



Szent István Egyetem

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

Doktori (PhD) értekezés

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

JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	1
1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS	2
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	4
2.1. Az orchideafélék családjának elterjedése és bemutatása.....	4
2.2. A természetvédelem jelentősége az <i>Orchidaceae</i> család fajainak megőrzésében	6
2.2.1. Nemzetközi és hazai egyezmények, természetvédelmi programok.....	7
2.3. Az orchideák fennmaradásának veszélyeztető tényezői és a klímaváltozás hatása	11
2.3.1. Veszélyeztető tényezők.....	11
2.3.2. A klímaváltozás hatása az orchideafélékre	12
2.4. A <i>Himantoglossum adriaticum</i> – adriai sallangvirág általános bemutatása.....	14
2.5. Az orchideafélék szaporodásbiológiája.....	14
2.6. A teresztris orchideák <i>in vitro</i> szaporítási lehetőségei	16
2.6.1. Maggyűjtés és a magok tárolása	18
2.6.2. A magok előkezelése	19
2.6.3. Az <i>in vitro</i> , aszimbiotikus magvetéshez használt táptalaj	20
2.6.4. Az <i>in vitro</i> , szimbiotikus magvetéshez használható táptalajok	23
2.7. Az orchidea típusú mikorrhiza, és izolálási módszerei	23
2.8. Orchidea mikorrhiza gombacsoportok	27
2.8.1. <i>Rhizoctonia</i> -forma nemzetség.....	27
2.8.2. Egyéb bazídiumos és aszkuszos gombák.....	28
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	30
3.1. A <i>H. adriaticum</i> magok <i>in vitro</i> aszimbiotikus csíráztatási kísérletei.....	30
3.1.1. Az <i>in vitro</i> aszimbiotikus csíráztatásához felhasznált <i>H. adriaticum</i> magok eredete, tárolása, mennyisége.....	30
3.1.2. Az <i>in vitro</i> aszimbiotikus magvetés kísérletei, táptalaj módosítások	30
3.1.3. Az <i>in vitro</i> aszimbiotikus magvetés, tárolás az első protokormok megjelenéséig	33
3.2. A <i>H. adriaticum</i> növények <i>in vitro</i> aszimbiotikus nevelési kísérletei.....	34
3.3. A <i>H. adriaticum</i> mikorrhiza gombapartnerének meghatározása gyökérből	35
3.3.1. A mikorrhiza gombák kitenyésztése különböző táptalajokon	36
3.3.2. Az optimális pH meghatározása a kitenyésztett gombák számára	37
3.3.3. A Petri-csészében kitenyésztett, izolálásra beadott gombafaj meghatározása molekuláris genetikai vizsgálatokkal.....	38
3.3.4. <i>H. adriaticum</i> gombapartnerének meghatározása molekuláris genetikai vizsgálatokkal, gyökérszegmensből	39
3.4. A <i>H. adriaticum</i> magok szimbiotikus csíráztatási kísérletei	40
3.5. Az <i>in vitro</i> nevelt <i>H. adriaticum</i> növények kiültetési kísérletei.....	41
3.6. Az adatfeldolgozás módszerei.....	44
4. EREDMÉNYEK.....	45
4.1. A <i>H. adriaticum in vitro</i> aszimbiotikus csíráztatásának eredményei	45

4.1.1.	Csírázási eredmények a pH gradiens mentén	45
4.1.2.	Csírázási eredmények a KCl mennyiségének változtatása esetén, optimalizált pH-jú (pH 7) MFA táptalajon	47
4.1.3.	Csírázási eredmények az NH ₄ NO ₃ mennyiségének változtatása esetén, optimalizált pH-jú (pH 7) MFA táptalajon	48
4.2.	A <i>H. adriaticum in vitro</i> aszimbiotikus nevelési eredményei	50
4.2.1.	A kókuszvíz hatása a csíranövények fejlődésére	50
4.2.2.	Az ezüst-nitrát hatása a csíranövények fejlődésére	54
4.2.3.	Kókuszvíz + ezüst-nitrát együttes használatának hatása a csíranövények fejlődésére	55
4.2.4.	Az <i>in vitro</i> nevelt növények fejlődése különböző tartási (fény és hőmérsékleti) körülmények között	58
4.3.	A <i>H. adriaticum</i> mikorrhiza gombapartnereinek meghatározása és vizsgálatai	61
4.3.1.	A <i>H. adriaticum</i> mikorrhiza partnereinek kitenyésztése különböző táptalajokon	61
4.3.2.	A kitenyésztett gombák számára optimális pH meghatározásának kísérlete	62
4.3.3.	A meghatározásra beadott <i>H. adriaticum</i> gyökérből kitenyésztett gombafaj izolálási eredménye és a vizuálisan, mikroszkóp alatt meghatározott további fajok	65
4.3.4.	A beadott <i>H. adriaticum</i> gyökérszegmensből meghatározásra került gombapartnerek	68
4.4.	A <i>H. adriaticum</i> magok szimbiotikus csíráztatási és nevelési kísérleteinek eredményei	72
4.5.	Az <i>in vitro</i> nevelt <i>H. adriaticum</i> növények kiültetési kísérleteinek eredményei	77
4.6.	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	80
5.	KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	81
6.	ÖSSZEFOGLALÁS	84
7.	SUMMARY	86
8.	MELLÉKLETEK	88
	IRODALOMJEGYZÉK	88
	További mellékletek	102
	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	105

JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

FA – Fast táptalaj

MFA – módosított Fast táptalaj

PDA – Potato Dextrose Agar – Burgonya-dextróz alapú táptalaj

BM – benomilos maláta agar

BRM – bengálrózsás maláta agar

DNS – dezoxiribonukleinsav

ab – abundancia

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

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 terresztris (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 terresztris fajokat találunk, így hazánkban is kizárólag talajlakó orchideafélék élnek. Magjaik aprók, endospermium hiányában egyedül képtelenek a csírázásra, ehhez úgynevezett orchid mikorrhizákra, szimbionta 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 terresztris 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 kipusztulással 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 gyökérből 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. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Az orchideafélék családjának elterjedése és bemutatása

Az *Orchidaceae* család az egyik legfajgazdagabb a zárvatermők között. Kevés módszeres elemzés történt a család méretének meghatározására, ezért a pontos fajszámra mindmáig csak becsléseink vannak. NASH et al. (2005) alapján nagyságrendileg 800-900 nemzetség és 25-35.000 faj alkotja a családot, míg GARAY (1960) 30.000-re, WILLIS (1973) 17.000-re, MADISON (1977) 30.000-re, DRESSLER (1981) 19.192 fajra, ATWOOD (1986) módszereivel pedig 19.128 fajra becsülte meg a család nagyságát. A legfrissebb összegzés alapján körülbelül 880 nemzetség és 26.000 faj alkotja a családot. Részletesebben az *Apostasioideae* alcsaládban 2 nemzetség 15 fajjal, a *Vanilloideae* alcsaládban 14 nemzetség 245 fajjal, a *Cypripedioideae* alcsaládban 5 nemzetség 170 fajjal, az *Orchidoideae* alcsaládban 208 nemzetség 3755 fajjal, az *Epidendroideae* alcsaládban pedig 650 nemzetség 21800 fajjal képviselteti magát (INTERNET-1 2019). Ebből is látható, hogy a faji diverzitás miatt igen nehéz naprakész információt adni az orchideafélék pontos fajszámáról. Mindezek mellett, ha beleszámítjuk a keresztezéseket, hibrideket és változatokat is, akkor ez a szám meghaladhatja a 100.000-res nagyságrendet. Ez a rendkívüli diverzitás a virágzatra is jellemző, amely miatt a botanikusok és a növények szerelmesei méltán találják lenyűgözőnek ezt a növény családot.

A fajok világszerte, az Antarktiszon kívül minden kontinensen megtalálhatók (NICHOLSON et al. 2008). A kosborfélék családjának kora is igen vitatott. JANSSEN és BREMER (2004) alapján 111 millió évvel ezelőttre, míg CHOMICKI et al. (2014) által rekonstruált idővonalon 93,7 (121-75) millió évvel ezelőttre becslik a család keletkezését.

Az bizonyos, hogy RAMÍREZ et al. (2007) a Dominikai Köztársaságban, kövült fenyőgyantában, borostyánban találták meg a *Proplebeia dominicana* nevű méhfaj nagyjából 15–20 millió évvel ezelőtt élt példányát, amelynek potrohán egyértelműen orchideától származó pollencsomagot fedeztek fel. A lelet kormeghatározása, további fossziliák vizsgálata és a filogenetikai törzsfák elkészítése alapján a ma élő orchideák legközelebbi közös őseinek elválása a rokonoktól körülbelül (90-)84-76(-72) millió évvel ezelőttre, a kréta korszak végére tehető (RAMÍREZ et al. 2007). GUSTAFSSON et al. (2010) által rekonstruált törzsfák alapján 80 (56-105) millió évvel ezelőttre, a késő kréta időszakára becslik az *Orchidaceae* család legközelebbi közös őseinek kialakulását.

