SZENT ISTVÁN EGYETEM

A *GINKGO BILOBA* L. MINT PERSPEKTIVIKUS VÁROSTŰRŐ FAJ

Doktori értekezés tézisei

Koczka Noémi

Gödöllő

2001.

A Doktori Iskola

neve:	Növénytudományi Doktori Iskola
tudományága:	Növénytermesztési és Kertészeti tudományok
vezetője:	Dr. Virányi Ferenc egyetemi tanár, az MTA doktora SZIE, MKK, Növényvédelemtani Tanszék
Témavezető:	Dr. Dimény Judit egyetemi tanár, mg. tud. kandidátusa SZIE, MKK, Kertészeti Technológiai Tanszék

……. ……

A Doktori Iskola vezetőjének jóváhagyása A témavezető jóváhagyása

1. A munka előzményei, a kitűzött célok

A környezetszennyezés fokozódásának egyre szigorúbb környezetvédelmi követelményekkel próbálnak gátat szabni. A különböző környezetkímélő anyagok és technológiák alkalmazása mellett fontos szerepet kapnak a természetes védekező rendszerek. A növények képesek például bizonyos anyagok megkötésével vagy semlegesítésével a káros hatások csökkentésére. A szennyezett abiotikus tényezőkhöz alkalmazkodni tudó, azokat toleráló növényfajok, fajták telepítésével, elterjesztésével jelentősen hozzájárulhatunk a környezet védelméhez.

A *Ginkgo biloba* L. méltán érdemelte ki az „élő kövület" elnevezést. Genetikai állománya az évmilliók során szinte változatlan maradt, ami védekező mechanizmusának hatékonyságát bizonyítja. Nagyon jól alkalmazkodik az igen eltérő környezeti feltételekhez. Rendkívül jó immunitással rendelkezik a kórokozókkal és a kártevőkkel szemben, regenerálódó képessége kiváló. A káros antropogén hatásokkal szemben is nagyfokú ellenálló képességet mutat. Világszerte bebizonyosodott, hogy a legszennyezettebb, legkedvezőtlenebb körülményeket kínáló nagyvárosokban is megél. Emellett ki kell emelni a faj magas díszítő értékét, melyet különleges levélformájának és egzotikus megjelenésének köszönhet. Mindenféleképpen ajánlott hazai elterjesztése, hiszen a faj nálunk még mindig ritka díszfának számít.

Az irodalmi áttekintésben részletesen foglalkozom a faj botanikai bemutatásával (eredet, morfológia, környezeti igény, ellenálló képesség), hiszen ezek ismerete feltétlenül szükséges az elvégzett vizsgálatok okának és esetleges különlegességeinek magyarázatához. Külön ismertetem a faj felhasználási lehetőségeit (gyógynövény, dísznövény, élelmiszer), melyek természetesen eltérő tulajdonságokkal rendelkező egyedeket, ill. fajtákat igényelnek. Értekezésem szempontjából elsősorban a várostűrő faként való alkalmazás lényeges. Díszfaként történő hasznosításnál a termős egyedek a magköpeny kellemetlen szaga miatt nem kívánatosak. A hímnemű fák biztosítása érdekében erőfeszítések történtek a nemek morfológiai és biokémiai azonosítására a szaporítószervek megjelenése előtt (a faj csak 20-30 évesen válik ivaréretté), mely nagy kertészeti jelentősége ellenére mindezidáig nem járt sikerrel.

Célkitűzések

1. A faj kadmium- és sótűrésének tesztelése, melyből a várostűrésre lehet következtetni.
2. A generatív szaporítás vizsgálata a legmegfelelőbb módszer kiválasztása céljából. A peroxidáz enzim aktivitás és a csírázóképesség közötti összefüggés vizsgálata.
3. Autovegetatív szaporítási kísérletekben a dugványok eredetének (anyanövény neme, a dugvány alapi, illetve csúcsi volta) hatásának vizsgálata.
4. Izoenzimes analízisek elvégzése a faj izoenzim mintázatának meghatározása és az ivari meghatározás lehetőségeinek vizsgálata céljából.

2. Anyag és módszer

2.1. Anyag

Az 1995-2000. időszakban elvégzett kísérletsorozatokhoz négy különböző helyen található *Ginkgo biloba* L. egyedek különböző részei (gyökér, vessző, rügy, hajtás, levél, mag), ill. a magvaikból nevelt magoncok szolgáltak mintául. A begyűjtés helyei:

- a SZIE Budai Területi Irodájának Budai Arborétuma,
- az ELTE Botanikus Kertje (Füvészkert),
- a szegedi SZOTE Szemészeti Klinikája,
- München belvárosa.

2.2. Módszer

2.2.1. Kadmiumtűrés vizsgálata

A vizsgálatokat hidrokultúrában felnevelt növényekkel végeztem. A fiatal növényeket négy leveles stádiumban különböző koncentrációjú, kadmiumot tartalmazó tápoldatba helyeztem át. Az alkalmazott koncentrációk: 0, 10^{-6}, 10^{-5}, 10^{-4}, 10^{-3}, 10^{-2}, 1 M Cd^{2+}. Mintavételre öt alkalommal, a kísérlet kezdetétől számított 4, 28, 52, 76, 100 óra elteltével került sor. A növények gyökerét, ill. levelét külön vizsgáltam.

Izolálás után a növényi minta peroxidáz enzimaktivitását és fehérjetartalmát spektrofotométerrel határoztam meg. A peroxidáz aktivitást mindig az adott minta fehérjetartalmára vonatkoztatva adtam meg (U/ mg fehérje). Az analíziseket háromszor ismételtem.

2.2.2. Sótűrés vizsgálata

Az alkalmazott módszer megegyezik a kadmiumtűrés vizsgálatánál leírtakkal. Az alkalmazott koncentrációk: 0, 100, 200 és 400 mM NaCl. Mintavételre öt alkalommal, a kísérlet kezdetétől számított 4, 18, 24, 42 és 48 óra elteltével került sor. A növények gyökerét, ill. levelét külön vizsgáltam.

2.2.3. Magkísérletek

A magköpenytől megtisztított magvakat hűtőszekrényben tároltam (4° C). A csíraképességet egyrészt a szabvány (MSZ 6354-3:1991) által előírt itatós papír közötti csíráztatással (elemszám 100 db, ismétlések száma 4), másrészt földbe történő vetéssel (elemszám 10 db, ismétlések száma 10) határoztam meg.

