:

- A *Himantoglossum adriaticum in vitro* csíráztatási és tenyésztési körülményeinek kidolgozása és optimalizálása: a módosított FA táptalaj pH, kálium (kálium-klorid) és nitrogén (ammónium-nitrát) optimumának meghatározása, a kókuszvíz és az ezüst-nitrát adagolás hatásának vizsgálata a faj magjainak csírázási idejére és erélyére, valamint a növénynevelés fizikai paramétereinek, optimális tartási körülményeinek megállapítása.

- A *Himantoglossum adriaticum* gyökeréből a vele együtt élő gombapartnerek kitenyésztése benomilos maláta agaron, bengálrózsás maláta agaron illetve PDA táptalajon.

- A *Himantoglossum adriaticum* gyökeréből kitenyésztett gombafajok pH optimumainak meghatározása PDA táptalajon, összevetése az orchidea faj táptalaj pH optimumával.

- A *Himantoglossum adriaticum* magok és a gyökeréből kitenyésztett gombafajok szimbiotikus csíráztatási kísérlete H1 zabagaron.

- A *Himantoglossum adriaticum* gyökeréből az endo- és ektomikorrhiza gombapartnerek izolálása, meghatározatása molekuláris genetikai vizsgálatokkal.

- Az *in vitro* nevelt *Himantoglossum adriaticum* növények kiültetése, életben maradási sikerességének megfigyelése az általunk kevert közegben és az élőhelyéről hozott talajban.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. *A H. adriaticum* magok *in vitro* aszimbiotikus csíráztatási kísérletei

2.1.1. Az *in vitro* aszimbiotikus csíráztatásához felhasznált *H. adriaticum* magok eredete, tárolása, mennyisége

Az *in vitro* csíráztatási kísérletekhez felhasznált *Himantoglossum adriaticum* magok a faj hazai élőhelyei közül négy helyről: a nagyteveli, a keszthelyi, a Sümeg-Tapolca közti és a kőszegi-hegységi élőhelyekről származtak. A maggyűjtésekre 2016-2019 július-augusztusában került sor, amikor a toktermések beértek, faluk megszáradt. A maggyűjtés során az alap terv az volt, hogy a négy élőhely populációjából 10-10 egyedről 3-3 tokot gyűjtünk össze, majd ezek magkeverékét vetjük el. A különböző években a populációk különböző virágzó egyed mennyisége és azok termésszáma azonban évente némi változásra kényszerített minket, hiszen a prioritás minden esetben az volt, hogy csak annyi tokot és magot hozzunk el az élőhelyekről a kísérletek elvégzéséhez, amely a populáció fennmaradását nem befolyásolja. Korábbi vizsgálataink alapján varianciaanalízis, valamint szignifikáns differencia számítás során már meghatároztuk, hogy nincs szignifikáns különbség a különböző élőhelyekről származó magok csírázási átlagai között (GILIÁN 2015), így a magvetés során tudtuk, hogy nem okoz gondot az, hogy az egyes magok más-más élőhelyről származnak, így az sem, hogy a magkeverékben milyen arányban oszlik meg az egyes élőhelyekről származó magok mennyisége. A magokat felhasználásukig sötét hűtőben, 4°C-on, 2 ml-es eppendorf csövekben tároltuk, szárítás nélkül. Minden kísérlet során a magvetések alkalmával megközelítőleg 500-500 db mag került a táptalajok felszínére.

2.1.2. Az *in vitro* aszimbiotikus magvetés kísérletei, táptalaj módosítások

Az *in vitro* csíráztatás során a lombikok sterilizálására, a táptalajfőzésre, annak steril boxban lombikokba adagolására, a magok előkezelésére, a magvetésekre és a csíranövények áttűzdelésére minden alkalommal a Szent István Egyetem Genetikai, Mikrobiológiai és Biotechnológiai Intézetének laboratóriumában, steril körülmények között került sor. Magvetéshez módosított FA táptalajt (R. ESZÉKI és SZENDRÁK 1992) használtam alapul, ezt módosítottam minden alkalommal a kísérleteimnek megfelelően (1. táblázat). Az elkészített táptalajt kuktába helyezve, forrástól számítva 40 percig, 120°C-on főzve sterilizáltam. Sterilizálás után a forró, még folyékony táptalajt hidegvizes kádban folyamatos mozgatással hűtöttem 3-5 percig, majd steril fülke alatt az előre sterilizált lombikokba kiadagoltam. Dermedés után a lombikok száját a fertőzések és a kiszáradás ellen kétszeres légáteresztő fóliával fedtem le. A sterilizált módosított FA táptalajt a magvetés előtt 5-7 nappal készítettem el. A táptalajkészítés és a magvetés között eltelt időt inkubációs időként használtam, melynek során az esetleges befertőzések még magvetés előtt

láthatóvá váltak a lombikokban. Az esetleges fertőzött lombikokat azonnal kiválogattam, sterilizáltam, kiöntöttem.

1.táblázat: Az egyes kísérletek során az általam módosított összetevők és mennyiségük az alap táptalajhoz képest.

Kísérlet	Összetevő(k)	Új mennyiség
Pepton cseréje	Tripton (pepton kazeinből)	1g/1200ml
Fe-EDTA cseréje	MS Mesoelements	6ml/1200ml
Heller-mikro	Heller-mikro	0,6ml/1200ml
pH sor	↑NaOH, ↓HCl	pH 4,5 – 8,5 beállításához megfelelő
K igény	KCl	40;120;200;280;360 mg/1200ml
N igény	NH ₄ NO ₃	40;120;200;280;360 mg/1200ml
Baktericid, növekedésserkentő, etilén-gátló	AgNO ₃	4mg/1200ml
Csírázás- és növekedésserkentő	Kókuszvíz	10;20;30;40;50 ml/1200ml
Baktericid, Csírázás- és növekedésserkentő, etilén-gátló hatás együttes megfigyelése	AgNO ₃ +kókuszvíz	4 mg/1200ml + 25ml/1200ml

Az egyes kísérletek során a következőket módosítottam a táptalajban: a pepton minden alkalommal triptonra cseréltem. Ennek oka, hogy a pepton általában szójafehérje, amelyet az ún. papain enzim részlegesen már lebontott. Ezzel szemben a tripton általában kazein (tejfehérje), amelyet az ún. tripszin bont le részlegesen. A triptonnal összevetve a peptonban magasabb a szénhidrát tartalom, de alacsonyabb a nitrogén tömegszázalékos aránya. A táptalaj magasabb felvehető nitrogén tartalmának növelése érdekében választottam a tripton. A Fe-EDTA-t minden alkalommal „MS mesoelements”-ként adtam a táptalajhoz. Az MS Mesoelements gyakorlatilag megfelel a Fe-EDTA-nak, de egyénileg, a Szent István Egyetem Genetikai, Mikrobiológiai és Biotechnológiai Intézetének laboratóriumában állítják össze, és folyékony halmazállapotú, ezért igen pontosan adagolható. A Heller-mikro (speciális mikroelemek) összetevői ugyanazok maradtak, de R. Eszéki Esztertől, az ELTE Fűvészkertjének orchidealabor vezetőjétől egy új koncentrátumú oldatot kaptam, melyből 0,5 ml/l mennyiséget kell használni a táptalajhoz, így annak koncentrátumát ennek megfelelően minden alkalommal 0,6 ml/1200 ml-re csökkentettem.

A 2016-os és 2017-es gyűjtésű magok esetében a faj számára optimális pH meghatározásának érdekében a táptalaj pH pontos beállításához annak csökkentésére 1 molos sósavat (hidrogén-

klorid), növelésére pedig nátronlúgot (nátrium-hidroxid) használtam. Ezek segítségével a következő öt féle pH-t állítottam be: pH 4,5; pH 5,5; pH 6,5; pH 7,5; pH 8,5.

A 2018. évben gyűjtött magok esetében az optimális kálium igény meghatározása érdekében a táptalaj kálium-klorid tartalmát változtattam 40; 120; 200; 280 és 360 mg/1200 ml mennyiségekre. Az optimális nitrogén igényt a triptonra való váltáson kívül a 2018. évben a táptalaj ammónium-nitrát mennyiségének 40; 120; 200; 280 és 360 mg/1200 ml-es változtatásával is megfigyeltem. Mindkét esetben a táptalajt a már az előző évek kísérleteinek eredménye alapján megállapított optimális pH-ra állítottam be.

A 2019-es évben, a kókuszvizes kísérlethez használt kókuszvíz élelmiszerként forgalmazott, zöld kókuszdióból nyert DM márkájú bio kókuszvíz volt.

A 2016-ban begyűjtött magok elvetésekor minden pH esetében 12-12 lombiknyi (összesen 60), a 2017-ben gyűjtött magok elvetésekor pedig 5-5 lombiknyi, tehát összesen 25 lombiknyi vetést készítettem el. A 2016. augusztusában begyűjtött magok elvetésére sajnos a laboratóriumi felszerelés berendelési folyamatának csúszása miatt csak 2017. január 30-án került sor. Ekkor az elvetett magok a hűtőben, 4°C-on tárolva, 5 hónapot álltak. A 2017. augusztusában gyűjtött magokat 4 nappal a begyűjtés után vetettem el.

A 2018-ban gyűjtött magok esetében mind a kálium-kloridos, mind az ammónium-nitrátos sor esetében minden mennyiségből 3-3 lombiknyit, tehát összesen 15-15 lombikkal vetettem el.

2.1.3. Az *in vitro* aszimbiotikus magvetés, tárolás az első protokormok megjelenéséig

A *H. adriaticum* magjainak *in vitro* aszimbiotikus táptalajra vetése előtt a magokon klórmentes előkezelést alkalmaztam, amely során 10 g klórmentes 90 cm³ desztillált vízben feloldva, azt szűrőpapíron átszűrve, annak szűrletét használtam.

A kapott szűrt oldatot a kémcsövekbe előre kiadagolt elvetendő magokra a kémcsövek egynegyedéig feltöltöttem, dugóval lezártam, majd a magokat 10 percig állni hagytam a szűrletben. Időközben többször megrázogattam a kémcsöveket annak érdekében, hogy a szűrlet a lehető legjobb mértékben érje a magok és a kémcső teljes felületét. Az utolsó 2 percre fejjel lefelé fordítottam a kémcsöveket azért, hogy a magok felülre, a kémcső szájához közelre üljenek ki, így amikor óvatosan kisedtem a dugót, hogy a klórmentes szűrletet kiengedjem, a magok a kémcső falára ragadva ott maradtak.