A Föld kontinensein megtalálható orchideafajok számát tekintve, Észak-Amerikában 200, Közép-Amerikában 1000, Dél-Amerikában 6-8000 faj, Európában 200, Afrikában 2000, Ázsiában 10-15.000, Ausztráliában 700 faj honos (R. ESZÉKI 2012). A fajok elterjedését az abiotikus

tényezők jelentősen szabályozzák. Ezek közül az egyik legfontosabb a klíma. A fajok elterjedése az éghajlattal van összefüggésben, melynek legfontosabb elemei a csapadék, a hőmérséklet és a fény mennyisége.

A család közel 90%-a a trópusokon, fákon él (epiphyta) (JEŽEK 2005). Ez a szám KRESS (1986) alapján 73%. A talajlakó (terresztris) fajok az orchideafélék kisebb részét teszik ki. A mérsékelt égöv területén, így hazánkban is, terresztris fajok fordulnak elő.

Rendkívül változatosak, néhányuk akár 1,5 méter magasra is megnőhet, néhányuk viszont alig éri el a 10 cm-es magasságot. A savanyú (pH 4) tőzegmohalápoktól kezdve az enyhén lúgos (pH 8,5) talajokig, a száraz sztyepprétektől, sziklagyepektől az állandó vízzel borított úszólápokig, a nyílt, fényben gazdag rétektől kezdve a sötét, sűrű, zárt lombkoronaszintű erdőkig bármilyen élőhelyen és klímán megtalálhatók. Néhány faj a trópusi égövben is megtalálható, néhányuk pedig a hideg, fagyos teleket is kibírják. A hűvös klímán megtalálható legtöbb faj terresztris. Ezen fajok többsége lombhullató, nagyobb részük tavasszal hozza az új tőlevélrózsáját, kisebb részük ősszel, majd áttelelnek. Mindezek alapján elmondható, hogy a terresztris orchideafajok széles élőhelyspektrummal rendelkeznek, köztük társulásközömbös fajok és élőhelyspecialisták egyaránt megtalálhatók.

Az áttelelő szerv alapján két csoportot különböztethetünk meg: gyöktörzssel rendelkező és ikergumós fajokat. A két csoport fajai ivaros szaporodásukban, így megtermékenyülésükben is jelentős különbséget mutatnak. Az ikergumós fajok megtermékenyülési aránya jelentősen magasabb, mint a gyöktörzses fajoké, melynek fő oka az lehet, hogy a rhizómás fajok főleg erdőkben, árnyas helyeken előforduló fajok, így esetükben kevesebb a beporzó faj mennyisége, így az értett termés is, viszont ezek a fajok képesek gyöktörzsről is szaporodni, ezért esetükben valószínűleg ez a szaporodási mód az elsődleges. MOLNÁR V. (2011) alapján például a *Cephalanthera rubra* (piros madársisak) gyöktörzses faj 293 virágából 38 termés (~13%-os megtermékenyülés), míg a *Anacamptis coriophora* (poloskaszagú sisakoskosbor) ikergumós faj 3898 virágából 3436 termés fejlődött (~88%-os megtermékenyülés). Saját vizsgálataim alapján a *Cephalanthera rubra* esetében a Jászfényszarui populáció és a Bükk Nemzeti Park területén található 3 állomány 1044 virágból 268 termékenyült meg, így a megtermékenyülés 26%-os (GILIÁN et al. 2019), az *Anacamptis coriophora* (poloskaszagú sisakoskosbor) elzamajori populációjában pedig 1494 virágból 754 termékenyült meg, így ennek a fajnak a megtermékenyülési aránya ~51%-os (GILIÁN 2012).

A Kárpát-medence, Kárpátok, és így Magyarország orchideafldróját először KELLER és SOÓ (1930) dolgozták fel „Európa és a mediterrán orchideák monográfiája és ikonográfiája” címmel.

Jelenleg, a legújabb hazai orchideafldrót bemutató irodalom a Molnár V. Attila által szerkesztett Magyarország orchideáinak atlasza. Ez alapján Magyarország területéről 67

orchideafajt írtak már le, melyek közül a *Malaxis monophyllos* (L.) Swartz (egylevelű lágyvirág), a *Herminium monorchis* (L.) R.Br. (egy gumójú minka) és a *Spiranthes aestivalis* (Poir.) Rich. (nyári füzértekerces) fajok előfordulásáról több, mint 50 éve nincs adat, ez alapján ezek a fajok Magyarország területéről kipusztultnak tekinthetők, a *Goodyera repens* (L.) R.Br. (kúszó avarvirág) eltűntnek tekinthető, mivel már több, mint 10 éve nincs bizonyított előfordulása hazánkban, az *Ophrys bertolonii* (Bertoloni-bangó) pedig 2010-ben újonnan felbukkanó faj volt, azonban előfordulásáról azóta sincsen új adat (MOLNÁR V. et al. 2011a). Így elmondható, hogy jelenleg 62 orchideafaj van tartósan jelen az országunk flórájában (MOLNÁR V. et al. 2011b). Ezt a fajszámot viszont érdemes bizonytalanként kezelni, egyrészt a taxonómiai bizonytalanságok miatt, másrészt amiatt, hogy az *Epipactis* nemzetség esetében felröppennek az orchideákkal foglalkozó „rajongók” és szakemberek között, szakirodalomban még nem közölt, de elmondás alapján megtalált fajok (KIRÁLY 2009; MOLNÁR V. et al. 2011b). Emellett a klímaváltozás hatására előfordulhat, hogy a jövőben új fajok is megjelennek hazánkban.

2.2. A természetvédelem jelentősége az *Orchidaceae* család fajainak megőrzésében

Természetvédelmi szempontból megkülönböztetünk passzív és aktív természetvédelmet. Passzív természetvédelemnek azt nevezzük, amikor az egyedek darabszámának növelésébe nem avatkozunk be mesterségesen, hanem a környezeti feltételeket próbáljuk meg olyan irányba eltolni, hogy az az adott csoport egy vagy több tulajdonságának (jelen esetben a növények szaporodásának) kedvezzenek. Ilyen tevékenység például a kerítésépítés annak érdekében, hogy a vadak ne tudjanak kárt okozni a védendő állományban, vagy védőfalak építése az autópályák mellett, melyek a környező természetes élőhelyek megóvására szolgálhatnak. Az aktív természetvédelem pedig az, amikor az ember olyan tevékenységet végez, mellyel közvetlenül tud hozzájárulni a kitűzött természetvédelmi célok eléréséhez, pl. ritka fajok egyedszámának növekedéséhez. Az aktív természetvédelem hazánkban legáltalánosabban elterjedt módszerei (a kaszálás, legeltetés, cserjeirtás, árasztás, gyepesítés) mellett megjelent egy újabb aktív természetvédelmi kezelési lépés: a méhészet által hozott haszon. Ennek lényege, hogy a méhcsaládokat nem vándoroltatják, hanem kifejezetten a természetvédelmi értékekben gazdag területeken tartják. KÖRMENDY-RÁCZ (2017) ezzel a módszerrel a Duna–Ipoly Nemzeti Park területén két bíboroskosbor állomány egyedszámát az egyik esetben háromról 22 darabra, a másik területen pedig háromról 36 darabra növelte. A felmérések során kiderült, hogy nem csak az orchidea faj esetében történt pozitív változás a területeken, hanem több védett növényfaj szaporodása is nagy mennyiségben megindult.

Mindezek alapján látható, hogy a passzív és az aktív természetvédelmi kezelési módok erősítik egymást, azok együttes alkalmazása igen fontos az élővilág sokféleségének megőrzése

érdekében. A méhek megporzó tevékenysége pedig már bizonyítottan is nemcsak a haszonnövények esetén fejt ki a gazdasági hasznát, de a természeti értékeink megóvásában, a védett növények szaporodásában is kimagasló segítséget nyújt (KÖRMENDY-RÁCZ 2017).

2.2.1. Nemzetközi és hazai egyezmények, természetvédelmi programok

A természetvédelemben nagy szerepe van a fajok és az élőhelyek védelmének egyaránt. RODICS (1995) egy átfogó tanulmánykötetben nyújt összefoglalót a természetvédelmi egyezmények kialakulásáról és a nemzetközi összefogás fejlődéséről. Írása alapján a nemzetközi összefogás gondolata már több, mint egy évszázaddal ez előtt megszületett a természet épségéért aggódó emberekben. Akkoriban elsősorban az állatokkal való kereskedelem veszélyét ismerték fel, így az első lépéseket is ilyen irányban, a madarak védelmének érdekében tették meg. Az 1870-es években döbrentek rá arra, hogy a trópusi madártollakkal díszített kalapok divatba kerülése állatok ezreit pusztítja el. 1902-ben pedig létrehozták az első egyezményt a Mezőgazdasági Szempontból Hasznos Madarak Védelmére (Convention for the Protection of Birds Useful to Agriculture). 1916-ban aláírták az Egyezményt a Vonuló Madarak Védelmére (Convention for Protection of Migratory Birds) megállapodást. Ezek után a XX. század során egyre több nemzetközi megállapodás született a témában. 1940-ben látott napvilágot az első olyan nemzetközi megállapodás, amely az élővilágot minden káros emberi beavatkozástól védi, Nyugati Félgömb Egyezmény (Convention on Nature Protection and Wildlife Preservation in Western Hemisphere) néven.