Kétféle magkezelés hatását vizsgáltam az évek folyamán: az egyiket néhány másodperces forrázás jelentette, a másikat pedig mechanikai koptatás. Természetesen valamennyi kísérletben volt egy kezeletlen (kontroll) csoport is. A felvételezés itatós papír közötti csíráztatás esetén a csírázás kezdetétől 2, 4 és 8 hét múlva, illetve a földbe vetés után 4 és 8 héttel történt.

A biokémiai analízishez (peroxidáz enzim aktivitás mérése) a magkísérletekhez begyűjtött mintákat használtam és a fenti magkezeléseket alkalmaztam. Homogenizálás és izolálás után a magvak peroxidáz enzim aktivitásának mérése a stressztűrés vizsgálatoknál leírtak szerint történt.

2.2.4. Dugványozás

A dugványok külön nő- és hímivarú egyedekről származtak, melyek ezenkívül alapi és csúcsi eredetük szerint kerültek megkülönböztetésre. A dugványok egyik fele gyökerezést serkentő hormonkezelésben részesült, míg a kezeletlen csoport képezte a kontrollt. A dugványok elemszáma a háromtényezős kísérlet legkisebb faktorcsoportjaiban 5 db, az ismétlések száma pedig 3 volt (tehát összesen 120 db/ kísérlet). A fás dugványokat 2 évnél idősebb részekről vágtam. A dugványok hossza 10-12 cm volt. A kísérletet fás, leveles fás és zöld dugványokkal végeztem. Felvételezésre 30 nap múlva került sor.

Gyökerezést serkentő hormonkészítményként 1.0-2.0 mg/ ml 1,3-indolvajsavat (IVS), 0.5-1.0 mg/ ml α-naftil-ecetsavat (NES) és 20 % felszívódást segítő dimetil-szulfoxidot (DMSO) tartalmazó keveréket használtam. A kezelés a hormonoldatba való néhány másodperces bemártásból állt.

2.2.5. Izoenzim vizsgálatok keményítő gélen történő gélelektroforézissel

A vizsgálatokat ivarérett („idős”) *Ginkgo biloba* L. porzós és termős egyedek (5-5 db) leveleiből és gyökereiből, valamint az ELTE Botanikus Kertjéből származó 1 éves („fiatal”) magoncok (50 db) hajtáscsúcsából, leveléből és gyökeréből nyert izolátumokon végeztem.

Az izoenzimek elválasztását horizontális keményítő gélen történő gélelektroforézissel végeztem. Egyszerre 50 mintát vittem fel gélenként.

A vizsgált enzimek: sikiminsav dehidrogenáz (SKDH), malát dehidrogenáz **(**MDH), izocitrát dehidrogenáz (ICDH), glükonát-6-foszfát dehidrogenáz (6-PGDH), glutamát dehidrogenáz (GDH), foszfoglüko mutáz (PGM) és glükóz-6-foszfát izomeráz (PGI).

2.2.6. Izoenzim vizsgálat poliakrilamid gélelektroforézissel (PAGE) és izoelektromos fókuszálással (IEF)

A vizsgálatok mintájául hím- és nőivarú egyedek, ill. fiatal magoncok különböző részei (gyökér, rügy, levél) szolgáltak. Az izoenzimek elválasztását két módszerrel végeztem:

- poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE): pH= 8.3
- izoelektromos fókuszálás (IEF): pH=3-9 gradiens gél

A vizsgált enzim: szuperoxid dizmutáz.

2.2.7. Izoenzim vizsgálat izoelektromos fókuszálással

A növényminták hím- és nőivarú egyedekről származtak. A magvakat (két-, illetve háromélű), a csíranövényt, a gyökereket, a vesszőket, valamint a rügyfakadástól lombhullásig több alkalommal a fák különböző helyeiről (csúcsi, illetve oldalhajtásról) származó leveleket vizsgáltam. Az IEF-re pH=3-9 gradiens gélen került sor.

A vizsgált enzimek: peroxidáz, észteráz.

2.3. Az értékelés módja

Az adatok biometriai elemzését a MiniStat 3.2 statisztikai programcsomaggal végeztem el (VARGHA és CZIGLER 1999). A kezelésszinteket kétmintás t-próbával, illetve varianciaanalízissel hasonlítottam össze.

Az egyes enzimek gélelektroforézissel elválasztott izoenzim mintázatát oszlopdiagramokkal szemléltetem, ahol a vonalak az egyes izoenzimek helyét, a vonalak vastagsága pedig az izoenzimek aktivitásában mutatkozó különbségeket jelölik. Az izoenzimek elhelyezkedését a keményítő- és a poliakrilamid gélen történt elválasztás esetén az Rf-értékek megadásával jelzem.

3. Eredmények

3.1. Kadmiumtűrés

A *gyökerek* a növekvő kadmium koncentrációra a két legalacsonyabb koncentráció (10^{-6}, 10^{-5} M Cd^{2+}) kivételével valamennyi esetben szignifikáns nagyobb (1.2-7.2 x) peroxidáz aktivitással reagáltak.

A kísérlet során a *levelek* peroxidáz aktivitása végig jóval alacsonyabb volt, mint a gyökereké. A gyökerekben mért enzimaktivitás 6.4 - 14.3-szorosa volt a levelekénél. A stressz azonban a levelekben nagyobb arányú enzimaktivitás növekedést váltott ki, mint a gyökerekben. A levelekben a peroxidáz aktivitás a kontrollhoz képest a legalacsonyabb koncentrációt (10^{-6} M Cd^{2+}) kivéve valamennyi kezelésnél szignifikánsan nagyobb (2.1-9.3 x) volt. A stressz mindkét növényi részben a kadmium koncentráció növekedésével és az idő függvényében egyre erőteljesebb peroxidáz aktivitásbeli növekedést váltott ki.

3.2. Sótűrés

Mind a *gyökerek*ben, mind a *levelek*ben a peroxidáz aktivitás a sókoncentráció növekedésével nőtt. A kontrollhoz viszonyított különbségek (gyökérnél: 3.2-5.6 x, levélnél: 1.1-3.5 x) és a kezelések közti eltérések valamennyi mintavételi időpontban szignifikánsak voltak.