Az előkezelt magvakat steril fülkében, steril szikével juttattam a kémcsövek faláról a lombikokban levő, steril körülmények között korábban elkészített táptalajok felszínére, majd a magok egyenletes eloszlása érdekében egy csepp steril vizet a táptalajra juttatva steril üvegbot segítségével szélesztettem őket. Ezek után a lombikok száját a fertőzések és a kiszáradás ellen kétszeres légáteresztő fóliával lefedtem, majd dobozba helyezve egy héti szobahőmérsékleten, sötétben tároltam az esetleges befertőzések kialakulása, és annak kiválogatása érdekében.

Az inkubációs idő letelte után a lombikokat 4°C-os sötét hűtőbe helyeztem 3 hónapra, majd a csírázás, illetve a hajtáskezdemények megjelenéséig a lombikokat sötét dobozban, 22°C-os nevelőszobában tároltam.

2.2. A *H. adriaticum* növények *in vitro* aszimbiotikus nevelési kísérletei

2017. júniusában a már korábban, 2014-ben vetett magokból kelt protokormokat tartalmazó lombikokat különböző hőmérsékletű és fényforrású szobákba helyeztük annak érdekében, hogy meghatározzassuk a csíranövények optimális hőmérséklet igényét. Az első szoba egy fix 21°C-os, POLYLUX 36W/F840, 4000K fénycsövekkel, 16 óra fény, 8 óra sötét periódusú mesterséges megvilágítással felszerelt fényszoba volt. A második szoba délkeleti fekvésű ablakkal rendelkezett, a hőmérséklet nyáron nappal 28-30°C-os maximumú, éjjel 24°C-os minimumú volt, és természetes fény érte a lombikokat. A harmadik szoba északi tájolású ablakkal rendelkezett, a hőmérséklet nyáron nappal 26°C-os maximumú, éjjel 22°C-os minimumú volt, természetes fény érte a lombikokat.

2018. júniusában egy új, fix 24°C-os légkondicionált tetőtéri szobát sikerült találnunk az Egyetemen, melynek déli fekvésű ablakánál voltak a lombikok tárolva természetes fényen.

E fent említett 4 szobában az idő múlásával az *in vitro* nevelt növények állapota alapján három kategóriát különböztettünk meg: zöld, barna és halott. A „zöld” kategória azt jelzi, hogy az *in vitro* növény jól érzi magát, azaz minden rendben van a tartási körülményekkel. A „barna” már valamilyen negatív változást jelez a körülményekben. Ebből a kategóriából kettő lehetőség van a jövőre nézve: vagy új, zöld, egészséges hajtás indul meg, vagy a növény elpusztul. Tehát ez a kategória a kettő közötti állapotot jelzi, ami már rosszabb, mint a „zöld” állapot, de még akár visszafordítható. A „halott” kategória pedig egyértelműen a nem megfelelő tartási körülmények következménye.

A 2019. évben a csíranövények fejlődésének elősegítésére a kísérleteimhez két új komponenst vezettem be az addig kitapasztalt optimális táptalaj összetevői mellé: az ezüst-nitrátot és a kókuszvizet. Külön-külön kísérletekben figyeltem meg az optimális táptalajhoz adott 4 mg/1200 ml mennyiségű ezüst-nitrát, a 10; 20; 30; 40 és 50 ml/1200 ml mennyiségű kókuszvíz, valamint a 4 mg/1200 ml ezüst-nitrát és 25 ml/1200 ml kókuszvíz együttes hatását a *H. adriaticum* csíranövények fejlődésére. Ezeket a lombikokat az ELTE Fűvészkert orchidealaborjának fényszobájában, fix 24°C-on, az ablak mellett, természetes fényen, a fénycsövek fényétől eltakartan tároltuk.

2019-ben az ezüst-nitrátos táptalaj esetében 10 db, a kókuszvizet táptalaj esetében 10 db, az ezüst nitrát + kókuszvizet táptalajos kísérlethez pedig 25 db lombiknyi tűzdelést csináltam, minden lombikba 1-1 db, kb 0,3-1 cm zöld hajtáskezdeménnyel rendelkező csíranövényt tűzdelve.

2.3. A *H. adriaticum* mikorrhiza gombapartnereinek meghatározása gyökérből

A *H. adriaticum* mikorrhiza gombapartnereinek meghatározása céljából a gyökérminták a legerősebb, kőszegi-hegységi állomány egyedeiről származtak. A gyökérmintákat 2019. áprilisában gyűjtöttük be, és már másnap az előre elkészített, különböző féle táptalajokra helyeztük a Szent István Egyetem Növényvédelmi Intézetének laboratóriumában, steril körülmények között.

2.3.1. A mikorrhiza gombák kitenyésztése különböző táptalajokon

A mikorrhiza gombák kitenyésztési kísérleteit a Szent István Egyetem Növényvédelmi Intézetének laboratóriumában végeztük. A mikorrhiza gombák kitenyésztéséhez három féle táptalajt használtunk. Az első a benomilos maláta agar, amelyet azért választottunk, mivel a benomil szelektíven mérgező az Ascomycoták legtöbb tagjára, míg a Basidiomycoták tagjai nagyrészt rezisztensek, így reméltük, hogy ezeken a táptalajokon kitenyésznek mikorrhizának vélhető bazídiumos gombák (BOLLEN és FUCHS 1970).

A második fajta táptalaj a bengálrózsás maláta agar volt, amelyet azért választottunk, mivel a bengálrózsa lassítja a gombák fejlődését, így reméltük, hogy a kitenyésző gombák esetleg könnyebben megfigyelhetők, átolthatók lesznek (SMITH és DAWSON 1944).

A fenti két táptalaj esetében az alap táptalaj a THOM és CHURCH (1926) alapján kifejlesztett, gombatenyésztéshez használt maláta agar volt.

A harmadik fajta táptalajként pedig a gombatenyésztésre leggyakrabban alkalmazott PDA táptalaj standard változatát használtuk (DHINGRA és SINCLAIR 1986), mivel a gombák ezen nőnek a legjobban és leggyorsabban. A kloramfenikolt antibakteriális hatása miatt adtuk a táptalajhoz, a baktériumok megjelenésének elkerülése végett.

A gyökerek begyűjtésekor 2019. áprilisában azokat csapvízben alaposan lemosva tároltuk és szállítottuk. A gyökérmintákat a laboratóriumba érkezés után ismét alaposan átmostuk csapvízben, majd 1-2 cm-es darabokra vágtuk azokat. A minták 2/3-ad részét 1%-os nátrium-hipoklorit (NaOCl) oldatba helyeztük 5 percig. Ezeket a mintákat utána háromszor 10 percig steril desztillált vízzel mostuk, és így kerültek BM, BRM és PDA táptalajokat tartalmazó Petri-csészékbe. A minták maradék 1/3-ad része eltérő előkezelést kapott: a csapvizes mosás után a gyökérdarabokat 30 másodpercre 70%-os etanolba, majd 90 másodpercre 4%-os nátrium-hipoklorit oldatba helyeztük. Ez után a mintákat háromszor 5 percig steril desztillált vízben mostuk, majd Petri-csészébe elkészített PDA táptalajra helyeztük.

A gyökérszegmensek táptalajokra helyezése után a gombák kitenyészéséig vártunk, majd azokat folyamatosan átoltottuk friss PDA táptalajra egészen addig, amíg tiszta tenyészeteket nem kaptunk. A tiszta tenyészetekről fotókat készítettünk, majd a belőlük vett mintákat Olympus mikroszkóp alatt, fáziskontrasztos megvilágítással, 400x-os és 600x-os nagyítás alatt, morfológiai bélyegek alapján próbáltuk meghatározni.

2.3.2. Az optimális pH meghatározása a kitenyésztett gombák számára

A BM, BRM és PDA táptalajokon kitenyésztett különböző gombafajok pH optimumának meghatározására pH sort: pH 4,5; pH 5,5; pH 6,5; pH 7,5 és pH 8,5-es PDA táptalajokat készítettünk 5,9 cm átmérőjű Petri-csészékbe, a gombafajokat ezekre átoltottuk, majd egy 14 napos kísérlet során megfigyeltük az egyes gombák növekedési ütemét a különböző pH-kon.

Minden gombafajt az 5 különböző pH-ra háromszoros ismétlésben oltottunk át, tehát egy gombafaj esetében 15 Petri-csészével dolgoztunk. Mindvégig steril boxban, steril eszközökkel dolgoztunk a Szent István Egyetem Növényvédelmi Intézetének laboratóriumában. Az eredeti gombamintát tartalmazó Petri-csészéből úgynevezett dugófúró segítségével 5 mm átmérőjű mintákat szűrtünk ki, majd ezeket steril szikével kiemelve, a micéliumokkal lefelé a különböző pH-jú táptalajokra helyeztük. Ez után a pH sorra helyezett mintákat tartalmazó Petri-csészéket 14 napon keresztül naponta egyszer bescanneltük, majd az eltelt napok során az átlagos növekedési felületet ImageJ programmal megmértük mm²-ben. A kapott adatokból R programmal diagramokat készítettünk minden egyes gombafaj különböző növekedési mértékéről a pH gradiens mentén, majd ezt összevetettük a *Himantoglossum adriaticum* talaj- illetve táptalaj pH optimumával.

2.3.3. A Petri-csészében kitenyésztett, izolálásra beadott gombafaj meghatározása molekuláris genetikai vizsgálatokkal

A Szent István Egyetem Növényvédelmi Intézetének laboratóriumában, Petri-csészében, bengálrózsás agaron kitenyésztett, a mikroszkóp alatt leginkább mikorrhizának tűnő mintát a BIOMI Biotechnológiai Szolgáltató Kft. DNS-laboratóriumába adtuk be izolálásra.

A többi kitenyésztett mintát azért nem küldtük el, mert mikroszkóp alatt megfigyelve, egyértelműen kijelenthető volt, hogy nem bazídiumos gombák tenyészték ki a táptalajokon. Ezek család vagy nemzetség szinten mikroszkóp alatt meghatározható fajok voltak, olyanok, amelyek a talajban általánosan előforduló gombafajok. Ezek pontos faji meghatározása molekuláris genetikai vizsgálatokkal nagyon költséges lett volna, és sajnos nem állt rendelkezésünkre akkora keret. Az *in vitro* kísérletbe azonban bevontuk őket, és ha a későbbiekben pozitív eredményt érünk el velük, akkor a továbbiakban bármikor meghatározhatók lesznek faji szinten.