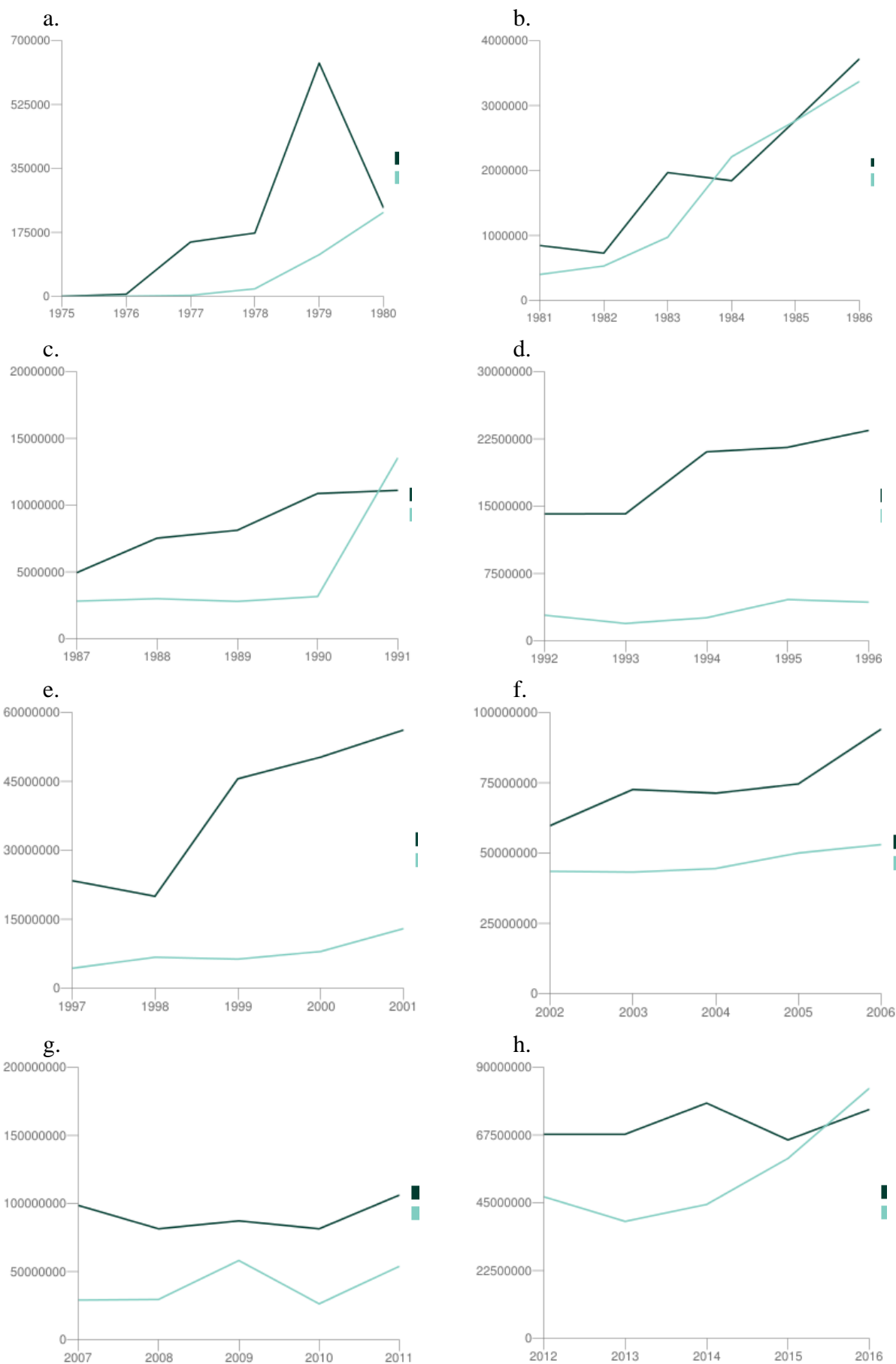
1973-ban létrejött a mai napig talán legnagyobb és legismertebb nemzetközi egyezmény a Washingtoni Egyezmény, azaz CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of wild flora and fauna), mely a veszélyeztetett vadon élő állat- és növényfajok kereskedelmét korlátozza és szabályozza 3 függelékben. Jelenleg 183 részes fele van az egyezménynek, és több mint 35.000 állat- és növényfaj védelmét biztosítja függetlenül attól, hogy maga a kereskedelem élő, vagy élettelen példányokkal, azok részeivel vagy származékaival (pl. szőrmevel vagy szárított gyógynövényekkel) történik.

Az Egyezmény I. és II. függelékében szerepelnek az *Orchidaceae* család fajai és hibridjeik, a szabályozás kiterjed a mesterségesen csíráztatott egyedekre is. Az I. függelékben, amely esetén a fajokkal való kereskedelem szigorúan tilos, 6 trópusi faj (*Aerangis ellisii*, *Dendrobium cruentum*, *Laelia jongheana*, *Laelia lobata*, *Peristeria elata*, *Renanthera imschootiana*) és 2 tópusi nemzetség (*Paphiopedilum*, *Phragmipedium*) összes faja szerepel. Az *Orchidaceae* család összes többi tagja (így a mérsékelt égövi orchideák is) a II. függelékben szerepel, amely alapján a kereskedelemük csak szabályozott keretek között lehetséges, úgynevezett CITES engedélyhez kötött. Ugyanakkor fontos tudni, hogy a steril konténerben szállított, *in vitro* szaporított, szilárd

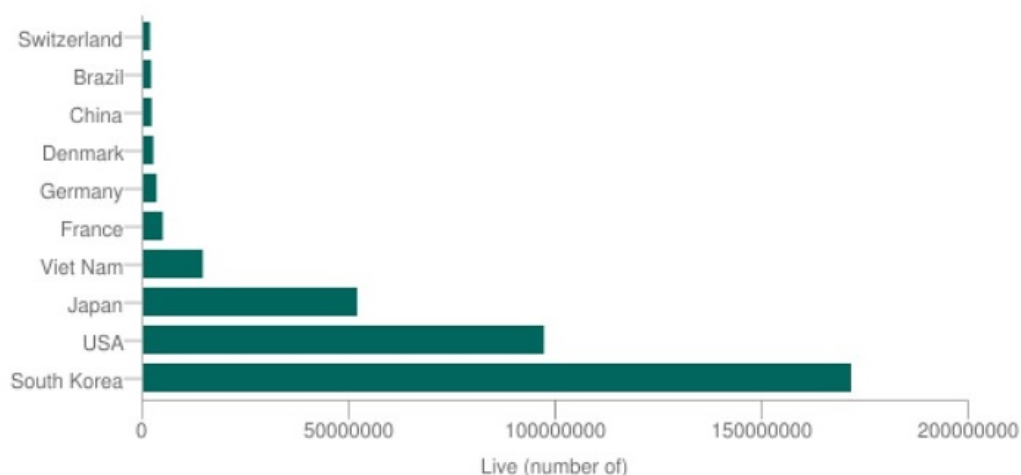
vagy folyékony táptalajon levő magoncokra vagy szövettenyészetekre nem vonatkoznak az egyezmény rendelkezései (CITES 1973, INTERNET-2 2003).

Az 1.a-h ábrákon az orchideákkal való globális kereskedelem mértéke látható 1975-2016 között. Az ábrákról jól leolvasható, hogy az orchideákkal az importőrök által bejelentett kereskedelem mértéke 1975-2011 között hihetetlen gyorsasággal növekedett egészen 100 millió tő/év mértékig, majd 2012-2016 között 67,5-80 millió tő/év a globális import. A bejelentett export rendszerint jóval kevesebb az importnál, sokszor jól láthatóan stagnál, 2002 óta egyértelműen egyre több a bejelentett export, 2013 óta pedig erőteljesen növekszik az exportált orchideák száma. A legtöbb élő orchidea tövet Dél-Korea, az Egyesült Államok és Japán importálja (2. ábra), az exportban pedig Kína, Thaiföld és Hollandia a vezető országok (3. ábra). Az illegális kereskedelem azonban folyamatosan jelen van a világon, az ellenőrzések során rendszeresen találnak CITES I. függelékes fajokat Európában (RODICS 1995). Néhány ország a vadon élő növényvilágára már teljes kiviteli tilalmat rendelt el. Ilyen országok India, Sri-Lanka, Indonézia, Costa Rica, Honduras és Peru.

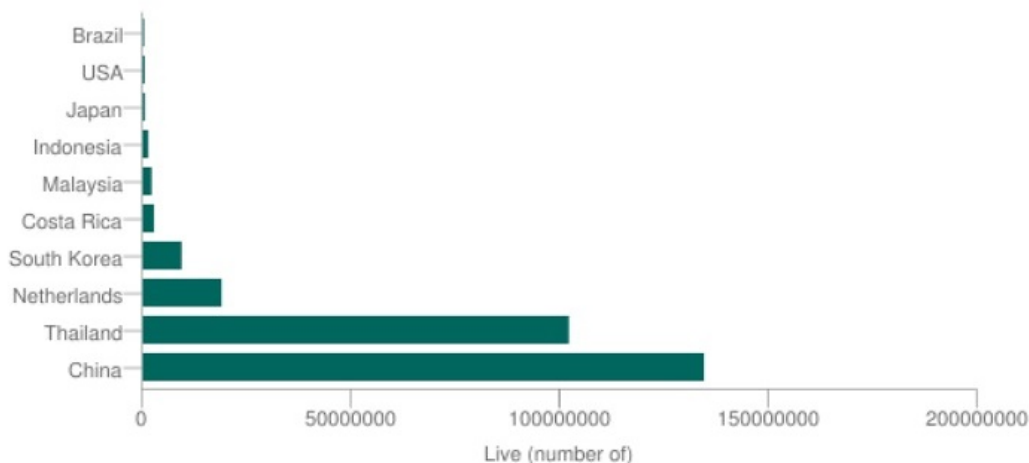
Magyarország 1985-ben csatlakozott a CITES Egyezményhez, melyet az EU-s csatlakozásunk óta az EC No. 338/97 tanácsi rendelet szabályoz. Ennek A és B mellékletében szerepelnek az orchideafélék. Hazánk vadon élő orchideafajai a B mellékletben szerepelnek.