3.3. Magkísérletek

A csírázóképesség szignifikánsan függ a *mag éleinek számá*tól, a kétélű magvak sokkal nagyobb százalékban (84%) csíráztak, mint a háromélűek (62%). A két-, illetve háromélű magvak peroxidáz aktivitásában nem jelentkezett különbség, tehát ez alapján nem különíthetők el.

A magvak *származási hely*ének szignifikáns hatása van a csírázóképességre. Valamennyi esetben az ELTE-ről származó magvak jobban csíráztak (1.1-1.2 x), mint a SZIE-ről begyűjtöttek.

A *begyűjtési időpont* is szignifikáns hatással van a csírázóképességre. A november elején begyűjtött magvak szignifikánsan gyengébben keltek a többi szedésből

származó magvakhoz viszonyítva. A február végén felszedett magvak csíraképessége (66-70 %) statisztikailag megegyezett a november elején begyűjtött magvakéval (62-68 %), és szignifikánsan alacsonyabb értéket mutatott a további négy időpontban gyűjtött magvakhoz viszonyítva. A legmagasabb csírázási értékeket (78-88 %) a decemberi és a januári magvak mutatták.

A csírázási százalék a *csírázási körülmények*től szignifikánsan függ. A magvak itatós papír közötti csíráztatás esetén szignifikánsan nagyobb (1.2-1.3 x) csírázóképességet mutattak, mint földbe vetve.

A *tárolás ideje* szerint szignifikáns eltérés van a közvetlenül begyűjtés után, ill. a csak tavasszal elvetett magvak csírázási százaléka között. A tavaszi vetésnél a magvak egyöntetűbben és nagyobb arányban (1.2-1.3 x) csíráztak ki valamennyi begyűjtési időpont esetén. A biokémiai analízis során a februári és a márciusi méréseknél szignifikánsan magasabb (1.1-1.8 x) peroxidáz aktivitást mutattak a november végén, ill. decemberben gyűjtött magvak a többihez képest. Legalacsonyabb aktivitással a november elején, ill. a februárban felszedett magvak rendelkeztek.

Kísérletem minden évében azt tapasztaltam, hogy a *magkezelés*eknek szignifikáns hatása van a csírázási százalékra. A kontroll csoportokból csírázott ki a legkevesebb mag, ennél szignifikánsan több kelt ki mind a *forrázott* (1.3-1.6 x), mind a *koptatott* (1.2-1.6 x) magvak közül. A két kezelés közötti eredményekben statisztikailag nincs különbség.

A biokémiai analízis nagyon jól kiegészítette a gyakorlati tapasztalatokat. A *forrázott* és *koptatott* magvak peroxidáz aktivitása szignifikánsan magasabb volt, mint a kezeletlen magvaké.

3.4. Dugványozás

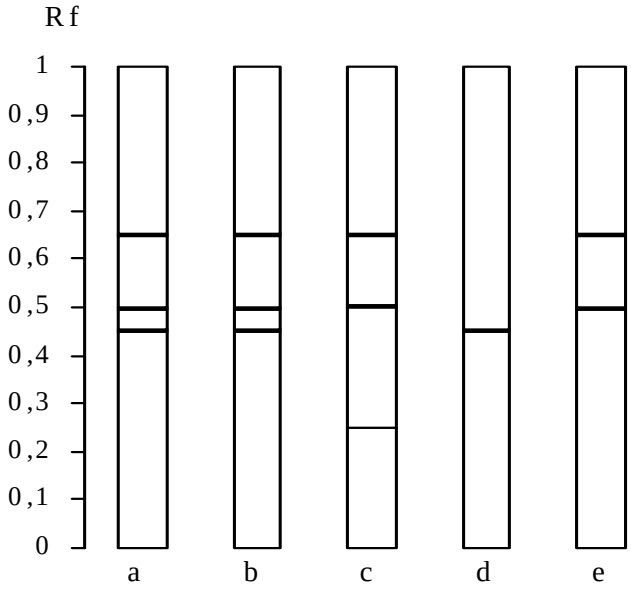
A kezeletlen dugványok 57-68 %-os gyökeresedési arányt mutattak. Ez különösen jó eredménynek számít, mert a meggyökeresedett dugványok mintegy fele idős (8-10 éves) részről származott.

Hormonkezelés hatására szignifikánsan jobb gyökeresedési százalékot (77-88 %) tapasztaltam a kontrollhoz képest mind a fás, mind a zöld dugványok esetében. A nemek, illetve a zöld és fás dugványok gyökerezése között nem volt szignifikáns differencia. Az alapi és csúcsi dugványok között viszont szignifikáns eltérés jelentkezett, mégpedig az alapi dugványok gyökereztek jobban (1.3-2.6 x).

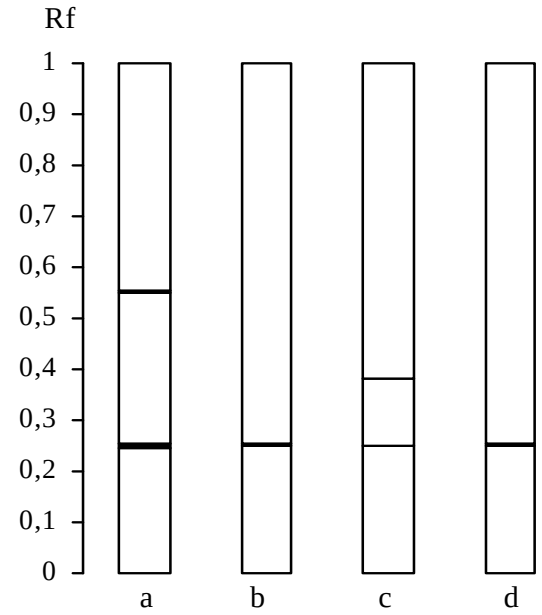
3.5. Izoenzim vizsgálatok keményítő gélen történő gélelektroforézissel

Valamennyi esetben ki lehetett mutatni a növény részeiből az egyes enzimek aktivitását. Különösen jó festődést mutatott a malát dehidrogenáz, a glutamát dehidrogenáz, a foszfoglüko mutáz és a glükóz-6-foszfát izomeráz (1., 2., 3., 4. ábra).