A kapott jegyzőkönyv alapján az ITS1-2 régió szekvenálásának módszere:

Az ITS4 primerrel készült szekvencia végéről a felkért laboratóriumban az ITS1 primer szekvenciáját levágták és az így kapott szakaszt az átfedő szakaszok alapján az ITS1 primerrel készült szekvenciával összeillesztették. Az így kapott ITS1-2 régió kétszeres lefedettséggel rendelkezik, amelyet az NCBI adatbázis szekvenciáival szemben illeszttek. Az illesztést a BLAST algoritmus segítségével végezték, és az illesztést csak a tenyésztendő törzsekre szűkítették.

A DNS izolálás az ABI Prepman Ultra Kittel történt (INTERNET-1). A kiértékelés a BioNumerics 7.6.3-as verziójával történt (készítette: Applied Maths NV. Elérhető innen: <http://www.applied-maths.com>).

Az identifikálás során WHITE et al. (1990) és COLE et al. (2014) módszereit alkalmazták.

2.3.4. *H. adriaticum* gombapartnereinek meghatározása molekuláris genetikai vizsgálatokkal, gyökérszegmensből

A gombapartnerek izolálásához a Kőszegi-hegység állományából kiválasztott egyed egy darab, körülbelül 10 cm hosszúságú gyökérszegmensét használtuk fel. Az anyató mellett a talajt finoman addig kapartuk, míg az előbukkanó gyökerekből egyet óvatosan lemetszhattünk. Ezt követően a földet visszaegyengettük a tő tövéhez, hogy az a legkevésbé sérüljön. A lemetszett gyökérdarabot alaposan lemostuk, a felszíni szennyeződésektől megtisztítottuk. Ez után a letisztított gyökérszegmenst centrifugacsőbe helyezve még aznap Gödöllőre szállítottuk. Az izolálást és a szekvenálást a BIOMI Biotechnológiai Szolgáltató Kft. DNS-laboratórium munkatársai végezték. Az izolálás a NucleoSpin Microbial DNA Isolation Kit protokollja alapján történt. A szekvenálást a Loop Genomics Mycobiome – fungal, kifejezetten gombákra kifejlesztett Kit alapján végezték (LoopSeq™ Mycobiome 18S ITS Kit (Loop Genomics)). Ez a Kit a teljes 18S-ITS1-ITS2 régiót képes szekvenálni. A Kit használata során a felhasználói kézikönyv (INTERNET-2) és az útmutató (INTERNET-3) alapján dolgoztak.

A DNS többféle módon lett izolálva, folyékony nitrogénes feltárással.

Az Illumina szekvenálást MiSeq gépen végezték V3(600)-as kittel, 2*300bp paired-end readekkel. A Loop Genomics Mycobiome Kit alapján, a szekvenálás során kapott eredményeket a Unite illetve a Silva nemzetközi adatbázisokból értékeltük ki.

2.4. *A H. adriaticum* magok szimbiotikus csíráztatási kísérletei

A csíranövények szimbiotikus csíráztatásához és neveléséhez 2019. szeptemberében úgynevezett „H1 oat medium”, finomra darált zabpelyhes táptalajt készítettem CLEMENTS et al. (1986), módosítva RASMUSSEN et al (1990) alapján. A finomra őrölt zabot zabpelyhelyből készítettem, melyet alaposan átdaráltam, majd apró szemű konyhai szitán átszitáltam. A táptalajkészítés menete és tárolása a MFA táptalajával megegyezően zajlott.

1 hét inkubációs idő elteltével a táptalajokra vettem körülbelül 200-200 db *Himantoglossum adriaticum* magot az aszimbiotikus magvetés során alkalmazott módon úgy, hogy a zabpelyhes táptalajnak csak az egyik felén szélesztettem szét a magokat. 4 nap inkubációs idő elteltével a zabpelyhes táptalaj másik oldalára, a magoktól legtávolabbi pontra helyeztem egy-egy 5 mm átmérőjű *H. adriaticum* gyökérből kitenyészített gomba mintát. Minden gombafaj esetében 1 kísérleti szimbiotikus vetést készítettem.

Az *in vitro* szimbiotikus csíráztatás során a magok-gombák közötti kölcsönhatást Olympus mikroszkóp alatt, fáziskontrasztos megvilágítással, 400x-os és 600x-os nagyításon figyeltük meg, róluk a mikroszkópos képeket a mikroszkóp Olympus lencsájén keresztül készítettem.

2.5. Az *in vitro* nevelt *H. adriaticum* növények kiültetési kísérletei

A speciálisan összeállított ültetőközegbe való kiültetési kísérlethez 2017-ben vetett és kelt 2 éves, az eredeti élőhelyről hozott talajba való kiültetési kísérlethez pedig 2014-ben vetett, 2015-ben csírázott 4 éves *in vitro* nevelt növényeket használtam fel. 2019. júliusában összesen 8 egyedet ültettem ki. Ezek közül 6 egyedet speciálisan összeállított ültetőközegbe ültettem, mely tölgyavart, kvarchomokot, mészkőzúzalékot és fenyő mulcsot tartalmazott 2:1:1:1 arányban. A 9 cm átmérőjű, 9,5 cm magas ültetőcserép aljába egy marék égetett agyaggolyót helyeztem a megfelelő vízelvezetés érdekében. Erre egy egység tölgyavar, egy egység kvarchomok, egy egység mészkőzúzalék, egy újabb egység tölgyavar és végül egy egység mulcs került. Ebbe a közegbe ültettem be egyesével a 6 db *in vitro* nevelt növényt. Ezek után 3-3 db kiültetett egyedet különböző módon tartottam: 3 egyed esetében a Greenman Kft által a kísérletemhez felajánlott Greenman Floraria folyékony, élő, koncentrált multimikrobiális készítmény 2,5 ml/1 víz arányú hígításával öntöztem. A Greenman Florariában található összcsíraszám legalább $1,0 \times 10^6$ db/cm³. A másik 3 egyedet az aszimbiotikus csíráztatáshoz használt, általam módosított FA táptalaj folyékony, agar nélküli változatával öntöztem. Ezt a 6 egyedet egymás mellett szobahőmérsékleten, napközben 24-28°C, éjjel 18-20°C-os hőmérsékleten, természetes fénynél tartottam.

A maradék 2 egyedet pedig a faj kőszegi-hegységi élőhelyéről hozott talajba ültettem be egy 27 cm átmérőjű cserépbe, majd azt a Szent István Egyetem Botanikus Kertjében helyeztem el, és a nagy szárazságban esővízzel öntöztem, egyéb esetben a természet által adott minőségű és mennyiségű nedvességhez és fényhez jutottak.

A kísérleti egyedeket decemberig naponta figyeltem és fotóztam.

Decemberben a cserépet a Botanikus Kert sziklakertjében a cserép pereméig a talajba beástam annak érdekében, hogy a fagy hatására a cserép a teljes talajmennyiséggel együtt ne fagyjon át, majd a december végi, január eleji fagyok eljövetele előtt nádból a cserép 2/3-ad része köré gúlát készítettem, amely a téli fagyoktól a növényeket bizonyos fokig védi, 1/3-ad részen viszont enged be fényt és nedvességet, így valamelyest utánozva az élőhelyi fedetlen telelést.

2.6. Az adatfeldolgozás módszerei

A munkám során kapott adatokat Microsoft Excel táblázatba vittem fel, az alpműveleteket ezzel a programmal számoltam ki. A statisztikai elemzéseket és a diagramokat R statisztikai szoftverben készítettem el (R CORE TEAM 2017).

A Petri-csészében kitenyésztett gombák esetében a diagramokon lineáris trendvonalat illesztettünk a pontokra, és kiszámítottuk az úgynevezett korrelációs együttható négyzetét (r^2). Ha a korrelációs együttható (r) értéke -1 és $+1$ -hez közel esik, az azt jelenti, hogy a két változó (esetünkben a pH és a növekedés mértéke) szoros viszonyban van egymással (korrelál). Az eredményt ezután $0,05$ -ös szignifikancia szinten vizsgáltuk t -próbával. Ehhez felhasználtuk a t -eloszlás táblázatát, melynél, ha a korrelációs együttható magasabb, mint a minták számához (esetünkben $n=14$ minta (nap) $v=n-2$ azaz $v=12$) tartozó t -érték, úgy a korreláció szignifikáns (HOGG és TANIS 1998). Ez után varianciaanalízissel (ANOVA) meghatároztuk a p -értéket, amely alapján, ha $p < 0,05$, akkor van, ha $p > 0,05$, akkor nincs szignifikáns különbség a gombák különböző pH-kon kapott növekedési átlagai között.

A *H. adriaticum* protokormok és csíranövények mennyisége és növekedési üteme a lombikon belül vizuális megfigyeléseken alapult.

A dolgozatban található fényképeket én készítettem a kísérletek során.

3. EREDMÉNYEK

3.1. *A H. adriaticum in vitro* aszimbiotikus csíráztatásának eredményei

3.1.1. Csírázási eredmények a pH gradiens mentén

Mivel a 2016. augusztusában gyűjtött magokat csak a begyűjtés után 5 hónappal, 2017. január 30-án tudtam elvetni, a lombikok 63%-a befertőződött. Így a 12-12 db lombik helyett minden pH esetben 5-5 db sterilen maradt lombikot használtunk fel a kísérletünkhöz. Ebből levonható, hogy a *Himantoglossum adriaticum* magjai hűtőben, 4°C-os hőmérsékleten, bármilyen szárítási kezelés nélkül nem tárolhatók hosszú időszakon keresztül. A kezeletlen magok életképessége 5 hónap után radikálisan lecsökkent, a fertőződési arány pedig jelentősen nőtt.

A magmaradt és felhasznált 5-5 lombiknyi magvetésből, a pH gradiens mentén kapott csírázás során az első protokorm a magvetéstől számított 6. hónapban jelent meg, a 6,5-es, a 7,5-es és a 8,5-es pH-n egyaránt. A magvetéstől számított 7. hónapra a protokormképződés minden lombikban megkezdődött. A legjobb protokormképződési arányt egyértelműen a 7,5-es pH-n tapasztaltuk. A magvetéstől számított 12. hónaptól kezdve a protokormképződés lecsökkent, a fényre került protokormok közül is több elpusztult, ez a 8,5-es, illetve a 4,5-es pH-jú lombikok esetében szembetűnő, de a 7,5-es pH esetben is tapasztalható volt. A magvetéstől számított 20. hónapban az összcsírázási arány 0,2%, kizárólag a 7,5-es pH-jú lombikokban pedig 0,76% volt.