1. ábra Az orchideákkal való globális kereskedelem mértéke (db) 1975-2016 között. A fekete vonal az az importőrök által, míg a világoszöld vonal az exportőrök által bejelentett kereskedelem mértékét jelzi. Forrás: <http://cites-dashboards.unep-wcmc.org/global>



2. ábra A világ 10 legnagyobb orchidea importőr országa.
 Forrás: <http://cites-dashboards.unep-wcmc.org/global>



3. ábra A világ 10 legnagyobb orchidea exportőr országa.
 Forrás: <http://cites-dashboards.unep-wcmc.org/global>

A CITES-en kívül az 1979-ben létrejött, az európai, vadon élő élővilág és a természetes élőhelyek védelméről szóló Berni Egyezmény I. függelékében szerepelnek az orchideafélék. Ehhez az Egyezményhez hazánk 1990-ben csatlakozott.

Az IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources), magyarul a Természetvédelmi Világszövetség, a természetvédelmi értékek megőrzésére, 1948-ban létrehozott nemzetközi szervezet, mely jelenleg több, mint 170 országból, több, mint 1300 taggal rendelkezik. Az egyes államokon kívül tagjai lehetnek kormányzati ügynökségek, országos szintű nem kormányzati szervezetek, társszervezetek és nemzetközi nem kormányzati szervezetek egyaránt. Az IUCN Vörös Lista Program célja, hogy biztosítsa a lakosság, a természetvédők, a nem kormányzati szervezetek, a média, valamint a politikai döntéshozók számára, szigorúan tudományos szempontból meghatározva a legátfogóbb információkat a világ fajainak védettségi

állapotáról annak érdekében, hogy ezek alapján tájékozottan, a legmegfelelőbb döntéseket és intézkedéseket tudják megtenni (BAILLIE et al. 2004).

Ahhoz, hogy megteremtsenek egy objektív és tudományosan elfogadott listát, 1994-ben megfogalmazták a Vörös Lista (Red List of Threatened Plants) kategóriáit és kritériumait (IUCN 1995), melyet 2001-ben felülvizsgáltak (IUCN 2001). Ez alapján a Lista az ismert fajokat kilenc kategóriába sorolja a felmértől (Not Evaluated) a kihaltig (Extinct).

1992-ben az Európai Unió a természetvédelem érdekében megalkotta és kidolgozta az úgynevezett „élőhelyvédelmi irányelvet”. Az irányelv célja, hogy a természetes élőhelyek, valamint a vadon élő állatok és növények védelmével hozzájáruljon a biológiai sokféleség biztosításához a Szerződésben érintett tagállamok európai területén belül (INTERNET-3 1992). Az Irányelv 3. cikke tartalmazza az új, egységes európai ökológiai hálózat, a Natura 2000 fogalmát, amely alapján a „természeti területekből álló hálózat célja, hogy biztosítsa az érintett természetes élőhelytípusok, valamint az érintett fajok élőhelyeinek kedvező védettségi állapotának fenntartását vagy adott esetben helyreállítását természetes kiterjedésükön, illetve elterjedési területükön belül”.

2.3. Az orchideák fennmaradásának veszélyeztető tényezői és a klímaváltozás hatása

2.3.1. Veszélyeztető tényezők

Manapság, az emberi környezetformáló tevékenységek és a változó időjárási tényezők hatására a természetes élőhelyek száma és kiterjedése világszerte rohamosan csökken. Ahogy kezdünk szembenézni a hatodik nagy kihalási krízis időszakával (CANADELL és NOBLE 2001), egyre nagyobb figyelem irányul a biodiverzitás megőrzésére (SWARTS és DIXON 2009). Egyes teresztris orchideák életformájukból adódóan az egyre gyorsabban változó éghajlati folyamatokhoz nem képesek adaptálódni, így a kihalási kockázat esetükben magasabb (SWARTS és DIXON 2009). Az élőhelyek feldarabolódása és a kulcsfontosságú fajok eltűnése nagy veszélyt jelentenek az ökoszisztémák fennmaradására. Az egyre fokozódó tüzek száma, beporzó fajok csökkenése és az inváziós fajok elszaporodása már mind bizonyítottan szerepet játszanak egyes orchidea-populációk és azok genetikai diverzitásának drasztikus csökkenésében (SOSA és PLATAS 1998; COATES és DIXON 2007). MOLNÁR et al. (2015) és MOLNÁR és TAKÁCS (2016) alapján, 2015-2016-ban a pollinációs krízis még nem érintette a magyarországi orchideákat (legalábbis a reprodukív sikerük szempontjából).

Mindezek mellett a nagyravágyó, egzotikumok iránt vonzódó emberek orchidea gyűjtése több vadon élő fajt sodort már a kipusztulás határára (CRIBB et al. 2003). KOOPOWITZ et al. (2003) az 1800-as évek közepétől kezdődően az első világháború kezdetéig terjedő időszakot „az orchidea

gyűjtés aranykora” névvel illette. Ennek következtében számos orchideafaj került „veszélyeztetett” és „sebezhető” IUCN kategóriába (SHIROKOV et al. 2016).

A szárazföldi orchideák elterjedési mértékében és a populációk stabilitásában nemcsak a föld feletti, hanem a föld alatti életszakaszhoz kapcsolódó tényezők is fontos szerepet játszanak (WOOLCOCK és WOOLCOCK 1984; CLEMENTS 1988; DIXON 1989). Ez utóbbihoz tartozik az első ilyen létfontosságú szükséglet, a korábbi alfejezetekben már említett talajfelszín alatt bekövetkező mikorrhizális összekapcsoltság az orchidea és a gomba között (WARCUP 1971; RAMSAY et al. 1986; RASMUSSEN 2002). A második fontos tényező pedig, amely már a föld feletti fázishoz tartozik, a hatékony megporzás és megtermékenyülés (STOUTAMIRE 1983; ROBERTS 2003). Az *Orchidaceae* család nagyfokú taxonómiai diverzitását ennek a két létfontosságú követelmény specializációjának tulajdonítják (SWARTS és DIXON 2009).

Ahhoz, hogy sikeresen meg tudjuk védeni az orchideafajokat szerte a világon, elsősorban azok élőhelyét kell megvédenünk. Azok a fajok, amelyeknek az elterjedési területe nagyon kicsi, sokkal sebezhetőbbek, és jobban ki vannak téve a gyorsan változó környezeti körülményeknek, mint a széles körben elterjedt, generalista fajok. A fajok hanyatlásának oka bár összetett, a populációk hosszútávú fennmaradása részben a magtermelésük mennyiségétől, és azok életképességétől függ, függetlenül a védettségi állapotuk mértékétől (BIRÓ et al. 2014). A fent felsorolt tények alapján fontos, hogy az orchideafélék fajainak élőhelyi adottságai, morfológiai tulajdonságai, reprodukciós sikerük, a magjaik életképessége és azok mesterséges szaporítási lehetőségei egyre több kutatásnak legyenek a központi témái.

2.3.2. A klímaváltozás hatása az orchideafélékre

A szélsőséges időjárási jelenségek egyre gyakoribbá válnak az egész világon (WMO 2011; RAHMSTORF és COUMOU 2011; COUMOU és RAHMSTORF 2012), ami arra utal, hogy az éghajlatváltozás már nemcsak egy jövőbeli fenyegetés, hanem a jelenben zajló, egyre gyorsuló folyamat is. Az éghajlatváltozás hatásai különböző szinteken érzékelhetők, így például közösségi szinten (WOODWARD et al. 1998), faji szinten (JOHNSTON és SCHMITZ 1997) és populáció szinten (COCHRANE et al. 2014) is. Egyre több kutatás irányul a klímaváltozás hatására a különféle fajok és közösségeken belüli eloszlásbeli (PARMESAN és YOHE 2003; THUILLER et al. 2005), túlélési, fenológiai- (FITTER és FITTER 2002; MORELLATO et al. 2016) és reprodukciós sikerbeli (ACKERMANN 1989; AIZEN et al. 2002) változásokra. Rendkívül fontos, hogy megértsük a növényfajok környezeti változásokra adott válaszreakcióit, mivel azok elsődleges termelői szerepük miatt a Föld szinte minden ökoszisztémájának létfontosságú elemei. Mindezek alapján egyre inkább úgy tűnik, hogy a vegetációban vagy a populációkban végbemenő fenológiai illetve reprodukcióbeli változások az elsődleges közvetítői lesznek a klímaváltozás állatvilágra és emberiségre gyakorolt hatásainak (PARMESAN és HANLEY 2015).