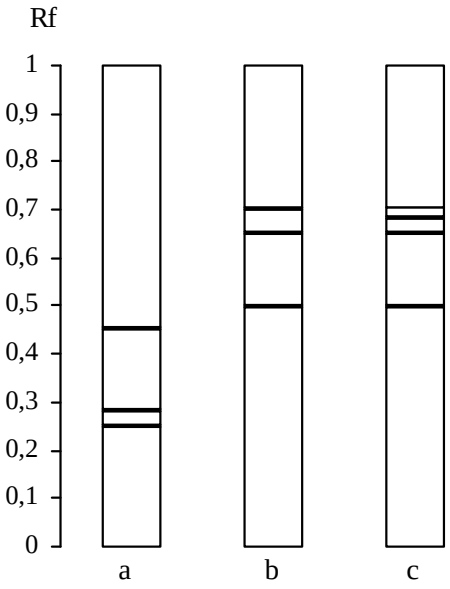
A glükóz-6-foszfát izomeráz esetében lehetett legösszetettebb és legváltozatosabb izoenzim mintázatokat kimutatni. A fiatal növények gyökerénél 50-50 %-os megoszlásban kétféle izoenzim mintázatot mutattam ki.



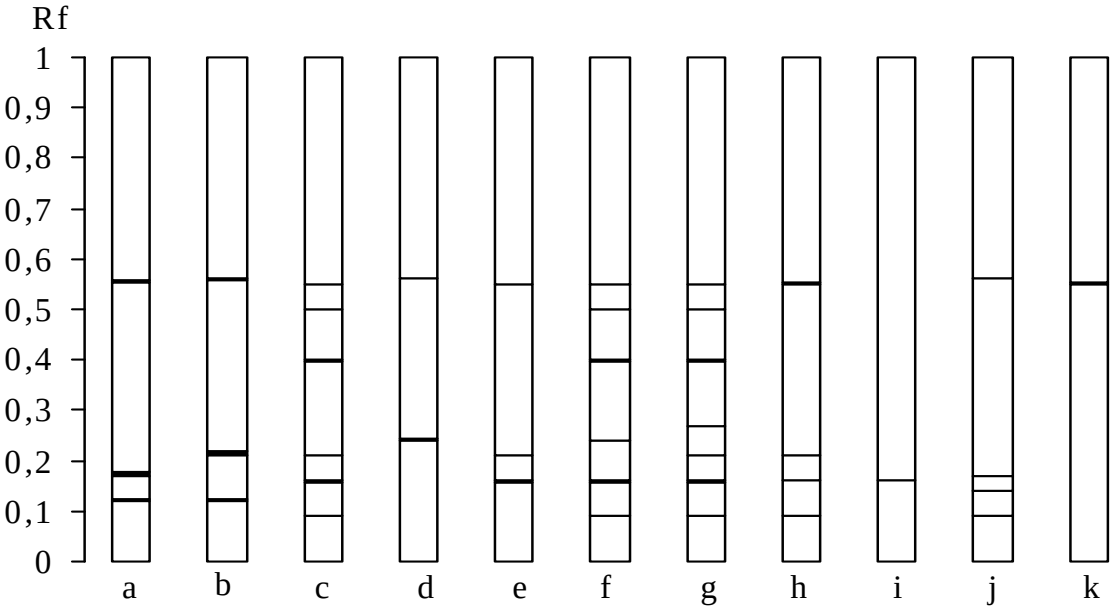
1. ábra A ginkgó malát dehidrogenáz izoenzim mintázata (a/ fiatal növény gyökerében, b/ idős növény gyökerében, c/ fiatal növény levelében, d/ idős növény levelében, e/ fiatal növény csúcsrügyében)



2. ábra A ginkgó glutamát dehidrogenáz izoenzim mintázata (a/ fiatal növény gyökerében, b/ idős növény gyökerében, c/ fiatal növény levelében, d/ idős nőivarú növény levelében)



3. ábra A ginkgó foszfoglüko mutáz izoenzim mintázata (a/ fiatal növény gyökerében, b/ idős növény gyökerében, c/ fiatal növény levelében)



4. ábra A ginkgó glükóz-6-foszfát izomeráz izoenzim mintázata (a-b/ fiatal növény gyökerében, c-f/ idős nőivarú növény gyökerében, g-i/ idős hímivarú növény gyökerében, j/ fiatal növény levelében, k/ fiatal növény csúcsrügyében)

3.6. Izoenzim vizsgálat poliakrilamid gélelektroforézissel (PAGE) és izoelektromos fókuszálással (IEF)

Mindkét módszerrel nagyon jól értékelhető negatív festődést kaptam. Az idős egyedek rügyéből kimutatott szuperoxid dizmutáz mintázatok a két nem között egyértelműen eltértek. Poliakrilamid gélen a női egyedeknél egy sávot sikerült kimutatni, a hím egyedeknél négyet; izoelektromos fókuszálással pedig a nőivarú egyedeknél csak egy, a hímivarú egyedeknél viszont három sáv jelent meg.

3.7. Izoenzim vizsgálat izoelektromos fókuszálással

Peroxidáz

Valamennyi vizsgált növényi részből ki lehetett mutatni az enzim aktivitását. Nemek közötti eltérés azonban csak a gyökereknél adódott. A hím egyedeknél jóval kevesebb izoenzimsáv különült el és az egyes frakciók aktivitása is általában kisebb volt.

A termőhelyek között csak a magvaknál jelentkezett különbség, mindhárom helyről származó mag izoenzim mintázata más volt. A két-, ill. háromélű magvaknál nem lehetett egyik termőhely esetében sem különbséget kimutatni.

Észteráz

Az észteráz esetében a mélynyugalomban lévő vesszők és rügyek kivételével valamennyi növényi részből ki lehetett mutatni az enzim aktivitását. Nemek közötti eltérés a gyökereknél az izoenzim aktivitásában volt. A levelek észteráz izoenzim mintázata valamennyi más növényi részben tapasztaltaktól eltért. A tavasszal és nyáron begyűjtött leveleknél az észteráz izoenzim mintázatban a nemek között nem kaptam eltérést az izoenzimek elhelyezkedésében és aktivitásában. Az októberi minták vizsgálatakor viszont egyértelmű különbség adódott a két nem izoenzim aktivitásában.