A 2017. augusztusában, pH sorra vetett magok esetében mind a 15-15 db lombik steril maradt. A 2017-ben vetett magok esetében az első protokorm a magvetéstől számított 7. hónapban jelent meg, pH 6,5-en. Érdekes, hogy míg 2016-os gyűjtésű magok esetében a 4,5-es pH-jú táptalajokon, ha kevés is, de alakultak ki protokormok, addig a 2017-ben gyűjtött magokból egyetlen protokorm sem képződött 20 hónap alatt pH 4,5-en. A magvetéstől számított 20. hónapra ismét a 7,5-es pH-n keletkezett a legtöbb protokorm (28 db), de pH 6,5-n is meglehetősen jó csírázást értünk el (23 db protokorm). Ráadásul először a 6,5-es pH-n indult meg a protokormképződés. A magvetéstől számított 12. hónapban, az augusztusi „kényszerszabadság” időszaka alatt a Szent István Egyetemen elektromos hálózati karbantartás volt, melyről nem értesültem, így a légkondicionált helyiségben, ahol a csíranövényeket és protokormokat tartalmazó lombikjaim voltak, a légkondicionáló kikapcsolása miatt (amely az áram visszajövetelével nem indult automatikusan újra) majdnem a teljes protokorm és csíranövény állományunk elpusztult. Ez a visszaesés látható a 12-14. hónap között. Ezeket a lombikokat 1 hónapra sötét, 4°C-os hűtőbe helyezve néhány, 6,5-es és 7,5-es pH-jú lombikban újabb protokormok jelentek meg, illetve a magvetéstől számított 16. hónapban az addig nem csírázó 6,5-es és 7,5-es pH-jú lombikokban is jelentek meg protokormok. 20 hónappal a magvetés után az összcsírázási arány a 4,5-es pH-jú lombikokban 0%, az 5,5-es pH-jú lombikokban 0,12%, a 6,5-es pH-jú lombikokban 0,92%, a 7,5-es pH-jú lombikokban 1,12%,

míg a 8,5-es pH-jú lombikokban 0% volt. Átlagolva a két legjobb csírázást elért, pH 6,5; illetve pH 7,5-es lombikokat, a csírázási arány 1% volt. Ha azonban minden pH-nál csak azt a lombikot vesszük figyelembe, amelyikben a legtöbb protokorm alakult ki a magvetés utáni 20. hónapra, úgy a csírázási arány az 5,5-es pH-jú lombikokban 0,6%-ra, a 6,5-es pH-jú lombikokban 3,2%-ra, a 7,5-es pH-jú lombikokban pedig 4%-ra nőtt. Mivel a kezdeti csírázási arány pH 6,5-en volt a legjobb, ezért a további kísérleteink során a táptalajt a kettő közötti, pH 7-re állítottuk be.

3.1.2. Csírázási eredmények a KCl mennyiségének változtatása esetén, optimalizált pH-jú (pH 7) MFA táptalajon

A KCl soron az első protokorm a magvetéstől számított 6. hónapban, 2019. áprilisában jelent meg, a 200 mg/1200 ml kálium-kloridot tartalmazó MFA táptalajon. Az idő múlásával a legjobb csírázási eredményt 13 hónappal a magvetés után, 76 db protokorm kifejlődésével (15,2%) a 280 mg/1200 ml kálium-kloridot tartalmazó lombikok érték el, amely egy kicsit magasabb mennyiség, mint amennyit az eredeti FA táptalaj receptje tartalmaz. Ezt követően, a második legtöbb protokorm, 42 db (8,4%), érdekes módon az eredeti recepthez képest kicsit kevesebb, 120 mg/1200 ml kálium-klorid mennyiség esetében fejlődött ki. Ezt követte a még kevesebb, 40 mg/1200 ml KCl tartalmú táptalaj 38 db protokormmal (7,6%), majd a 200 mg-ot tartalmazó, 26 db protokormmal (5,2%). A 360 mg/1200 ml KCl-t tartalmazó táptalajon egyáltalán nem fejlődött ki protokorm.

A kísérlet igen érdekes eredményeket adott, hiszen a legjobb eredményt az eredeti táptalaj recepthez képes kicsit több, majd a második legjobbat az ahhoz képest kicsit kevesebb kálium-klorid mennyiséggel kaptuk, az eredeti recept alapján adagolt mennyiség viszont hiába kedvez kezdetben a protokormok gyors kialakulásának, a kísérlet végére a második legrosszabb eredményt adta mennyiségi tekintetben.

3.1.3. Csírázási eredmények az NH_4NO_3 mennyiségének változtatása esetén, optimalizált pH-jú (pH 7) MFA táptalajon

Az NH_4NO_3 soron az első protokorm a magvetéstől számított 8. hónapban, 2019. júniusában jelent meg, a 120 mg és a 280 mg/1200 ml ammónium-nitrátot tartalmazó MFA táptalajokon. Az idő múlásával a legjobb csírázási eredményt 13 hónappal a magvetés után, 22 db protokorm (4,4%) kifejlődésével a legkevesebb mennyiségű, 40 mg/1200 ml ammónium-nitrátot tartalmazó lombikok érték el, amely lényegesen kevesebb, mint amit az eredeti FA táptalaj receptje tartalmaz. Ezt követően, a második legtöbb protokorm a még mindig az eredeti receptnél kevesebb, 120 mg/1200 ml ammónium-nitrát mennyiség esetében fejlődött ki, számszerűen 16 db (3,2%). 200 mg/1200 ml NH_4NO_3 tartalomnál 6 db (1,2%), 280 és 360 mg-nyi mennyiség esetében pedig mindössze 3 (0,6%), illetve 2 db (0,4%) protokorm alakult ki 13 hónap alatt. Az eredményekből

tisztán látszik, hogy az ammónium-nitrát mennyiségének emelése kifejezetten negatív hatással van a *H. adriaticum* protokormok fejlődésére, a 360 mg/1200 ml mennyiséget tartalmazó lombikokban például egyáltalán nem fejlődött ki protokorm a magvetéstől számított 12 hónapban.

3.2. A *H. adriaticum* in vitro aszimbiotikus nevelési eredményei

3.2.1. A kókuszvíz hatása a csíranövények fejlődésére

Egy hónappal a csíranövények kókuszvízes MFA táptalajra tűzdelése után szemmel látható volt a kókuszvíz növekedésserkentő hatása. Megfigyelhető, hogy a kókuszvíz mennyiségének növelésével a növekedésserkentő hatás is növekszik, már 10 ml/1200 ml mennyiség is megindítja a zöld levél fejlődését, de a mennyiség növelésével egyre erőteljesebb ez a folyamat, 40 ml/1200 ml mennyiségnél már a gyökérfejlődés is megindul, 50 ml/1200 ml mennyiségnél pedig a gyökérfejlődés mértéke is fokozódik.

A 2,5 hónappal a kókuszvízes táptalajra tűzdelés után a 10- illetve 20 ml/1200 ml kókuszvizet tartalmazó táptalajokon közel azonos mértékű a csíranövények növekedési mértéke. Az is megfigyelhető, hogy a 30- illetve 40 ml/1200 ml kókuszvizet tartalmazó táptalajokon a növények növekedése erőteljesebb, a 40 ml-t tartalmazó esetében a gyökérfejlődés is tovább fokozódott. Az 50 ml/1200 ml kókuszvizet tartalmazó táptalajon viszont a kezdeti gyors növekedés és gyökérfejlődés után úgy tűnik a növekedés mértéke lelassul, az egyik lombikban a csíranövény nem is fejlődött tovább.

3.2.2. Az ezüst-nitrát hatása a csíranövények fejlődésére

Egy hónappal az ezüst-nitrátot tartalmazó táptalajra tűzdelés után a csíranövények állapotában érdemi változást nem tapasztaltunk a különböző AgNO_3 koncentrációk mellett. 2,5 hónap elteltével a 4 mg ezüst-nitrátot tartalmazó táptalajokon nem sok változás volt tapasztalható az első hónaphoz képest. Az egyik lombikban, amelyben már 1 hónap elteltével is látható volt a csíranövény növekedésének megindulása, a növény tovább fejlődött, de elég gyengének, vékonyak és törékenyek tűnt. Az ezüst-nitrát tehát önmagában nem gyakorolt növekedésserkentő hatást a *H. adriaticum* csíranövényekre.

3.2.3. Kókuszvíz + ezüst-nitrát együttes használatának hatása a csíranövények fejlődésére

Egy hónappal a csíranövények 4 mg/1200 ml ezüst-nitrátot és 25 ml/1200 ml kókuszvizet együttesen tartalmazó MFA táptalajra tűzdelése után szemmel látható volt az ezüst-nitrát és a kókuszvíz együttes növekedésserkentő hatása. A három kísérlet közül egyértelműen ez bizonyult a leglátványosabb növekedésserkentő hatásúnak.

A tűzdeléstől számított két és fél hónap elteltével a csíranövények tovább növekedtek és erősödtek, több lombikban kifejezetten erős, életképes, sötétzöld levelű növényeket találtam.

3.2.4. Az *in vitro* nevelt növények fejlődése különböző tartási (fény és hőmérsékleti) körülmények között

A fényszobában, 21°C-on, 16 óra fény – 8 óra sötét periódusok váltakozása mellett már az első hónapban elkezdődött az *in vitro* nevelt növények barnulása. A zöld növények barnulása a kísérlet 16 hetén keresztül folyamatos volt ebben a szobában. A növények pusztulása a 6. héttől kezdődött el, a 10. héttől kezdve pedig egyre erőteljesebbé vált. A kísérleti idő leteltével a pusztulás 60%-os volt, a növények 20%-a maradt ép zöld, és 20% barnult meg.

A második, déli kitettségű, nyáron nappal 28-30°C-os maximumú, éjjel 24°C-os minimum hőmérsékletű, természetes fényű szobában az első két hét során a felére csökkent a zöld növények száma, és a 4. héttől kezdve a megbarnult növények elkezdtek elpusztulni. A 14. hétre egyetlen zöld növény sem maradt. A kísérleti idő leteltével a pusztulás 60%-os volt, a növények maradék 40%-a megbarnult.