A globális felmelegedés arra kényszeríti a növényeket, hogy északabbra és magasabb tengerszint feletti magasságokra húzódva új, megfelelő élőhelyeket keressenek (LENOIR et al. 2008; ENGLER et al. 2011; CHEN et al. 2011), amelyek során a boreális és alpesi fajok és populációk rendkívül sérülékenyekké válnak (THUILLER et al. 2005). Az orchidea populációk ugyanezt a viselkedést mutatják, a síkvidéki régióból a pólusok felé, vagy magasabb tengerszint feletti magasságokra vándorolnak a felmelegedő periódusok során (JACKSON et al. 1987), a hegyvidéki területek lejtőin élő fajok pedig felfelé mozognak a magassági gradiens mentén (THOMPSON 1990). A fény és a nedvesség mennyisége is változik az éghajlati tényezők változásával. Az már ismert, hogy egyes orchideák nagyon érzékenyek a környezeti tényezők változására (FITTER és FITTER 2002; SEATON et al. 2010), és bár a hőmérséklet és a fény enyhe eltéréseit viszonylag jól képesek tolerálni, az elmúlt évtized éghajlatváltozása már az alkalmasabb helyek felé kényszerítette őket terjedni (BARMAN és DEVADAS 2013).

Az elmúlt közel 30 év alatt az európai teresztris orchideafajok élőhelyeinek száma (BARMAN és DEVADAS 2013), ezzel együtt a populációk mennyisége és nagysága is rohamos csökkenésnek indult. Egyre több fajt fenyegeti a kihalás veszélye, így érzékelhetővé és szemmel láthatóvá vált, hogy már nem tudnak lépést tartani az éghajlatváltozással (ROOT et al. 2003; THOMAS et al. 2004). A szélsőséges esőzések például felgyorsíthatják az eróziót (SELBY 1976), az erózió fokozódása és gyakorisága pedig az élőhelyek eltűnése, átalakulása során negatívan befolyásolhatja a hegyekben élő orchidea fajok populációit is (BARMAN és DEVADAS 2013).

Figyelembe véve az orchideák stratégiáját, valamint a nagymértékű sérülékenységüket és azokat a válaszokat, amelyeket a biotikus és az abiotikus környezeti feltételekre adnak, visszacsatolhatunk az előző bekezdés (2.8.1) során levont következtetésre: az adott orchideafaj túlélésének legfontosabb tényezője a megtermékenyülési arány fenntartása, vagy még inkább növelése, ami pedig nagyban függ a beporzóktól (TREMBLAY et al. 2005). A hőmérséklet ingadozása és extrém változása szintén hatással van a beporzó fajok jelenlétére és életciklusára is, így a klímaváltozás lehetséges hatásainak megjósolása a rovar- és növényfenológia egyik fő mozgatórugójává vált (FORREST és THOMPSON 2011), de még nem rendelkezünk elegendő információval ahhoz, hogy megjósolhassuk ezeknek a hatásoknak a nagyságát és irányát. Mindemellett a globális klímaváltozás nyomán a talajban fellépő hőmérséklet, nedvesség, gázkoncentráció és talajszerkezet változása, valamint a talajbéli inváziós fajok nagy valószínűséggel jelentős hatást gyakorolnak az orchideák szimbióta mikorrhizáira is. Ez utóbbi hatás jelenleg még alig ismert.

2.4. A *Himantoglossum adriaticum* – adriai sallangvirág általános bemutatása

A *H. adriaticum* tölevélrózsás, ikergumós növény. Adriato-mediterrán, Magyarországon kollin-szubmontán faj (BÓDIS et al. 2011). Általában napos vagy félárnyékos, száraz, meszes talajú élőhelyen fordul elő. Előnyben részesíti a sovány gyepeket, cserjéseket, karsztbokorerdőket, erdők széleit vagy tisztásait. Legfeljebb 1600 méteres tengerszint feletti magasságon fordul elő (DELFORGE 2006). Gyakran jelenik meg másodlagos élőhelyeken is, mint például utak menti szegélyekben, szőlős-gyümölcsösökben vagy felhagyott bányák területén (DOSTALOVA et al. 2011, BÓDIS et al. 2019).

Magyarországon mindössze 5 területen: a Keszthelyi-hegységben, a Sümeg-Tapolcai-háton, a Bakonyban, a Kőszegi-hegységben és a Soproni-hegységben ismertek kisebb-nagyobb, viszonylag stabil állományai. Visszaszorulási mértéke a történelmi Magyarország területén 35%-os. A teljes hazai állomány ezres nagyságrendűre becsülhető, melyből évente mindössze 4-500 példány virágzik (BÓDIS et al. 2011). A faj magjainak átlagos életképessége 17,7%-os (GILIÁN et al. 2018). Mikorrhiza gombapartnerait tekintve PECORARO et al. (2013) a *Tulasnellaceae* család jelenlétét izolálták Olaszországban egy egyed gyökeréből. A faj protokormjaiból *Tulasnellaceae*, *Telephoraceae* család és a *Battarrea* nemzetség jelenlétét izoláltuk (GILIÁN et al. 2015). Egyéb publikált adat a fajjal együtt élő gombapartnerekre vonatkozóan nincsen. Élőhelyének talaj pH-ja BÓDIS et al. (2011) alapján pH 7,3-7,8 közötti. A Kőszegi-hegységben, az általunk mért talaj pH ezen az élőhelyen pH 7,8-8,0 közötti.

2.5. Az orchideafélék szaporodásbiológiája

Az orchideafélék megporzásbiológiája szorosan összefügg az evolúcióbiológia megjelenésével. Az ezzel kapcsolatos kutatások széleskörű alkalmazkodást bizonyítottak a pollinátor-orchidea közti kölcsönhatások során, amely a növényi evolúció általános megértésének kulcsfontosságú kérdéseire válaszokat adva, azt egyre világosabbá teszi számunkra (NILSSON 1992).

A családot a porzók és a bibeoszlop összeolvadása jellemzi, amelyet az orchideafélék esetében *gynostemium*nak, azaz ivaroszlopnak nevezünk. Ez gyakorlatilag egy biszexuálisan funkcionáló szerv, amely maximalizálja a pollen virágból ki- és virágba bejutását (NILSSON 1992) azzal, hogy egy-egy pollencsomag (pollínium) képződik mindkét portoküregből. A megporzás során a beporzó rovar a mézajakra száll, miközben testének egyik része érinti a bibeoszlopot, és a pollinárium a rovarnak erre a testrészére, általában a fejére, vagy a tor elülső részére tapad, amit majd a következő orchidea virágára rászállva, a ragacsos bibefelületre juttat. RÖTH (1982) könyvében összefoglalóan ír az *Orchidaceae* családnál előforduló megporzási típusokról. A megporzást leggyakrabban rovarok: 50%-ban hártványászárnyúak, majd 18%-ban lepkék, 12%-ban

kétszárnyúak végzik, valamint 15%-ban egyéb beporzók, és 3%-ban kolibrik segítségével történik a megtermékenyítés. A családra mindössze 2%-ban jellemző az önmegtermékenyülés. MOLNÁR V. és SRAMKÓ (2011) alapján a családon belül az autogám (önmegporzó) fajok száma 5-20%-ra tehető, a hazánkban előforduló fajoknak pedig közel egyharmadára jellemző a megtermékenyülés ezen formája. A *Cephalanthera damasonium* (Mill.) Druce faj esetében például gyakori az önmegporzás, de maga a faj nem obligát önmegporzó, tehát esetükben a rovarmegporzás az elsődleges, de ha az elmarad, képesek önmagukat is beporozni. Az *Epipactis microphylla* (Ehrh.) Sw. fajnál viszont obligát, kizárólagos önmegporzást is figyeltek meg, és sok esetben a virágok még ki sem nyílnak (kleisztogámia). Ugyanakkor ez a faj tipikus kölcsönös megporzású (allogám), sőt ezen belül nem csak idegen megporzású (xenogám), hanem hibridizálhat is (bastardogám) pl. az *Epipactis atrorubens*-szel és az *Epipactis helleborine*-vel.

Sikeres megporzás esetén az orchideák egy-egy tokszerű áltermésében (továbbiakban tokjában) átlagosan 1000-10000 mag fejlődik ki. Ezen magoknak viszont csak töredéke életképes. A különböző fajok magjainak életképessége igen tág határokon belül mozog. VAN WAES és DEBERGH (1986b) kísérleteiben 31 nyugat-európai orchideafaj életképességét vizsgálták különböző módszerekkel. A legsikeresebben alkalmazott módszer alapján a legrosszabb életképességet a *Limodorum abortivum* magjai adták $8\pm 7\%$ -kal, míg a legjobb életképességi értékkel az *Epipactis atrorubens* magjai rendelkeztek $64\pm 15\%$ -os értékkel.

Ha megfelelőek a körülmények, fajtól függően változó idő eltelte után az orchideamag megduzzad, felreped a maghéj és egy gömb vagy kúp alakú, merisztemoidekból fejlődő vegetatív szaporítást szolgáló sejtcsoport, az úgynevezett protokorm, „előtest” jön létre, és később ebből egy differenciált növény alakul ki (TILLYNÉ MÁNDY 2005). A teresztris orchidea fajok protokormjainak felületét rhizoidszőrök borítják, legtöbbször sűrűn, de előfordulhat gyengén szőrös és sima felületű is (RASMUSSEN 1995). A mikorrhiza kapcsolat ezeken a rhizoidszőrökön keresztül jöhet létre, majd maga a csírázás csak ekkor, a gomba által biztosított megfelelő szénhidrátforrás segítségével indul meg (R. ESZÉKI 2012). Ezek után a protokorm tetején először egy kis dudor formájában jelenik meg a hajtáskezdemény, majd az első levélprimordium, a gyökérfejlődés pedig csak mindezek után indul meg (ARDITTI 1967).