A termőhelyek között az észteráz enzim esetében is csak a magvaknál tapasztaltam különbséget, mindhárom helyről származó mag izoenzim mintázata más volt. A két-, ill. háromélű magvak izoenzim mintázata termőhelyenként azonos volt.

Új tudományos eredmények

1. A kadmiumot tartalmazó hidrokultúrában tartott fiatal ginkgó növények gyökerében és levelében mért peroxidáz aktivitás a növekvő kadmiumkoncentrációval szignifikánsan egyre nő. Az alkalmazott koncentrációkat és a növény válaszreakcióit értékelve elmondható, hogy a fiatal ginkgó növények igen jó kadmiumtűrő képességgel rendelkeznek.

2. A különböző erősségű NaCl-stressz hatásaként a fiatal növényekben a peroxidáz aktivitás a koncentrációval arányosan szignifikánsan megnő. Eredményeim alapján a fiatal ginkgó növények jó sótűréssel rendelkeznek.

3. Igazoltam, hogy a mag éleinek száma nem határozza meg a nemet.

4. Többéves kísérletsorozattal bizonyítottam, hogy fizikai magkezeléssel (forrázás vagy mechanikai koptatás) szignifikánsan javítható a csírázási százalék.

5. Kísérleti adatokkal igazoltam, hogy a dugvány gyökeresedését nem befolyásolja az anyanövény neme.

6. A zöld és fás dugványok gyökerezése között nem volt szignifikáns különbség, tehát mindkét mód javasolható a faj dugványozására.

7. Vizsgálataim során azt tapasztaltam, hogy a gélelektroforézis kiválóan alkalmas a *Ginkgo biloba* L. különböző részeinek izoenzim mintázatainak jellemzésére. Különösen az észteráz, a foszfoglükóz mutáz, a glutamát dehidrogenáz, a glükóz-6-foszfát izomeráz, a malát dehidrogenáz és a szuperoxid dizmutáz enzimek vizsgálatával történő analíziseket tartom perspektivikusnak.

8. A *Ginkgo biloba* L. esetében a glükóz-6-foszfát izomeráz, az észteráz, a peroxidáz és a szuperoxid dizmutáz enzimek izoenzim mintázata alapján nagy valószínűséggel gyakorlati lehetőség nyílik a nemek elválasztására.

4. Következtetések és javaslatok

Stressztűrés

A kadmiumstresszre a hidrokultúrában tartott fiatal növények gyökere és levele eltérő erősséggel reagált, amely megfigyelés megegyezik SHEORAN és GARG (1979), illetve SEHMER et al. (1995) tapasztalataival. A stressztünetek a levelekben sokkal gyengébben jelentkeztek. Ez egyrészt azzal magyarázható, hogy a gyökereket érte közvetlenül a stresszhatás. Másrészt feltételezhető, hogy a ginkgó gyökere akkumulálja a kadmiumot, ami így jóval kisebb mennyiségben kerül a levelekbe. Erre utalnak ugyanis más fajokkal végzett kísérletek, melyek szerint a stressz hatására a növények gyökereiben többszörös mennyiségű kadmium halmozódott fel, mint a levelekben (KORCAK 1989; SCHULTZ és LAMERSDORF 1989; HENDRY et al. 1992; CIESLINSKI et al. 1995; ARDUINI et al. 1996; ERDEI et al. 1998). *Javaslom ezért a kadmiumstressz hatásának vizsgálatát kiegészíteni a ginkgó növények gyökerének és levelének kadmiumtartalmának mérésével.* A növények nehézfémek akkumulációja nagy jelentőséggel bír, hiszen a káros elemek megkötésével csökkentik a környezet szennyezettségét.

A kadmium- és sótűrési kísérletek egészét tekintve mindkét vizsgált növényi részben jól megfigyelhető a tendencia, miszerint a növekvő kadmiumstresszre egyre nagyobb peroxidáz aktivitással reagált a növény. Hasonló eredményt kapott HAWRYS (1984), NYMAN (1986), YAMANOUCHI et al. (1987), BENDER et al. (1990), CHEN és KAO (1995), BREJ (1998), illetve PUCCINELLI et al. (1998) is más fajoknál a kadmiumstresszre, a sóstressz esetében pedig SAHU és MISHRA (1987), WANG et al. (1987), CHEN et al. (1992), SHEOKAND et al. (1995), LOPEZ et al. (1996), PIQUERAS et al. (1996) és SWARAJ et al. (2000). Vannak azonban ettől eltérő tapasztalatok is, melyek szerint a peroxidáz aktivitás a stresszre változatlan

maradt, vagy éppen csökkent (SAHOO és SAHU 1993;. OLIVEIRA et al. 1994; SEHMER et al. 1995, JAIN és GADRE 1998; SCHICKLER és CASPI 1999; MANDAL és SINGH 2000; WANG et al. 2000). Ennek magyarázata, hogy a fajok, fajták, sőt az egyes egyedek stresszre kialakuló válaszait csak azonos körülmények között, azonos mintavételi időpontok esetén lehet összehasonlítani. A kísérlet időtartamának, a mintavételek gyakoriságának helytelen megválasztása is hiányos megfigyelésekhez vezethet. Köztudott ugyanis, hogy a stresszreakciók során az élőlény védekező rendszere egy rövid szakasz (alarm reakció) után átmenetileg alacsonyabb szintű aktiváltságot mutat, melyet azonban az enzim- vagy hormonaktivitás erőteljes növekedése követ. A védekező rendszer erősségétől függően bizonyos idő elteltével a stresszreakciók újból gyengülnek, míg egészen meg nem szűnnek (az élőlény pusztulása). Ezért adódhatnak ellentétes megfigyelések a peroxidáz aktivitás változásával kapcsolatban is.

A növényekben alapállapotban (stressz nélkül) mérhető peroxidáz aktivitás fajonként és fajtánként eltérő és függ a növény korától is (MATSCHKE 1985; LÁNG 1998; VINA et al. 1998; SREENIVASULU et al. 1999; TSUGANE et al. 1999; KOCZKA et al. 2000; ROUT et al. 2000). A peroxidáz aktivitás abszolútértékét tehát csak bizonyos feltételek mellett hasonlíthatjuk össze az egyes fajok, fajták esetében, a tűrőképességre a stresszreakció erősségéből (az alapállapottól való eltérésből) következtethetünk.