A harmadik, északi tájolású, nyáron nappal 26°C-os maximumú, éjjel 22°C-os minimum hőmérsékletű, természetes fényű szobában pusztulás egyáltalán nem volt tapasztalható a 16 hetes kísérleti idő alatt. A 4. héttől a növények barnulása megkezdődött és egyre erőteljesebbé vált. A kísérleti idő leteltével a lombikok 60%-ában maradtak a növények zöldek, 40%-ukban pedig megbarnultak.

A negyedik, éjjel-nappal 24°C hőmérsékletű, déli kitettségű, természetes fényt kapó szobában a 12. hétig kapott eredmények a számottevők (május-június-július), ugyanis ekkor egy számunkra be nem jelentett, augusztusi kötelező szabadság alatt bekövetkező több napos áramkimaradás (karbantartás) miatt a légkondicionáló nem üzemelt egészen 1 héten keresztül, ekkor észleltük a problémát, de már késő volt, az *in vitro* nevelt növények 70%-a addigra már elpusztult. A 12. hétig viszont a növények mindössze 20%-a barnult meg, 80% ép, zöld maradt, így feltételezzük, hogy ez a tendencia kitartott volna a 16. hét végéig is.

3.3. A *H. adriaticum* mikorrhiza gombapartnereinek meghatározása és vizsgálatai

3.3.1. A *H. adriaticum* mikorrhiza partnereinek kitenyésztése különböző táptalajokon

A gyökérminták felületi fertőtlenítése esetében az 5 perces tartó 1%-os nátrium-hipoklorit oldatos előkezeléssel mind a három típusú (PDA, BM, BRM) táptalajra helyezett gyökérszegmensekből növekedtek ki gombák. A másik előkezelés, mely során először 30 másodpercre 70%-os etanolba, majd 90 másodpercre 4%-os nátrium-hipoklorit oldatba helyeztük gyökérszegmenseket, túl erősnek bizonyult, ugyanis egyik kezelt gyökérszegmensből sem tenyésztett ki gomba a táptalajokon.

A PDA, BM és BRM táptalajokon kitenyészett gombákból készült tiszta tenyészeteket PDA táptalajra oltottuk. Így végül összesen 5 féle különböző típusú gombát sikerült kitenyészteni a gyökérszegmensekből. Ezeket a pontos azonosításig A, B, C, D és E gombáknak neveztük el.

3.3.2. A kitenyészett gombák számára optimális pH meghatározásának kísérlete

A 14 napon át tartó növekedési kísérlet során arra az eredményre jutottunk, hogy a kitenyészett különböző gombafajoknak igen széles a pH optimuma. Az „A” gombafaj a 4,5-es pH-t preferálja, míg az első 12 napon át a 8,5-es pH-n növekszik a leglassabban, az utolsó két napon viszont az 5,5-es pH növekedése olyannyira lelassult, hogy végül ez a pH adta a legalacsonyabb növekedési értéket. A „B” gombafaj pH optimuma a pH 6,5, de látható volt, hogy igazából nincsen túl nagy különbség a faj növekedési sebességében különböző pH-kon, tehát ez a faj széles pH spektrumon, gyakorlatilag bárhol előfordulhat. A „C” gombafaj a legjobb növekedési eredményeket a 5,5-es pH-n érte el, a legrosszabbakat pedig pH 4,5-en. A „D” gombafaj optimális talaj pH-ja a kísérlet alapján a pH 6,5, de nagyon kis különbségek vannak a faj növekedési ütemében az egyes pH-kon, tehát ez a faj is széles körben elterjedt talajgomba. Az „E” gombafaj pedig a pH 5,5-et preferálja, és egyértelműen a 8,5-es pH-n növekedett a leglassabban. Ennek a fajnak a növekedési mértéke egyértelműen csökken a talaj pH növekedésével.

Kiszámoltuk az egyes gombafajok pH-nkénti R^2 értékeit. A nullhipotézisünk: nincs különbség az átlagok között, a kezelések/csoportok a célváltozó átlagára nézve minden mintában/kezelési csoportban azonosak. Az R^2 értékek mindegyike azt mutatja, hogy az adott pH-n mért növekedési pontokra szignifikánsan illeszkedik a hozzájuk rendelt lineáris trendvonal. A t-próba eredményeképpen a korreláció a pH és a növekedési ütem között minden gombafaj minden pH-ja esetén szignifikáns.

A varianciaanalízis eredményei alapján megállapíthatók, hogy a szignifikanciaszint $>0,05$, tehát a nullhipotézist megtartjuk, a kitenyészett gombafajok növekedési mértékei a különböző pH-kon egyik esetben sem különböznek szignifikánsan egymástól, tehát ezek alapján az összes kitenyészett gombafaj széles pH referenciával rendelkező faj, és kevésbé függenek a talaj pH értékétől.

3.3.3. A meghatározásra beadott *H. adriaticum* gyökérből kitenyészett gombafaj izolálási eredménye és a vizuálisan, mikroszkóp alatt meghatározott további fajok

A BIOMI Biotechnológiai Szolgáltató Kft.-hez beadott „A” gomba minta esetében a vizsgált 506 nukleotid hosszúságú ITS1-2 szekvencia alapján a faj: *Ilyonectria robusta*. Ez a faj a valódi gombák kládján („országán”) belül a Tömlősgombák (*Ascomycota*) kládjának („törzsének”) a tagja, amit általános talajgombaként, tüneteket nem okozó gyökér endofita és opportunistá növényi gyökérokórokozóként tartanak számon (CHAVERRI et al. 2011). Szakirodalmi adatot nem találtam arról, hogy ezt a gombafajt bármely orchideafaj mikorrhiza partnereként eddig kimutatták volna.

Mikroszkopikus vizsgálatok alapján nemzetség szinten a „B” fajt *Penicillium sp.*, a „D” fajt *Fusarium sp.*, az „E” fajt pedig szintén *Fusarium sp.*-ként határoztuk meg a Növényvédelmi Intézetben. A „C” fajt nem tudtuk a morfológiai bélyegek alapján azonosítani család/nemzetség szinten, de az szemmel láthatóan bizonyos volt, hogy a faj *Ascomycota*.

3.3.4. A beadott *H. adriaticum* gyökérszegmensből meghatározásra került gombapartnerék

A gyökérminta szekvenálása során a legtöbb, 206 esetben magának a *H. adriaticum* fajnak a DNS szekvenciája jött ki, ami nem meglepő, viszont bizonyítja, hogy valóban a faj gyökerét dolgoztuk fel. Viszonylag nagy számban jött ki más orchidea fajok (*Dactylorhiza incarnata*, *D. fushsii*, *Himantoglossum hircinum*, *Cephalanthera austinae*, *Orchis quadripunctata*, *Dendrobium catenatum*) DNS szekvenciája. Ezek az eredmények valószínűleg az *Orchidaceae* családon belüli DNS szakasz hasonlóságoknak tudhatók be. A többi, jóval alacsonyabb abundanciával megjelenő taxon szintén rendkívül bizonytalan.

A számunkra releváns, esetleges mikorrhiza partnerek az *Ascomycota* (Tömlősgombák) illetve a *Basidiomycota* (Bazídiumos gombák) kládjából kerülnek ki, ezért a következőkben azokat az e törzsekbe tartozó fajokat tárgyaljuk, amelyek esetleges jelenlétére utaló DNS szekvenciák megjelentek a gyökérmintákban.

A tömlősgombák közül a *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*, és a *Trichoderma sp.* fajok Petri-csészében is, PDA, bengálrózsás- illetve benomilos maláta agaros táptalajra helyezett gyökérszegmensekből is kifejlődtek. A beadott gyökérszegmensből molekuláris genetikai módszerekkel a következő taxonokat sikerült izolálni az *Ascomycoták* közül: *Fusarium oxysporum*, *Penicillium corylophilum*, *Aspergillus oryzae*, *Erysiphe pulchra*, *Trichoderma reesei*, *Tetracladium marchalianum*, *Saitoella complicata*, *Leohumicola sp.*, *Medeolaria sp.*, *Meliniomyces sp.*, *Valsa mali* és *Dactylonectria torresensis*.

A *Fusarium oxysporum* szerepe a talajokban túlnyomóan ártalmatlan, de akár hasznos növényi endofitákként vagy talajszaprofitákként is számontarthatók. Azonban, a *F. oxysporum* komplexen belüli elváltozások hatására az új formák, különösen a mezőgazdasági környezetben, akár növénypatogének is lehetnek. Jelenléte a talajban általános. Petri-csészében, táptalajon is sikerült *H. adriaticum* gyökérből *Fusarium sp.* taxont kitenyészteni. Ezáltal kijelenthetjük, hogy a *Fusarium* genus jelen van a *H. adriaticum* gyökerében, vagy legalábbis az élőhely talajában, viszont a gyökérkapcsoltsága és szerepe kérdéses, jelenlegi ismereteink alapján nem valószínű.

A *Penicillium corylophilum* különösen nedves épületek penész faja, de a szakirodalom alapján előfordul még ételekben és szúnyogokban is, mely utóbbiakra kifejezetten patogén. Olyan alkaloidokat állít elő, mint az epoxiagroklavin és a citrinin, valamint a faj ezek alapján egyáltalán nem talajlakó, így valós jelenléte a gyökérmintán kérdéses, és semmiképpen sem mikorrhiza partnere a *H. adriaticumnak*. Petri-csészében, táptalajon azonban sikerült *H. adriaticum* gyökérből

egyéb *Penicillium sp.* fajt kitenyészteni, ami viszont csak annyit jelent, hogy a *Penicillium* genus egyes fajai általánosságban jelen vannak a talajban, de nem valószínűsíthető a mikorrhiza szerepük.

Az *Aspergillus oryzae* egy fonálgomba (penész) faj, amelyet Japánban használnak a szójabab erjesztésére szójaszószt és erjesztett baktészta készítéséhez, illetve rizs, egyéb gabonafélék vagy krumpli cukrosításához, alkoholtartalmú italok készítéséhez. Ezek alapján ez a faj sem valószínű, hogy valóban megtalálható volt a gyökérmintán, csupán egy igen rövid DNS szakasz egyezés okán, anomáliaként kerülhetett fel a listára.

Az *Erysiphe pulchra* *Cornus* fajokról leírt, Európa területén Angliából és Olaszországból jelzett gomba faj. Talajbeli előfordulása nem ismert.