ARDITTI (1967) a 20. század orchideakutatásait összefoglaló cikkében megállapítja, hogy az *in vitro* mesterségesen szaporított, valamint a természetben csírázó orchideamagoncok között morfológiai szempontból nem figyelhető meg szignifikáns különbség. A protokormok jellege függ a faj élőhelyi tulajdonságaitól. A víz minden esetben nélkülözhetetlen eleme a csírázás megkezdésének. Azok az orchideafajok, amelyek vizes, nedves és fényben gazdag élőhelyeken élnek, a talaj felszínéhez közelebb és gyorsabban csíráznak, valamint csírázáskor azonnal képeznek zöld színtestet. Ezzel szemben a mélyen, a sötét talajban csírázó fajokból a csírázás

kezdetén a protokormokból még hiányzik a zöld színtest, és akkor indul meg a csírázásuk, amint lehetőségük nyílik a megfelelő mikorrhiza kapcsolatok kialakítására (R. ESZÉKI 2012).

2.6. A teresztris orchideák *in vitro* szaporítási lehetőségei

Az orchideák magjainak mesterséges csíráztatása iránti érdeklődés az 1800-as években indult meg. Az első csíráztatási kísérleteket olyan szerves anyagokon próbálták, mint a tőzegmoha (*Sphagnum*), fakéreg vagy avar, ám ezek többnyire sikertelennek bizonyultak (ARDITTI 1967). BERNARD (1899) és BURGEFF (1909) voltak az elsők az 1900-as évek elején, akik megfigyeléseik során rájöttek, hogy a gombáknak mekkora szerepük van az orchideák életében és magában a csírázás folyamatában a természetben, majd ennek tudatában megpróbálták az orchidea magokat táptalajon a természetben velük élő gombákkal együtt, szimbiotikusan csíráztatni. Bár a magok akkor nem sok sikerrel csíráztak, de az a következtetés levonhatóvá vált, hogy az orchidea magvak a megfelelő mikorrhiza gombapartner jelenlétében *in vitro* képesek csírázni (KNUudson 1922).

KNUudson (1922) Bernard kutatásai alapján sikeresen csíráztatott trópusi *Laelia* és *Cattleya* fajokat gombapartner jelenléte nélkül, szálepen, egy teresztris *Ophrys* faj gumójából nyert por alapú táptalajon. Őt megelőzően 1914-ben egy magyar kutatónőnek, Galambos Máriának is sikerült ugyanerre az eredményre jutnia, azonban mivel nem voltak a publikáláshoz megfelelő támogatói, így eredményei nem jutottak nyilvánosságra (TILLYNÉ MÁNDY 2005).

Bernard és Burgeff kezdeti kísérleteire alapozva Lewis Knudson folytatta az orchidea magok csíráztatási lehetőségeinek vizsgálatait. Különböféle tápoldatok használatával, melyeket 1%-os szacharózzal egészített ki, KNUudson (1922) több epifita orchidea nemzetség magját sikeresen csíráztatta aszimbiotikus módon. Ezen vizsgálatai alapján Knudson bemutatta, hogy az orchidea magok képesek *in vitro*, gombapartner nélkül csírázni. A későbbi kutatásai során Knudson kifejlesztett egy speciális oldatot (Knudson C közeg), amelyen sikeresen csíráztatta aszimbiotikusan azoknak az orchidea fajoknak a magjait, amelyeket a korai munkássága során nem sikerült csírázásra bírnia (KNUudson 1946). Az ő módszere és munkássága jelentős technológiai innováció volt, amelyet a modern biotechnológia előrevetítéseként is számontarthatunk.

Az orchideafélék három kategóriába sorolhatók a magok csíráztatásának tekintetében (ARDITTI és ERNST 1984). Ez alapján az első csoportba tartoznak azok a trópusi epifita és litofita fajok, amelyeket egyszerű csíráztatni aszimbiotikus körülmények között. Ilyenek a *Cattleya* (trópusi Amerika), a *Phalaenopsis*, *Dendrobium* és *Cymbidium* (Ázsia és Óceánia) nemzetség fajtái. A második csoportot a trópusi teresztris és litofita fajok, elsősorban a *Paphiopedilum* (Ázsia és Óceánia) nemzetség tagjai alkotják. Ezeket nehezebb aszimbiotikusan csíráztatni, és speciális

közeget igényelnek (ARDITTI 1982). A harmadik csoportba pedig a mérsékelt égövi, teresztris fajok tartoznak. Ezek az orchideák nem, vagy csak nagyon gyengén csíráznak aszimbiotikus körülmények között, és a természetben a velük szimbiózisban élő gombapartnerektől függenek (ARDITTI 1982).

A teresztris orchideák szimbiotikus csíráztatásához szükséges eljárást először BURGEFF (1936) írta le részletesen, amely során a gombát és az orchidea magot aszeptikus úton rakta egymás mellé. Az általa leírt eljárás lényege, hogy a steril csíráztató közeghez hozzáadják egy orchidea-gomba tiszta tenyészetét, a magoncok fejlődésének segítségével érdekében. A módszer komoly hátránya a nagy munkaigény, valamint a mindmáig gyakran megoldatlan probléma, hogy megtalálják a megfelelő gombatorzset és különösen a gomba optimális aktivitási fokát (FAST 1980). FAST (1980) részletezve publikálta a szimbiota gombák kitenyésztési és izolálási módszerét, melyhez fiatal, növekvő orchideagyökereket használt. A szimbiotikus magvetés lényege, hogy az orchideamagokat az izolált, mikorrhizának tartott gomba micéliumával együtt helyezik a táptalaj felszínére.

Ennek a módszernek azonban megannyi buktatója van. Nagyon fontos a gyökerek felületének megfelelő fertőtlenítése. Figyelembe kell venni, hogy még a felületi fertőtlenítés ellenére is, a gyökérből kitenyésző gombák többsége nem valószínű, hogy orchidea mikorrhizák, csupán a fertőtlenítés ellenére is életben maradt, a gyökerek felületén megtapadt talajlakó gombák vagy a gyökérben élő, de egyelőre még az adott orchidea fajjal ismeretlen viszonyban álló egyéb gombafajok. Minden esetben, a gyökérből kitenyészett gombataxonokat tesztelni kell, figyelembe kell venni a fajspecifikusságot és a gombák virulenciáját is. Ha egy túl agresszív gombatorzset oltunk az orchideamagok vagy -magoncok mellé, az a fejlődés elősegítése helyett könnyen és gyorsan elpusztíthatja azokat (TILLYNÉ MÁNDY 2005). Ezért FAST (1980) a két módszer ötvözését ajánlja, melynek során maga a magvetés aszimbiotikusan történik, majd az így kifejlődött magoncokat a differenciálódás után vagy a kiültetés előtt kell a megfelelő, kitenyészett gombával megfertőzni. Ha mégis a magok és a gombák együttes táptalajra vetésével próbálkozunk meg, ehhez specifikus, poliszacharidokat tartalmazó táptalajokat - mint például zabagar vagy keményítőagar - ajánlatos használni, mivel a gomba ezeket lassan bontja le, miközben az orchideák számára fontos monoszacharidokat szabadít fel (TILLYNÉ MÁNDY 2005). CLEMENTS et al. (1986) zabagart használt több európai mérsékelt égövi talajlakó orchideafaj szimbiotikus csíráztatásához. Módszerével 32 teresztris orchideafajból 23 fajnál indult meg a csírázás, melyből 14 faj esetében a protokormok sikeresen csíranövényekké fejlődtek.

Ebből is látható, hogy a teresztris fajok szimbiotikus csíráztatása meglehetősen nehéz, és több sikertelenséggel jár, mint pozitív eredménnyel. Emiatt még mindig inkább az aszimbiotikus

csíráztatási módszerekkel kísérleteznek a mérsékelt égövi talajlakó fajok esetében, és egyre újabb, összetettebb és komplexebb táptalajokat, magkezelési eljárásokat alkalmaznak.

Ezek alapján elmondható, hogy az orchideafélék mesterséges csíráztatása még mind a mai napig csak részben sikeres. Mindemellett fontos megemlíteni, hogy azok a módszerek, amelyek megfelelőek az egyik faj csíráztatásához, nem feltétlenül alkalmazhatók egy másik faj esetében, valamint megfigyelhetők különbségek ugyanannak az eljárásnak a sikerességében is egy adott faj két különböző területről származó magjainak csírázása során is (ARDITTI 1982). A teresztris orchideák *ex situ*, *in vitro* csíráztatásához rendelkezésre álló információk többnyire empirikusak, és meglehetősen keveset tudunk az optimális körülményekről mind a csírázás, mind a csíranövények fejlődése esetében.