A kadmiumstressz vizsgálatok kapcsán külön kiemelendő, hogy más fajokkal végzett kísérletekben 2-1000 µM Cd^{2+}/ l koncentrációt alkalmazva már szignifikánsan nagyobb peroxidáz aktivitást és a növény növekedésének erőteljes gátlását tapasztalták (BHANDAL és BALA 1989; BERTELS 1989; LI et al. 1992; CHEN és KAO 1995; BLINDE et al. 1996; GALLEGO et al. 1996; CHAOUI et al. 1997; JENTSCHKE 1999; KONG et al. 1999; TAHLIL et al. 1999; LESKÓ et al. 2000; LESKÓ 2001).

Az eredményeket elemezve megállapítható, hogy a fiatal ginkgó növények a 10^{-6}-10^{-5} M Cd^{2+} koncentrációknál csak enyhe stresszreakciót mutattak. A kadmium toxicitását figyelembe véve a kísérletben szereplő magasabb koncentrációk (10^{-4}-1 M Cd^{2+}) igen magas nehézfémstresszt jelentettek, melyre már szignifikáns peroxidázaktivitás növekedéssel reagált a faj. A növények a kísérlet során nem pusztultak el, hanem végig fokozatosan erősödő stresszreakciót mutattak. Mindezeket értékelve elmondható, hogy a fiatal ginkgó növények igen jó kadmiumtűrő képességgel rendelkeznek.

A sóstressznek kitett növények gyökerében és levelében a növekvő sókoncentrációval szignifikánsan nőtt a peroxidáz aktivitás.

Fontos megjegyezni, hogy a szakirodalmi hivatkozások szerint a legtöbb kísérletben 0-225 mM NaCl koncentrációk hatását vizsgálták más fajoknál (GOSSETT et al. 1993; SEHMER et al. 1995; SHEOKAND et al. 1995; HURKMAN és TANAKA 1996; LOPEZ et al. 1996; PIQUERAS et al. 1996; BANKS et al. 1997; FOWLER et al. 1997; LIAO et al. 1997; ROXAS et al. 1997; COMBA et al. 1998). Az általam alkalmazott koncentrációk közül a 400 mM NaCl-os kezelés tehát magasnak ítélhető. A peroxidáz aktivitás alapján nyomon követett stresszhatás a ginkgó esetében még ennél a koncentrációnál sem jelentkezett extrém erősséggel.

A ginkgó stresszreakcióinak értékelése alapján a fiatal ginkgó növények a viszonylag nagyfokú sóstressz hatásait kompenzálni tudják, azaz jó sótűréssel rendelkeznek.

Javaslom a kadmium- és a sóstressz tesztelését idősebb növényeken tenyészedényes kísérletekkel, illetve más nehézfémek hatásának vizsgálatát is. A nehézfém stresszel szembeni ellenálló képesség és a sótűrés fontos kritériuma a várostűrésnek. A faj tűrőképességének igazolásával tudományosan alátámasztható a ginkgó városi sorfának való alkalmassága és a környezetvédelemben betöltött potenciális szerepe.

Magkísérletek

Többéves megfigyeléseim során azt tapasztaltam, hogy a magvak származási helyének, begyűjtési idejének, a tárolás idejének és módjának szignifikáns hatása van a csírázóképességre.

Kísérleteimben az ELTE Botanikus Kertjéből származó magvak mindig jobb csírázó képességet mutattak, mint a SZIE Budai Arborétumából begyűjtött magvak. A ginkgó esetében döntő hatása van a csírázóképességre az ivaránynak, illetve a termőfák korának (BÄRTELS 1989; DEL TREDICI 1989; DEL TREDICI 1991; MELZHEIMER 1992). Míg az ELTE-n 2 nőivarú egyed mellett 3 hímivarú áll, koruk legalább 200 év, addig a SZIE-n az ivararány 1:1 és a fák is „csak" 100 évesek. Az eltérő csíraképesség tehát valószínűleg ezen tényekkel magyarázható.

Megfigyeléseim szerint leggyengébben (62-70%) a legkorábban lehullott, illetve a csak a tél végén felszedett magvak csíráztak. A szaporító anyag november vége és január vége közötti időszakban begyűjtve mutatta a legnagyobb csírázóképességet (78-88%). A hazai időjárási viszonyokat figyelembe véve a november végi begyűjtés javasolható, amikor a magvak már tömegesen, szinte teljes mennyiségben lehullottak.

Szignifikáns eltérés van a közvetlenül szedés után, illetve a csak tavasszal elvetett magvak csírázóképessége között. A tavasszal vetett magvak egyöntetűbben és nagyobb százalékban csíráztak ki valamennyi begyűjtési időpont esetén. A megfelelő tárolás során növekvő csírázóképesség magyarázható a ginkgófa különleges termékenyülési és érési viszonyaival, illetve feltételezhető bizonyos csírázásgátló anyagok időbeli lebomlása is. Hűtőben tárolva tehát a mag nem veszíti el csírázóképességét, ugyanis megfelelően hűvös helyen van, és műanyagtasakban tárolva nem lép fel káros mértékű dehidráció.

A kétélű magvak jóval nagyobb arányban (84%) csíráztak ki, mint a háromélűek (62%), és a kétélű magvak kelése is dinamikusabb volt. Peroxidáz aktivitásukban azonban nem jelentkezett különbség a kétféle alakú magvaknál. Ezenkívül a háromélű magvak jóval kisebb arányban (kb. 10 %) fordulnak elő. Ezek alapján véleményem szerint a magvak éleinek száma nem határozza meg a nemet, tehát cáfolom MELZHEIMER (1992) kijelentését.

A ginkgófát hazánkban általában magról szaporítják. Korábban végeztek kísérleteket a faj csíráztatásával kapcsolatban, azonban a fizikai magkezelések összehasonlító vizsgálatára most került sor először.

Többéves tapasztalataim szerint a vetés előtti forró vizes magkezelés hatására jelentősen javul a csírázási százalék (1.3-1.6-szor). Ez a tapasztalat megegyezik BÄRTELS (1989) megfigyeléseivel. Hasonlóképpen jobb csírázási eredmény (1.2-1.6-

szoros) adódik a magvak mechanikai koptatása után. Ezek alapján elmondható, hogy fizikai magkezeléssel (forrázás vagy mechanikai koptatás) szignifikánsan javítható a csírázási százalék.