A *Trichoderma reesei* egy mezofil fonalas gomba faj. Nagy mennyiségű cellulolitikus enzimet (cellulázokat és hemicellulázokat) képes kiválasztani, ezért ipari szinten használják fel a cellulóz glükózzá alakításában. Celluláz-előállítási képessége miatt ez a faj igen fontos kereskedelmi és ipari mikroorganizmus. A talajban előfordulhat, így jelenléte elképzelhető a *H. adriaticum* gyökerének felületén, de mikorrhiza fajaként sem e fajnál sem másutt eddig nem jelezték.

A *Tetracladium marchalianum* mérsékelt és szubtrópusi területeken világszerte előforduló, vízi fonalagomba faj. Lebontja a karboxi-metil-cellulózt, a xilánt és a poligalakturonsavat, valamint szerepe van a folyókban található levelek lebomlási folyamatának végbemenetelében. Mikorrhizaként nem ismert.

A *Saitoella complicata* ritka gombafaj. Míg a rokon fajai növények vagy állatok kórokozói, addig az *S. complicata* bomló anyagból táplálkozik. Jelenléte a talajban a *H. adriaticum* gyökerének felületén lehetséges, de mikorrhizaként eddig egyetlen fajnál sem jelezték.

A *Leohumicola* fajok talajlakó fajok, a szerepük egyelőre nem igazán ismert. Valós jelenléte elképzelhető, de mikorrhiza fajként eddig sem e fajnál sem másutt nem jelezték.

A *Medeolariaceae* családról sincsen számottevő fellelhető szakirodalom. A család monotipikus és mindössze a *Medeolaria farlowii* fajt tartalmazza, melyet az Egyesült Államokból írtak le, mint a *Medeola virginiana* (*Liliaceae*) obligát parazitája. Mikorrhiza fajaként eddig sem a *H. adriaticum*-nál sem másutt nem jelezték. A rövid DNS szekvencia egyezés ellenére, az említett adatok alapján a faj jelenléte nem valószínűsíthető a *H. adriaticum* gyökerén.

A *Meliniomyces* nemzetség azonban ígéretes lehet, ugyanis ez az anamorf genus ismeretes arról, hogy gyökérkapcsolt gombák, ún. „Ericoid mikorrhizák” tartoznak ide. Tehát ha ezek a gombafajok az *Ericaceae* család tagjaival képesek mikorrhiza kapcsolatban létezni, nem kizárt, hogy a *H. adriaticum* gyökeréből izolált kis DNS szekvencia egyezés akár jelenlétükre és szimbiotikus kapcsolatra utaló jel is lehet.

A *Valsa mali* faj destruktív alma pusztító fajként, az ún. Valsa üszög betegség kórokozó gombájaként ismeretes Kelet-Ázsiában, főleg Kínában. A rövid DNS szekvencia egyezés ellenére, ezen adatok alapján a faj jelenléte nem valószínűsíthető a *H. adriaticum* gyökerén.

Az eredményként kapott *Dactylonectria torresensis*, *Ascomycota* gombafaj szinonim neve: *Ilyonectria torresensis*. Ez azért igen lényeges, mert a Petri-csészében kitenyészített, majd DNS szekvencia által a BIOMI-ban meghatározott faj is az *Ilyonectria* genus tagja volt, melyet fajszinten legvalószínűbbnek *Ilyonectria robusta*-ként azonosítottak. Lényegében tehát azt 100% bizonyossággal kijelenthetjük, hogy az *Ilyonectria* genus ott van a *H. adriaticum* gyökerében, de pontos szerepe még ismeretlen számunkra.

A *Basidiomycoták*, azaz bazídiumos gombák közül a *Rhizoctonia solani*, a *Tulasnella* sp. valamint a *Cryptococcus neoformans* fajokat azonosították a beküldött gyökérmintából.

A fent említettek közül a *Rhizoctonia* illetve a *Tulasnella* genus fajai az *Orchideaceae* család ismert mikorrhiza partnerei.

A *Tulasnellaceae* családot már a korábbi kutatásom során, a *H. adriaticum* protokormjaiból is sikerült izolálni (GILIÁN 2015), így ezzel, hogy a gyökérből is kimutatható volt a *Tulasnella* sp. jelenléte, egyértelműen biztosra mondható, hogy a *H. adriaticum* egyik mikorrhiza partnere ennek a családnak és talán ennek a nemzetségnek a faja (fajai) is, amit ebben az esetben az igen alacsony DNS szekvencia egyezés (abundancia 0,003) támaszt alá.

A *Rhizoctonia solani* a szakirodalom alapján hazánkban, Magyarországon is megtalálható orchideafajok mikorrhiza partnere. DOWNIE (1959) kutatásai alapján *Orchis purpurella*, *Dactylorhiza viridis*, *Goodyera repens*, valamint *Gymnadenia conopsea* fajok esetében az *R. solani* szimbionta vagy részleges szimbionta gombapartner. Ezek és az itt is igen alacsony DNS szekvencia egyezés (abundancia 0,003) alapján nem zárható ki, hogy a *H. adriaticum* gyökerében is szimbiontaként legyen jelen.

A *Cryptococcus neoformans* egy obligát aerob élesztőgomba, amely látszólag egészséges és immunhiányos állatokban és növényekben egyaránt okozhat megbetegedést. Orchideák esetében Németországban *Gymnadenia conopsea* (STARK et al. 2009), Csehországban pedig *Epipactis albensis* (MALINOVÁ 2009) gyökeréből izoláltak már *Cryptococcus* fajt mikorrhizaként, így a fenti két fajhoz hasonlóan elképzelhető, hogy a *H. adriaticum* gyökerében is szimbiontaként legyen jelen.

3.4. A *H. adriaticum* magok szimbiotikus csíráztatási és nevelési kísérleteinek eredményei

A „B” gombán kívül a többi faj 1 hét alatt nem, vagy csak épphogy elérte a táptalaj középvezetét, ahol találkozni tudott a *H. adriaticum* magokkal.

2 hét alatt mind az öt gombafaj átért a táptalaj középvezetékén és elérték a *H. adriaticum* magokat. A magok és a gombák közötti interakció ennyi idő után még nem volt megfigyelhető.

1 hónappal a *H. adriaticum* magok mellé oltása után a gombafajok teljesen átszőtték a táptalaj felszínét, de a magokon változás még továbbra sem volt megfigyelhető.

2 hónappal a gombák magok mellé oltása után a gombák tovább növekedtek, a gombafajok a magokkal továbbra sem kerültek interakcióba.

3 hónappal a gombák táptalajra oltása után az egyes fajok továbbra sem léptek interakcióba az orchidea magokkal. Az „E” gombafaj esetében a hifa teljesen beszótte a táptalajt és fölé nőtt a magoknak, így azok a mikroszkópos képen nem láthatók. Interakció ekkor még mindig nem volt észlelhető.

4 hónappal a gombák táptalajra oltása után kijelenthetjük, hogy az ötből egyik kitenyészített gombafaj sem indította be a *H. adriaticum* magok csírázását H1 zabagar táptalajon, tehát ezek a fajok a mi kísérleti körülményeink között biztosan nem lettek szimbionta gombapartnerei a fajnak.

3.5. Az *in vitro* nevelt *H. adriaticum* növények kiültetési kísérleteinek eredményei

A természetes élőhelyről hozott talajba ültetett 4 éves, nagy ikergumókkal rendelkező egyedek levelei szeptember elejére megbarnultak, majd novemberre eltűntek. A dolgozat elkészültekor a növények még teleltek. Remélhetőleg 2020 tavaszára fogjuk meglátni, hogy lesz-e új hajtás az ikergumón. A *H. adriaticum* faj életciklusát figyelembe véve virágozni biztosan nem fognak, a kérdés az értékes eredmény az lesz, hogy a telet átvészeli-e, és ha igen, tavasszal hány leveles hajtás lesz rajtuk megfigyelhető.

Az *in vitro* nevelt, általunk összeállított ültetőközegben *H. adriaticum* növények a kísérleti idő során körülbelül 1 hónapig voltak tarthatók, majd egymás után barnultak meg, és száradtak el. A Greenman Floraria termékkel öntözött 3 növény 6 hétig, míg a folyékony MFA táptalajjal öntözött cserepekben 10 hétig bírták a kiültetett *H. adriaticum* egyedek. Tény, hogy ehhez a kísérlethez 1,5 éves egyedeket használtam fel, lehetséges, hogy nem voltak még elég erősek a kiültetés okozta stressz legyőzéséhez, de úgy gondolom, hogy az ilyesfajta, egyénileg összeállított ültetőközegbe ültetéshez sokkal speciálisabb körülmények kellenének (nevelőlámpa, megfelelő világítás, hőmérséklet és levegő páratartalom biztosítása), amelyeket az Egyetemen sajnos nem tudtam biztosítani nekik.

3.6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

- I. A *Himantoglossum adriaticum* magjai számára a módosított Fast táptalaj pH optimuma 6,5-7,5 között van. Ezeken a pH-kon csíráznak a leghamarabb (6 hónap), és legmagasabb arányban a magok (3,2-4%). Ez a kémhatás közel megegyező az élőhelyén mért talaj kémhatásával. A magvetés utáni 20. hónapban a legjobban csírázó lombikokban pH 4,5-en 0%, pH 5,5-en 0,6%, pH 6,5-en 3,2%, pH 7,5-en 4%, pH 8,5-en 0% volt a csírázási arány. A táptalaj kémhatása jelentősen befolyásolja a *H. adriaticum* magjainak csírázási sebességét és a kialakuló protokormok számát.
- II. A *Himantoglossum adriaticum* magjai számára az optimalizált pH-jú módosított Fast táptalaj optimális KCl koncentrációja 280 mg/1200 ml. A táptalaj KCl koncentrációja szintén befolyásolja a *H. adriaticum* magjainak csírázási sebességét és a kialakuló protokormok számát.
- III. A *Himantoglossum adriaticum* magjai számára az optimalizált pH-jú módosított Fast táptalaj optimális NH_4NO_3 mennyisége 40 mg/1200 ml. Az NH_4NO_3 koncentrációjának növelése a táptalajban egyre erőteljesebben gátolja a *H. adriaticum* magjainak csírázását.
- IV. A *Himantoglossum adriaticum* protokormjainak számára az optimalizált pH-jú, KCl és NH_4NO_3 koncentrációjú táptalajhoz adott kókuszvíz optimális mennyisége 30-40 ml/1200 ml között van. Ekkor a leggyorsabb a csíranövények növekedése és fejlődése. 4 mg AgNO_3 és 25 ml kókuszvíz együttes táptalajhoz adása tovább fokozza a csíranövények növekedését és fejlődését, belőlük kifejezetten erős, életképes, sötétzöld levelű növények fejlődnek.
- V. A *Himantoglossum adriaticum* gyökerének szekvenálása 14 *Ascomycota*- és 3 *Basydiomycota* taxont mutatott ki, melyek közül a *H. adriaticum* mikorrhiza partnereként a már jelzett *Tulasnella* nemzetség mellett a más orchidea fajok szimbiontájaként leírt *Rhizoctonia* forma-nemzetség és a *Cryptococcus neoformans* a legesélyesebbek.