Ami bizonyos, az az, hogy az orchideák aszimbiotikus csíráztatása során minden faj esetében figyelni kell a magok gyűjtési idejére, a magok állapotára és tárolására, a megfelelő táptalaj kiválasztására és elkészítésére, a magvetés során a magokon alkalmazott előkezelésre, majd a magvetés után a csírázáshoz, valamint sikeres csírázás esetében a csíranövény fejlődéséhez szükséges körülmények biztosítására. Az irodalomban minden egyes, az imént felsorolt lépésre többféle módszer, eljárás, útmutatás lelhető fel.

2.6.1. Maggyűjtés és a magok tárolása

Maggyűjtés során a legfontosabb szempont az, hogy a magok olyan populációból származzanak, ahonnan eltávolításuk a lehető legkisebb kárt, zavart okozza a természetes élőhelyben és a faj fennmaradásában. Figyelembe kell venni azt is, hogy a későbbi visszaültetés során milyen szempontok az elsődlegesek, a populáció tisztaságát szeretnénk-e fenntartani, vagy a genetikai variabilitás növelése a cél. Ezek alapján kell megválasztanunk a mesterségesen csíráztatandó faj magjainak származási helyét. Általánosan elfogadott szabály, hogy – ha azt a gyűjtési engedélyben véletlenül nem szabályoznák, akkor sem szabad a teljes magtermelés 10%-nál több magot begyűjteni, azaz a tokoknak maximum 10%-a gyűjthető be.

Egyes kísérletek során a *Paphiopedilum* és a *Cypripedium* nemzetség fajai esetében jobb mesterséges csírázási eredményeket értek el még zöld, félérett tokokból származó magokkal (LIGHT 1989; DE PAUW és REMPHREY 1993, WAGNER és HANSEL 1994; LEE et al. 2005). LIGHT (1989) úgy tapasztalta, hogy a *C. calceolus* var. *pubescens* esetében az ideális időpont a maggyűjtésre a megporzás utáni 47. nap. Több *Cypripedium* fajt vizsgálva DE PAUW és REMPHREY (1993) alapján a legjobb csírázási eredményeket ennek a nemzetségnek a fajjaival a megporzás utáni 8. héten gyűjtött magok elvetésével lehet elérni, viszont kísérleteik során a megporzás utáni 8. héttől kezdve szedett magok esetében a csírázás erőteljesen lecsökkent A *Cypripedium calceolus* esetében (házánktól eltérő környezeti viszonyok között) WAGNER és HANSEL (1994) 40 nappal, míg LEE et al. (2005) a *C. formosanum* esetében Taiwanon, 2100 m

tengerszint feletti magasságról, 90 nappal a megporzás után begyűjtött magokkal érték el a legmagasabb csírázási arányt.

VASUDEVAN és VAN STADEN (2010) publikációjában egy trópusi faj, a *Dendrobium nobile* csírázási arányát figyelte meg 96, 116, 129 és 158 nappal a megporzás után leszedett magokon, három különböző táptalajon. Vizsgálataik alapján a 96 és 116 nappal a megporzás után leszedett magok döntő többsége a protokorm kialakulását követően megállt a fejlődésben. A 129 és 158 nappal a megporzás után leszedett magok közül szignifikánsan több jutott el az 1 leveles csíranövény állapotig (5. stádiumig). Az első levelek megnövekedéséig és a második levél megjelenéséig (6. stádium) a legmagasabb arányban a 129 nappal a megporzás után leszedett magok jutottak el.

2.6.2. A magok előkezelése

Ha a magvetéshez még nem teljesen érett, de termékeny magot használunk, tehát ha az áltermés még nem repedt fel, akkor a benne található magok sterilnek tekinthetők, azaz a még ép, zárt tok áltermések fertőtlenítése után a magok külön fertőtlenítése nélkül, steril boxban, steril táptalajra elvethetők (RICHTER 1982). A magtok sterilizálása történhet úgy, hogy a steril boxban a tokot először belemártjuk 90%-os alkoholba, majd láng felett röviden áthúzza leégetjük annak felszínét. Ezzel a módszerrel azoknak a gombaspóráknak és baktériumoknak a jó része elpusztul, amelyek a tok felületén voltak megtalálhatók, a magvak viszont nem károsodnak (R. ESZÉKI 1996).

Akkor azonban, ha már található repedések az érett termésen, vagy azok a borda mentén már fel is nyíltak, mindenképpen szükség lesz valamilyen előkezelésre a magok sterilizálásának érdekében, hiszen azok már megfertőződhetnek a levegőben terjedő spórákkal (FAST 1980).

A magok előkezelése nem csak a sterilitás elérése miatt rendkívül fontos, hanem a külső magburok megsértése, megrepesztése érdekében is, amely hatására feltételezhető, hogy a mag könnyebben lesz képes a víz felvételére, ezzel pedig elősegíthető a csírázás. Az azonban nem igazolt, hogy a magköpeny fizikailag gátolná a csírázást, és az is előfordulhat, hogy tartalmaz olyan speciális anyagokat, amelyek a megsérült magköpenyű embrióra kevésbé tudnak hatni (MIYOSHI és MII 1988).

A már megrepedt vagy felnyílt tokok fertőtlenítésére leggyakrabban klórmeszes ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$) oldat használatos előkezelés gyanánt (VAN WAES és DEBERGH 1986a, VUJANOVIC et al. 2000, LEE 2007, CHEN et al. 2015). R. ESZÉKI (2012) disszertációjában az orchideamagok sterilizálásához 10 g klórmész feloldását 90 ml desztillált vízben, majd 30 perces állást követően a szűrlethez néhány csepp Tween 20-at (polioxietilén(20)-szorbitán-laurát) adva, azzal a magvak 8-10 perces előkezelését javasolja.

A klórmész oldaton kívül egyéb megoldások is használatosak a magok fertőtlenítésére. FAST (1980) alapján a nátrium-hipoklorit (NaOCl) oldat használata a képződő klórgáz csíraölő hatása miatt alkalmas. FAST (1980) emellett a hidrogénperoxidot (H₂O₂) is megfelelőnek tartja a magok fertőtlenítésére, de annak fertőtlenítő hatása a vizsgálatai alapján valamivel gyengébb.

2.6.3. Az *in vitro*, aszimbiotikus magvetéshez használt táptalaj

Ahogy arra már a 20. század közepén WITHNER (1959) is rámutatott, számtalan táptalaj megfelelő arra, hogy különféle orchidea magokat *in vitro* csíráztassunk és fenntartsunk. Ennek oka az lehet, hogy a magok és a csíranövények csak a töredékét hasznosítják a táptalaj összetevőinek (RASMUSSEN 1995). A tápközegnek mindössze a növények számára létszükséges anyagokat kell tartalmaznia valamilyen formában, amelyek a következők: szervetlen sók, vitaminok, szénforrás, hormonok. Az ezeken kívüli anyagoknak (például szerves savak, aminosavak vagy komplex vegyületek) csak bizonyos faj esetén vagy fejlődési stádium során van jelentőségük.

Sorra véve a nélkülözhetetlen elemeket, a táptalaj szervetlen alkotórészei a makroelemek (mennyiségük 0,002–40 mg/l) (N, Mg, K, Ca, P, S) és mikroelemek (mennyiségük 15–2000 mg/l) (Mn, Cu, Zn, Mo, B, Cl). A nitrogén NO₃⁻ vagy NH₄⁺, illetve a két ionforma kombinációjaként van jelen. A MgSO₄ a magnézium- és a kénigényt egyaránt kielégíti. A foszfort Na- vagy KH₂PO₄, a káliumot Cl⁻, NO₃⁻ vagy H₂PO₄⁻, a kalciumot pedig Cl⁻ vagy NO₃⁻ formájában lehet hozzáadni a táptalajhoz (GEORGE és SCHERRINGTON 1984, THOMPSON 1977). A ma orchidea vetéshez használt táptalajok nagyrésze tapasztalati úton lett kifejlesztve Knop vagy Pfeffer ásványi sókat tartalmazó oldatából. Egyre inkább úgy tűnik, hogy az orchidea kutatók olyan táptalajokkal kísérleteznek, amelyekben az ásványisó tartalmat egyre csökkentik, míg az organikus komponensek mértékét növelik. Ezzel próbálják meg a természetes körülmények közötti gombapartner által feltételezetten átadott anyagokat szimulálni (RASMUSSEN 1995). Ez azonban egyáltalán nem egyszerű, és mint ahogyan arra HAYES (1969) már 50 éve rámutatott, nincsen olyan faktor, amely speciálisan egyedül felelős lenne a csírázásért egy mikorrhiza kapcsolatban. Éppen ezért a mesterséges körülmények közötti szaporítás esetén szükség van arra, hogy a táptalaj egyszerre tartalmazza mindazon elemeket, amelyek a csírázás megkezdéséhez, és azokat is, amelyek a csíranövény fejlődéséhez szükségesek. Az is bizonyított, hogy minél komplexebb a táptalaj, annál valószínűbb az elvetett orchidea magok csírázása, mivel az egyes magok, még ha egy populáción belülről is származnak, különböző igényekkel rendelkezhetnek (RASMUSSEN 1995).