A magkezelést követő stresszreakciók laboratóriumi vizsgálata – amely magától értetődően a csírázás előtti állapotot mutatja –, valamint a csíráztatási kísérletek eredményei között tapasztalható összhang alapján elmondható, hogy a peroxidáz aktivitási szinttel jól jellemezhető a fizikai magkezelések hatása. Az aktívabb, jobban csírázó magvakban jelentősen magasabb (2.2-2.7-szeres) peroxidáz aktivitás mutatkozott meg. Fizikai magkezelés hatására tehát a magban egyfajta stresszreakció alakul ki. A magasabb aktiváltság, a „készenléti állapot" előnyösen hat a csírázás megindulására. A koptatás elvékonyítja, a forrázás pedig megpuhítja a maghéjat, ezáltal elősegíti annak felnyílását.

A magkezelések (koptatás, forrázás) elvégzése rendkívül egyszerű, könnyen megoldható, hatásuk pedig nagyon kedvező a csírázás fokozására, ezért alkalmazásuk feltétlenül javasolható.

Dugványozás

A kísérletsorozatban a kezeletlen dugványok esetében 57-68 %-os gyökeresedési arányt tapasztaltam a fajnál. A gyökeresedést serkentő hormonkezelés (fás dugványnál: 2000 mg/l IVS, 1000 mg/l NES, 20 v/v % DMSO; zöld dugványoknál: 1000 mg/l IVS, 500 mg/l NES, 20 v/v % DMSO) valamennyi esetben szignifikánsan jobb gyökeresedést eredményezett a kontrollcsoporthoz viszonyítva. Hormonkezeléssel átlagosan 77-86 %-os gyökeresedést tapasztaltam. Eredményeim alátámasztják a más szerzők megfigyeléseit (DIRR és HEUSER 1987; BÄRTELS 1989; DEL TREDICI 1991; HUH és STABA 1992; HAN et al. 1996; CAI et al. 1998; LI et al. 1998), illetve a faiskolai gyakorlatot. Elmondható tehát, hogy a ginkgófa jól szaporítható dugványozással.

A fajra jellemző érdekesség, hogy az idős (8-10 éves) termőnyársak is rendkívül jól gyökeresednek. Ugyanezt tapasztalta DIRR és HEUSER (1987) is. Ez a szokatlan jelenség nagyon figyelemre méltó, ugyanis általában a juvenális részek mutatnak nagyobb gyökeresedési erélyt (HARTMANN et al. 1990; SCHMIDT 1995).

A vizsgálatok során a zöld és a fás dugványok gyökerezési arányában nem jelentkezett különbség, tehát mindkét módszer egyaránt alkalmas a ginkgó szaporítására.

A hím- és nőivarú fákról származó dugványok között egyik kísérletben sem jelentkezett szignifikáns különbség, tehát az anyanövény neme nem befolyásolja a dugvány gyökeresedését.

Megfigyeléseim szerint döntően az alapi/ csúcsi eredet határozza meg a gyökeresedés sikerességét. Az alapi dugványok valamennyi vizsgálat során nagyobb (1.3-2.6-szoros) arányban gyökeresedtek, mint a csúcsi dugványok. Ez a tapasztalat egyezik a szakirodalomban található utalásokkal (DIRR 1983; BÄRTELS 1989). Elmondható tehát, hogy *alapi dugványokat célszerű használni, és a gyökeresedési erély jelentősen javítható hormonkezelés alkalmazásával*.

Izoenzim vizsgálatok gélelektroforézissel

A malát dehidrogenáz különösen jól festődött. Az előkísérletekben tapasztalt háromsávos mintázat igen biztató arra nézve, hogy *az izolálás specifikussá tételével nagyon jól jellemezhető későbbiekben a faj MDH izoenzim mintázata*.

A glutamát dehidrogenáz is jól festődött. A levélmintáknál a nemek között eltérést tapasztaltam. Ezek alapján *feltétlenül javaslom a további vizsgálatokat a glutamát dehidrogenáz enzimmel*.

A foszfoglüko mutáz igen jól festődött, a vastag sávok helyén azonban még további frakciók jelenléte feltételezhető. Bár a fiatal egyedek között nem mutatkozott eltérés, a jó festődés miatt *javaslom az enzim további vizsgálatát*, mellyel a faj nemtől független izoenzim mintázatát meghatározhatjuk.

A glükóz-6-foszfát izomeráz esetében a fiatal növények gyökeréből kimutatott kétféle izoenzim mintázat pontosan 50-50 %-os megoszlásban fordult elő. *Ez az eredmény rendkívül biztató arra nézve, hogy az enzim segítségével lehetőség nyílna a faj korai (a szaporítóképletek megjelenése előtti) ivari elkülönítésére. Ez természetesen beható vizsgálatokat, évekig tartó tanulmányozásokat igényel, melyet mindenképpen javaslok egy kutatócsoportnak elvégezni.*

A szuperoxid dizmutáz izoenzim vizsgálatakor csak a nyugalomban lévő rügyeknél tapasztaltam jelentős eltérést a hím- és nőivarú egyedek között. Feltételezhető, hogy a tapasztalt különbségek az élettani folyamatok nem szerint eltérő dinamizmusával magyarázható. (A hímivarú egyedek tavasszal korábban rügyeznek és ősszel hamarabb hullatják le leveleiket.) Ezek szerint a nyugalmi állapot szolgálhat az egyes egyedek nemének szuperoxid dizmutáz izoenzimek segítségével történő meghatározására.

A gyökerekben a peroxidáz izoenzimek vizsgálatakor jelentős eltérést tapasztaltam a nemek között mind az izoenzimek számában, mind azok aktivitásában. A peroxidáz izoenzimek gyökérből történő kimutatása tehát alkalmas az ivari elkülönítésre.

Az észteráz izoenzimek vizsgálata során a gyökerekben az elkülönített izoenzim frakció aktivitásában lehetett különbséget kimutatni a nemek között, míg a leveleknél az őszi mintáknál adódott egyértelmű eltérés az észteráz izoenzim mintázatban.