4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a *H. adriaticum* számára az *ex situ, in vitro* csíráztatás jóval eredményesebb a BÓDIS et al. (2011) által leírt, és az általunk, terepi felmérések során mért élőhelyi talaj kémhatással közel megegyező pH-n (pH 7), mint a Fast táptalaj alap 5,5-es pH-ján. Ez előremutató eredmény, éppen ezért szükséges más hazai orchideafajok táptalaj pH optimumának meghatározása is, az élőhelyük talaj pH-jának mérésével együtt. Ezirányú kísérleteinket már elindítottuk a *Himantoglossum jankae*, az *Orchis militaris* és az *Orchis purpurea* fajok esetében, a jövőben pedig minél több hazai faj táptalaj pH optimumának meghatározása a célunk.

A *H. adriaticum* magjainak optimális csírázásához az eredeti Fast táptalaj KCl koncentrációját emelni szükséges 280 mg/1200 ml-re. A második legjobb csírázási eredményt az eredetihez képest kicsit kevesebb (120 mg/1200 ml) kálium-klorid mennyiséggel kaptuk. Az eredeti recept alapján adagolt kálium-klorid mennyiséget (200 mg/1200 ml) tartalmazó táptalajon viszont hiába a kezdeti protokormok gyors kialakulása, a kísérlet végére ezekben a lombikokban a második legrosszabb csírázási eredményt kaptuk mennyiségi tekintetben.

A *H. adriaticum* magjainak csírázóképesége a táptalaj ammónium-nitrát koncentrációjával fordítottan arányos. Azaz minél kevesebb a táptalajban az ammónium-nitrát mennyisége, annál jobb csírázási, protokormképzési eredmények érhetők el a *H. adriaticum* faj esetében. Ez egybevág a szakirodalmi áttekintés 2.5.3. alfejezetében bemutatott, VAN WAES (1984), VAN WAES és DEBERGH (1986) illetve EIBERG (1970) által tapasztalt eredményekkel.

A protokormokra és a csíranövényekre a kókuszvíznek nagyon látványos növekedésserkentő hatását tapasztaltuk. A kísérleteink alapján az optimális kókuszvíz mennyiség 30- és 40ml között van 1200 ml táptalajra vonatkoztatva. Ez a hatás még erősebb, ha a táptalajban 4 mg/1200 ml ezüst-nitrát is jelen van. Ez valószínűleg a kókuszvízben található citokinineknek és egyéb fitoregulátor vegyületeknek, valamint az ezüst-nitrát etilén-gátló hatásának köszönhető.

A *H. adriaticum* esetében a kókuszvíz és az ezüst-nitrát együttes hatásának sikerét látva úgy gondolom, hogy érdemes lenne ezt több mérsékelt égővi orchidea faj csírázása és a csíranövények növekedése esetében is vizsgálni.

További vizsgálataink folynak jelenleg annak megfigyelésére, hogy a *H. adriaticum* magok *in vitro* csíráztatása során a táptalajhoz adott 25 ml/1200 ml kókuszvíz és a 4 mg/1200 ml ezüst-nitrát együttesen milyen hatást fejt ki a csírázás megindulásának idejére, illetve a keletkező protokormok mennyiségére és állapotára. Egy másik jelenleg zajló kísérletünk során arra a kérdésre keresünk választ, hogy a magvetés utáni „chilling”, pihenő időszak hossza hogyan befolyásolja a *H. adriaticum* magok csírázási sikerét, mivel a szakirodalmi protokoll szerinti 3 hónap 4°C-on, sötétben tartás igen hosszú folyamat, ezért lényegesnek tartjuk alátámasztani vagy

megcáfolni ennek szükségességét. A jövőben pedig érdemes a táptalaj többi komponensének mennyiségét is vizsgálni mind a *H. adriaticum*, mind pedig több, hazai vadon élő orchideafajunk csíráztatása esetében.

Kísérleteink során a legnagyobb problémát számunkra az *in vitro* csíranövények tartása jelenti a Szent István Egyetemen, mivel a *H. adriaticum in vitro* nevelt növényeknek a fényszobai, mesterséges megvilágítású tartás nem felel meg, a délkeleti fekvésű, nyáron nappal 28-30°C-os maximumú, éjjel 24°C-os minimum hőmérsékletű, természetes fényű szobában tartás szintén nem felel meg, mivel ez a nappali hőmérséklet túl magas számukra. Az északi tájolású, nyáron nappal 26°C-os maximumú, éjjel 22°C-os minimumú hőmérsékletű, természetes fényű szobában tartás is csak mérsékelten megfelelő, mivel az eltelt hónapok során az egyedek állapota fokozatosan romlott (egyre több barnult meg). Igen nehéz találni egy olyan helyet, ahol megfelelő a hőmérséklet- és fényellátottság, valamint van akkora hely, ahol nagy mennyiségű *in vitro* nevelt növényt hosszútávon lehet tartani, és ehhez illetéktelen nem fér hozzá. Ezért még mindig az ELTE Fűvészkerttel együttműködve végezzük a kísérleteinket, ahol nagy odafigyeléssel tartják a lombikjainkat. Ezt a problémát viszont jó lenne orvosolni, és az Egyetem területén kellene találni vagy kialakítani egy hosszútávon használható, kisméretű, kísérleteink alapján megállapított legmegfelelőbb tartási körülményeket biztosító fix 24°C-ra beállított, természetes fényel megfelelő mennyiségben megvilágított szobát annak érdekében, hogy a kísérletek folytonosan, pontosan és helyben működhessenek.

A *H. adriaticum* mikorrhiza gombapartnerének meghatározásával kapcsolatos kísérleteink során a gombapartnerek izolálása gyökérszegmensből, molekuláris genetikai vizsgálatokkal, nem szolgált megbízható eredményekkel, mivel biztosan kizárható taxonok (pl. a területen elő nem forduló orchideák) igen magas abundanciával voltak jelen, míg a szakirodalomban is említett mikorrhiza fajok DNS szekvenciájának abundanciája igen alacsony volt. Azaz kétséget kizáróan a *H. adriaticum*on kívül egyetlen egy kimutatott taxonra sem mondhatjuk, hogy biztosan jelen volt a *H. adriaticum* gyökerében. A különböző gombák kitenyésztésére alkalmas táptalajok sajnos nem hozták a várt eredményeket, egyik táptalajon sem sikerült bazídiumos gombát kitenyészteni a gyökérszegmensekből, és a kitenyésztett aszkuszos gombák nem indították be a *H. adriaticum* magjainak csírázását szimbiotikus úton egymás mellé vetve. A gyökérből molekuláris genetikai vizsgálatokkal izolált bazídiumos gombák közül a DOWNIE (1959) által már egyéb teresztris orchideafajok szimbiontájaként bizonyított *Rhizoctonia solani*, a többek között SUFAATI et al. (2012), ILLYÉS et al. (2012), GILIÁN (2015) által teresztris orchideafajok mikorrhiza fajaként meghatározott *Tulasnella sp.*, valamint a STARK et al. (2009) által *Gymnadenia conopsea*, valamint MALINOVÁ (2009) által *Epipactis albensis* gyökeréből is mikorrhiza partnerként izolált

Cryptococcus nemzetséget sikerült izoláltatnunk, de a fentebb már említett okok miatt ezek jelenléte is igen kétséges.

Eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a jövőben érdemes lehet egyéb, bazídiumos gombák kitenyésztésére alkalmas táptalajokkal próbálkozni. Mind a gyökérből, mind a korábbi, protokorból való izolálás során kapott bazídiumos gombafajokat pedig érdemes lenne kitenyésztett állapotban beszerezni, majd a H1 zabagaron összehozni a *H. adriaticum* magokkal, és megvizsgálni, hogy ezek a fajok beindítják-e a *H. adriaticum* magok csírázását szimbiotikus úton.

A *H. adriaticum* csíranövények ültetési kísérlete az általunk kevert közegbe egyelőre sikertelennek bizonyult, mind a Greenman Floraria koncentrált multimikrobiális készítmény, mind a folyékony módosított Fast táptalaj adagolása esetében. Véleményem szerint ehhez a kísérlethez is egy speciális helyiségre lenne szükség, ahol a megfelelő tartási körülményeket hosszútávon tudnánk biztosítani a növényeknek. Az élőhelyről származó talajba kiültetett fajok jövőjétől pedig egyelőre nem tudunk biztos adatokkal szolgálni a disszertáció elkészültéig, ennek a kísérletnek az eredményére legkorábban 2020 tavaszáig mindenképpen várnunk kell.

Célunk a jövőben a *Himantoglossum adriaticum* esetében mind a pH-, mind a KCl és az NH_4NO_3 optimum meghatározásával kapcsolatos kísérletek megismétlése, hogy az eredmények a megfelelő statisztikai módszerekkel is értékelhetők legyenek. Továbbá, minél több hazánkban előforduló orchideafaj esetében szeretnénk hasonló kísérleteket elvégezni, megállapítani a pH optimumukat, meghatározni a laboratóriumi körülmények közötti csírázási sikereiket. Elsőként a *Himantoglossum* genus másik hazai fájával, a *Himantoglossum jankae*-val tervezzük ezeket a kísérleteket elvégezni, hiszen akkor a Magyarországon előforduló két *Himantoglossum* faj *in vitro* csírázási tulajdonságait és pH igényét is össze tudjuk hasonlítani, így sokkal komplexebb képet kapunk majd a családról.

Mindezek mellett szeretnénk több, lelkes és érdeklődő fiatal kutatónak megmutatni és megtanítani az orchideafajok *in vitro* csíráztatásának módszereit, és velük együtt dolgozva az eredményeket publikálni, valamint a fokozottan védett és védett fajokra termesztési és visszatelepítési protokollokat kidolgozni.

5. FELHASZNÁLT IRODALOM

- BARMAN, D., DEVADAS, R. (2013): Climate change on orchid population and conservation strategies: a review. – *Journal of Crop and Weed*. 9: 1-12. p.
- BÓDIS, J., SRAMKÓ, G., ÓVÁRI, M., MOLNÁR V., A (2011): Adriai sallangvirág. in: *Magyarország orchideáinak atlasza*. szerk.: Molnár V., A. Kossuth Kiadó, Budapest. 375-379. p.
- BOLLEN, G. J., FUCHS, A. (1970): On the specificity of the *in vitro* and *in vivo* antifungal activity of benomyl. *Netherlands Journal of Plant Pathology*. 76: 299-312. p.
- CHASE, M.W., CAMERON, K.M., BARRETT, L.R., FREUDENSTEIN, J.V. (2003): DNA Data and *Orchidaceae* Systematics: A New Phylogenetic Classification. – In: Dixon, K.W., Kell, S.P., Barrett, R.L., Cribb P.J. (szerk.) *Orchid Conservation*. Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia, 69-89. p.
- CHASE, M.W., CAMERON, K.M., FREUDENSTEIN, J.V., SALAZAR, G., VAN DEN BERG, C., SCHUITEMAN, A. (2015): An updated classification of *Orchidaceae*. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 177: 151-74. p.
- CLEMENTE, M. (2009): Orchid Conservation and Trade: Are These Concepts Incompatible? In: Pridgeon, A.M., Suarez, J.P. (szerk.) *Proceedings of the Second Scientific Conference on Andean Orchids*. Universidad Técnica Particular de Loja, Loja, Ecuador, 46-55. p.
- CLEMENTS, M.A., MUIR, H., CRIBB, P.J. (1986): A preliminary report on the symbiotic germination of European terrestrial orchids. *Kew Bulletin*, 41: 437-445. p.
- COLE, J.R., WANG, Q., FISH, J.A., CHAI, B., MCGARRELL, D.M., SUN, Y., BROWN, C.T., PORRAS-ALFARO, A., KUSKE, C.R., TIEDJE, J.M. (2014): Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucl. Acids Res*. 42 (Database issue): D633-D642.
- DHINGRA, O.D., SINCLAIR, J.B. (1986): *Basic Plant Pathology methods*. CRC Press. 308. p.
- DOWNIE, D.G. (1959): *Rhizoctonia solani* and Orchid Seed. *Transactions of the Botanical Society of Edinburgh*, 37(4): 279-285. p. DOI:10.1080/13594865909441674
- EIBERG, H. (1970): Asymbiotik frospiring og kulturforsog hos nogle europæiske jordorkideer. (Európai orchideák csírázási vizsgálatai aszimbiotikus táptalajon – dán nyelven). MSc thesis. University of Copenhagen: Plant Physiological Laboratory.
- GILIÁN, L.D. (2015): A *Himantoglossum adriaticum* magjainak életképesség vizsgálata, *in situ* és *ex situ* csíráztatása, valamint szimbionta gombapartnereinek molekuláris meghatározása. Diplomadolgozat, Keszthely.
- HOGG, R. V., TANIS, E. A. (1988): *Probability and Statistical Inference*. 3rd Edition. *Macmillan Publishing Company*, New York. 658. p. ISBN 0-02-355810-5
- ILLYÉS, Z., OUANPHANIVANH, N., RUDNÓY, SZ., BRATEK, Z. (2012): Orchids in the Carpathian Basin and their Mycorrhizal Associations. 15th European Orchid Congress, Budapest.
- MALINOVÁ, T. (2009): Germination ecology on orchids. Master thesis, University of South Bohemia Faculty of Science, České Budejovice, 38. p.
- MATHEW, B., BURTON, J.A. (1994): *CITES Guide To Plants In Trade*. published by Department of the Environment.
- PILLON, Y., CHASE, M. (2007): Taxonomic exaggeration and its effects on orchid conservation. *Conserv. Biol*. 21(1): 263-265. p.

- R CORE TEAM (2017): R: A Language and Environment for Statistical Computing. – R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- R. ESZÉKI, E., SZENDRÁK, E. (1992): Experiments to propagate native hardy orchids (*Orchidaceae*) in the ELTE Botanical Garden. 20th Cong. Hung. Biol. Soc. Kecskemét, 25.
- RASMUSSEN, H.N., ANDERSEN, T.F., JOHANSEN, B. (1990): Temperature sensitivity of *in vitro* germination and seedling development of *Dactylorhiza majalis* (*Orchidaceae*) with and without a mycorrhizal fungus. *Plant, Cell and Environment*, 13: 171-177. p.
- SMITH, N.R.; DAWSON, V.T. (1944): The bacteriostatic action of rose bengal in media used for plate counts of soil fungi. *Soil Science*. 58(6): 467-472. p.
- STARK, C., BABIK, W., DURKA, W. (2009): Fungi from the roots of the common terrestrial orchid *Gymnadenia conopsea*. *Mycological Research* 113: 952-959. p.
- SUFAATI, S, AGUSTINI, V, SUHARNO (2012): Isolation and phylogenetic relationship of orchid-mycorrhiza from *Spathoglottis plicata* of Papua using mitochondrial ribosomal large subunit (mt-Ls) DNA. *Biodiversitas*, 13(2): 59-64. p. DOI: 10.13057/biodiv/d130202
- THOM, C., CHURCH, M.B. (1926): The aspergilli. Williams & Wilkins Co., Baltimore, MD.
- VAN WAES, J.M. (1984): *In vitro* studie van de kiemingsfysiologie van Westeuropese orchideen. (Nyugateurópai orchideák csírázási fiziológiájának *in vitro* vizsgálata – holland nyelven). Thesis. Rijkuniversiteit Gent.
- VAN WAES, J.M., DEBERGH, P.C. (1986): *In vitro* germination of some Western European orchids. *Physiologia Plantarum*. 67: 253-261. p.
- WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for phylogenetics. In PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. 315-322. p.

Internetes hivatkozások:

- INTERNET-1: ABI PrepMan™ Ultra Sample Preparation Reagent User Guide: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4367554_PrepManRgnt_UG.pdf
PrepMan™ Ultra Sample Preparation Reagent. Lekérdezés időpontja: 2020.01.17
- INTERNET-2: LoopSeq™ 18S - ITS Mycobiome Kit User Manual, Version 1.1: https://drive.google.com/file/d/1J9iw4uPhQsBTP2_eaNeD4n_ZcaSZq4SI/view Lekérdezés időpontja: 2020.01.17
- INTERNET-3: LoopSeq™ 18S - ITS Mycobiome Kit Quick Start Guide, Version 1.1: <https://drive.google.com/file/d/1JHylzC-v5y9Bz4wFWGr02bIFDkhTgbBG/view> Lekérdezés időpontja: 2020.01.17

PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

IF-os folyóiratcikkek:

- GILIÁN, L.D.**, BÓDIS, J., ESZÉKI, E., ILLYÉS, Z., BIRÓ, É., NAGY, J.GY. (2018): Germination traits of Adriatic lizard orchid (*Himantoglossum adriaticum*) in Hungary. *Applied Ecology and Environmental Research* 16 (2) 1155-1171. p. DOI:http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1602_11551171
- GILIÁN, L.D.**, ENDRÉDI, A., ZSINKA, B., NEMÉNYI, A., NAGY, J.GY. (2019): Morphological and reproductive trait-variability of a food deceptive orchid, *Cephalanthera rubra* along different altitudes. *Applied Ecology and Environmental Research* 17 (3): 5619-5639. p. DOI:http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1703_56195639
- BÓDIS, J., BIRÓ, É., NAGY, T., TAKÁCS, A., SRAMKÓ, G., BATEMAN, R.M., **GILIÁN, L.**, ILLYÉS, Z., TÖKÖLYI, J., LUKÁCS, B.A., CSÁBI, M., MOLNÁR, A. (2019): Biological flora of Central Europe *Himantoglossum adriaticum* H. Baumann. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*. 40: 125461.

Konferencia kiadványok:

Magyar nyelvű absztrakt konferencia kiadványban:

- Gilián, Lilla Diána;** Bódis, Judit; R. Eszéki, Eszter; Illyés, Zoltán; Nagy, János György (2017): Az adriai sallangvirág (*Himantoglossum adriaticum*) *in situ* és *ex situ (in vitro)* csíráztatása. In: Mizsei Edvárd és Szepesváry Csaba (szerk.): XI. Magyar Természetvédelmi Biológiai Konferencia Absztrakt kötet. Eszterházy Károly Egyetem, Eger, 2017. november 2-5. Magyar Biológiai Társaság MTA Ökológiai Kutatóközpont. 67. p.
- Gilián, Lilla Diána,** Endrédi, Anett, Zsinka, Bernadett, Nagy, János György (2018): A *Cephalanthera rubra* morfológiai sajátosságainak összehasonlító vizsgálata a tengerszint feletti magasság függvényében Magyarországon. In: Csontos Péter et al. (szerk.): XXXI. Vándorgyűlés Összefoglalók. Budapest, 2018. november 22-23, Magyar Biológiai Társaság, Fővárosi Állat- és Növénykert. 9-10. p.
- Gilián, Lilla Diána;** Nagy, János György (2018): A *Himantoglossum adriaticum ex situ, in vitro* csírázási sikere különböző kémhatású táptalajokon: *In vitro* germination success of *Himantoglossum adriaticum* on different pH. In: Molnár, V Attila; Sonkoly, Judit; Takács, Attila (szerk.) XII. Aktuális Flóra- és Vegetációkutatás a Kárpát-medencében. Program és összefoglalók. 12th International Conference Advances in research on the flora and vegetation of the Carpatho - Pannonian region. Programme and Abstracts. Debrecen, Magyarország: Debreceni Egyetem TTK Növénytani Tanszék, 67. p.

Idegen nyelvű absztrakt konferencia kiadványban:

Gilián, Lilla Diána; R, Eszéki Eszter; Nagy, János György (2018): *In vitro* propagation of *Himantoglossum adriaticum* in Hungary. In: University, of Wrocław (szerk.) 27th Congress of the European Vegetation Survey. 23-26 May, Wrocław, Poland. Book of Abstracts. Wrocław, Poland: University of Wrocław, 110. p.

Gilián, Lilla Diána; Endrédi, Anett; Zsinka, Bernadett; Neményi, András; Nagy, János György (2019): Morphological and reproductive trait-variability of a food deceptive orchid, *Cephalanthera rubra* along different altitudes. In: Rosario, G. Gavilán; Alba, Guitérrez-Girón: 28th EVS Meeting: Abstracts & Programme: Vegetation Diversity and Global Change, Madrid, Spain: Universidad Complutense de Madrid, 163 p.