Összességében megállapítom, hogy a keményítő gélelektroforézis alkalmas a *Ginkgo biloba* L. különböző részeiből kimutatható izoenzim mintázatok meghatározására. Fontos kiemelni a gélelektroforézis előnyeként a módszerek egyszerűségét és viszonylagos olcsóságát. Az egyes analízisek elvégzéséhez igen kevés minta elegendő. *Különösen a malát dehidrogenáz, a glutamát dehidrogenáz, a foszfoglükóz mutáz és a glükóz-6-foszfát izomeráz vizsgálatával történő analíziseket tartom perspektivikusnak a genetikai változatok kimutatására. Ivari elkülönítés céljából feltétlenül javasolt a glükóz-6-foszfát izomeráz, a szuperoxid dizmutáz, a peroxidáz és az észteráz enzimek további analízise.*

A munkám során elvégzett vizsgálatok eredményesek voltak, de természetesen újabb kérdéseket vetettek fel, melyek alapján a kutatómunka továbbvihető.

5. A szerzőnek az értekezés témaköréhez kapcsolódó közleményei, előadásai

1. **Koczka N.** - Stefanovitsné Bányai É.: Esterase and peroxidase isozyme patterns of *Ginkgo biloba* L. from Hungarian area. I. International Meeting of Young Scientist in Horticulture. Proceedings, Lednice, 1998. 52.

2. **Koczka N.** - Kiss M. - Stefanovitsné Bányai É.: A *Ginkgo biloba* L. peroxidáz izoenzimei. Lippay János és Vas Károly Tudományos Ülésszak Összefoglalói, Budapest, 1998. 140-141.

3. **Koczka N.** - Stefanovitsné Bányai É.: A ginkgófa (*Ginkgo biloba* L.) botanikája. Olaj Szappan Kozmetika, Budapest. 1998. 47 (5): 229-232.

4. **Koczka N.** - Stefanovitsné Bányai É.: A *Ginkgo biloba* L. ökológiai igényei és termesztése. Olaj Szappan Kozmetika, Budapest. 47 (6): 275-277.

5. **Koczka N.** - Stefanovitsné Bányai É.: A ginkgófa (*Ginkgo biloba* L.) felhasználása. Olaj Szappan Kozmetika, Budapest. 1999. 48 (1): 14-16.

6. Stefanovitsné Bányai É. - **Koczka N.**: A *Ginkgo biloba* L. ivari elkülönítésének lehetősége. Olaj Szappan Kozmetika, Budapest. 1999. 48 (2): 64-67.

7. Stefanovits- Bányai, É. - **Koczka, N.** - Orlóci, L.: Charakterization of *Ginkgo biloba* L. by Isoelectric Focusing. Horticulture Plant Breeding to start with XXI century. Lublin, 1999. Proceedings 587-590.

8. **Koczka N.**: A ginkgófa (*Ginkgo biloba* L.) a környezetvédelemben. V. Ifjúsági Tudományos Fórum. Konferencia Kiadvány, Keszthely. 1999. 93-97.

9. Szabó L. – **Koczka N.**: A ginkgófa. Élet és Tudomány, Budapest. 1999. 54 (38): 1193-1195**.**

10. **Koczka N.** – Orlóci L. – Tölgyesi A. – Ferenczy A. Z.: Fizikai magkezelések hatása a Ginkgo biloba L. csírázására. Kertgazdaság, Budapest. 1999. 31 (4): 8-12.

11. Stefanovits-Bányai, É. - **Koczka, N.** - Orlóci, L.: Esterase and Peroxidase Isozyme Patterns of *Ginkgo biloba* L. from Botanical Garden. Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetem Közleményei, Budapest. 1999. (vol. 59) 37-41.

12. **Koczka, N.** - Orlóci, L.: Möglichkeit der autovegetativen Vermehrung von *Ginkgo biloba* L. Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetem Közleményei, Budapest. 1999 (vol. 59) 32-36.

13. **Koczka N.**: A ginkgófa szerepe a környezetvédelemben. Erdészeti Lapok, 2000 (135) : 112.

14. **Koczka,** N. – Stefanovits-Bányai, É. – Dimény, J. – Orlóci, L.: Salt tolerance of *Ginkgo biloba* L. 12th FESSP Congress. Budapest, 2000. August 21-25. Proceeding. 194.

15. **Koczka, N.** – Orlóci, L. – Ferenczy, A. Z. – Stefanovits-Bányai, É. – Dimény, J.: Effect of physical treatments on germination of *Ginkgo biloba* L. International Journal of Horticultural Science vol. 6(4).2000 :31-34.

16. **Koczka,** N. – Orlóci, L. – Dimény, J. – Stefanovits- Bányai, É.: Effect of cadmium stress on peroxidase activity of *Ginkgo biloba* L. IX. International Trace Microelement Symposium, Budapest, 2000. Proceedings. 159-165.

17. **Koczka N.** – Pogány M. – Dimény J. – Stefanovitsné Bányai É.: A *Ginkgo biloba* L. szuperoxid-dizmutáz izoenzimei. Lippay János és Vas Károly Tudományos Ülésszak Összefoglalói, Budapest, 2000. 210-211.

18. **Koczka N.** – Orlóci L. – Dimény J. – Stefanovitsné Bányai É.: A *Ginkgo biloba* L. kadmiumtűrése. Lippay János és Vas Károly Tudományos Ülésszak Összefoglalói, Budapest, 2000. 88-89.

19. **Koczka N.** – Stefanovitsné Bányai É. – Kosáry J.: A ginkgófa (*Ginkgo biloba* L.) lipoxigenázainak vizsgálata. Lippay János és Vas Károly Tudományos Ülésszak Összefoglalói, Budapest, 2000. 208-209.

20. Stefanovitsné Bányai É. – Kiss A.S. – Szőllősi Varga I. - **Koczka N.**.: Előzetes vizsgálatok a *Ginkgo biloba* L. levelének elemösszetételéről. 7. Magyar Magnézium Szimpózium, Siófok. Összefoglalók. 2001. 49-50.

21. **Koczka, N.** – Stefanovits-Bányai, É.: Preliminary studies on charakterisation of some isozymes of *Ginkgo biloba* L. by gelelectrophoresis. World Conference of Medicinal and Aromatic Plants, Budapest. Proceedings. 2001. 168.