Egyes teresztris orchideafajok esetében nélkülözhetetlen komponensei a táptalajnak a szénforrások (=szénhidrátok). Azonban vannak olyan talajlakó fajok, amelyek egyszerű tiszta vízben is képesek kicsírázni. Sima vízben jól csírázik például a *Goodyera pubescens* (HARVAIS 1974) vagy a *Dactylorhiza spp.* fajok (DOWNIE 1941, VERMELEUEN 1947). Gyengén, de

csírázóképesek a *Dactylorhiza viridis* (DOWNIE 1941), a *Gymnadenia conopsea* (DOWNIE 1941) és a *Platanthera obtusata* (HARVAIS 1974) fajok. Ezzel szemben, tiszta vízben bármilyen segédanyag nélkül nem sikerült csíráztatni a *Cypripedium reginae* (HARVAIS 1973, 1982), a *Corallorhiza trifida* (DOWNIE 1949a), a *Neottia ovata* (DOWNIE 1941, 1949b) és a *Platanthera bifolia* (DOWNIE 1941) fajokat.

A cukrok közül a leggyakrabban használt szénhidrátforrás a szacharóz vagy a glükóz (RASMUSSEN 1995). A szénhidrátoknak egyrészt táplálékforrásként, másrészt mint az ozmózis szabályozói van fontos szerepük mind a táptalajban, mind a növényben (BROWN et al. 1979).

A legtöbb orchidea élőhelyének talaja szervesetlen nitrogénvegyületekben rendkívül szegény (FAST 1985). Mind a természetes közegben, mind a mesterséges táptalajokban a nitrogén vagy oxidált formában (NO_3^-) vagy redukált formában, mint pl szervesetlen ammóniumsóként (NH_4^+) vagy szerves vegyületekként fordul elő (RASMUSSEN 1995). Több európai orchideafaj esetében úgy találták, hogy a csírázási arány igazából akkor lett a legmagasabb, amikor nem volt makroelem a táptalajban, és azt is kimutatták, hogy néhány faj esetében a szervesetlen nitrogén teljesen meggátolta a magok csírázását (VAN WAES 1984, VAN WAES és DEBERGH. 1986b). EIBERG (1970) diplomadolgozatában az *Orchis santca* faj csíráztatási kísérletei során arra az eredményre jutott, hogy az NH_4NO_3 mennyiségét csökkentve, a faj csírázási aránya nőtt, sőt mi több, a legmagasabb csírázást (66%) annak teljes hiányában érte el. Ezek alapján kijelenthető, hogy a különböző orchideafajok által preferált nitrogénforrás eltérő lehet (KISHI és TAKAGI 1997).

Az aszimbiotikus és a szimbiotikus csíráztatáshoz használt táptalajok is különböznek egymástól, főként abban, hogy mennyi szén és nitrogént tartalmaznak. A szén és a nitrogén táptalajban felvehető mennyisége nagymértékben befolyásolja a szimbiotikus csírázás és a csíranövények növekedésének eredményességét, ugyanis, ha a táptalajban a szén és a nitrogén a gomba számára könnyen felvehető formában van jelen, akkor a gomba parazitálni fogja a növényt (BEYRLER et al. 1991).

A további ionok, növekedésszabályozó anyagok, vitaminok és egyéb táptalaj kiegészítők használatáról is bőven lehet szakirodalmat találni a témában. LUCKE (1976) például kókusztejet is használt a *Himantoglossum hircinum* aszimbiotikus csíráztatásához készített táptalajba, mellyel elérte, hogy az elvetett magok már 4 hónap után csírázásnak indultak.

A kókusztej mellett, az orchideák aszimbiotikus csíráztatása esetén, számos szakirodalmi hivatkozás található a kókuszvíz, mint táptalajhoz adott kiegészítő komponens pozitív, növekedésserkentést igazoló hatásáról is. A kókuszvíz a zöld kókuszdió (*Cocos nucifera*) színtelen, folyékony endospermiuma, amely aminosavakat, szerves savakat, nukleinsavakat, számos vitamint, cukrot és cukor-alkoholt, növényi hormonokat (auxinok, citokininek), ásványi anyagokat és más, még meg nem határozott alkotórészeket tartalmaz (MOLNÁR et al. 2011).

PYATI et al. (2002) azt tapasztalta, hogy a tápközeghez adott kókuszvíz a benne található növekedési faktoroknak köszönhetően hatékonyan segítette a sejtek és szövetek fejlődését a veszélyeztetett *Dendrobium macrostachyum* esetében.

Azonban a kókuszvíz táptalajhoz adott mértéke is kulcsfontosságú: BAQUE et al. (2011) kísérleteiben 10, 30 és 50 ml/l kókuszvíz adagolása segítette a *Calanthe* hibrid csíranövények növekedését Hyponex táptalajon úgy, hogy minél több kókuszvizet adtak a táptalajhoz, annál inkább megnövekedett a csíranövények hajtáshossza, a relatív nedves- és száraztömege, a levélszélessége, a gyökereinek száma és a levélfelület-mérete is. Ezzel szemben, a magasabb, 100ml/l kókuszvíz táptalajhoz adása már látványosan csökkentette e csíranövények növekedését és fejlődését, sőt növekedési rendellenességeket is kiváltott náluk.

PARISA et al. (2014) kísérleteik során a pepton és a kókuszvíz hatását vizsgálták *Phalaenopsis* hibridre különböző táptalajokon, majd arra az eredményre jutottak, hogy a csírázás a kókuszvíz jelenlétében összességében jobb volt, mint a kontroll esetében. A csírázás mértéke nőtt módosított Fast, módosított Knudson C és módosított Vacin and Went táptalajokon, míg módosított Murashige and Skoog (MS) és módosított ½ MS táptalajok esetében a csírázási arány növekedése nem volt kiugró. Módosított Fast táptalaj esetében a 15 ml/l kókuszvíz és a 2 g/l pepton együttes alkalmazása adta a legjobb csírázási arányt (74,5%) az általuk vizsgált *Phalaenopsis* hibrid esetében.

Az ezüst-nitrát oldat táptalajban való alkalmazása sem mai keletű, mivel az Ag^+ ionok csökkentik a sejtek etilénkötő receptorainak etilén megkötő kapacitását, ezáltal a hormon hatásának kialakulását (GIRIDHAR et al. 2001). Az etilén növényi hormon: a növényekben gátolja a megnyúlásos növekedést, fokozza a gibberellin hatását, serkenti az öregedést és termésérést és az ivari jelleget a nőivarúság felé tolja el.

Orchideák vonatkozásában BEYER (1976) már az 1976-os publikációjában említi, hogy az etilén az orchideákban is öregedési folyamatokat indukál, ám ezt a hatást az etilén-antagonista Ag^+ ionokkal gátolni lehet.

STEINITZ et al. (2010) azt tapasztalta, hogy a növények regenerálódása *in vitro* gyakran javítható, ha ezüst ionokat, például ezüst-nitrátot vagy ezüst-tioszulfátot adunk a tápközegükhöz. Az ezüst-nitrát alkalmazása több tanulmányban is hasznosnak bizonyult a hajtásnövekedés és a gyökérfejlődés szempontjából a növényi szövettenyésztés során (CHI és PUA 1989).

GIRIDHAR et al. (2001) a *Vanilla planifolia* esetében a 20 μ M mennyiségű $AgNO_3$ -ot találták az optimális koncentrációnak, amely a hajtás maximális növekedését eredményezte, és a gyökeresedést is indukálta.

R. ESZÉKI (2005, 2012) alapján elmondható, hogy Magyarországon az ezzel foglalkozó kutatók a mérsékelt égövi talajlakó orchideafajok esetében a legnagyobb csírázási sikereket a Fast táptalaj módosított változataival érték el.

A fentieket összegezve jól látszik, hogy az orchideák annyira különbözőek egymástól tápanyagigényeikben is, hogy még mind a mai napig nem sikerült olyan általános orchidea csíráztató közeget kifejleszteni, amely mindegyikük számára a legjobb lenne. Ez a legfajgazdagabb növénycsalád, év tízmilliók alatt rendkívül változatos élőhelyekhez adaptálódott kb. 26 000 fajának esetében természetesen lehetetlen is. Ezért szükséges az orchideakutatóknak inkább fajspecifikus optimális táptalajok elkészítésével kísérletezni, amelyet dolgozatomban egyik fő céljaként is tűztem ki.

2.6.4. Az *in vitro*, szimbiotikus magvetéshez használható táptalajok

Mint ahogy azt már a korábbi alfejezetek is tárgyalták, a szimbiotikus magvetés során alkalmazott táptalaj legfontosabb tulajdonsága, hogy poliszacharidokat kell tartalmaznia, amelyet a gombák lassan tudnak lebontani, így biztosítva az orchidea számára a nélkülözhetetlen monoszacharidokat (TILLYNÉ MÁNDY 2005). A leggyakrabban használt táptalaj a H1 zabagar, amely 1 liter táptalajban 200 mg kalcium-nitrátot, 100 mg kálium-nitrátot, 200 mg kálium-foszfátot, 100 mg magnézium-szulfátot, 100 mg élesztő kivonatot, 2 g szacharózt, 3 g finomra őrölt zabot és 12 g agart tartalmaz. CLEMETS et al. (1986) annyiban módosította a H1 zabagart, hogy 3,5 g zabot és 10 g agart használt. A zabagarnak egyéb módosításai is léteznek, a H2 zabagar szacharóz helyett 2 g glükózt, a H4 zabagar pedig a kalcium-nitrát helyett 72 mg ammónium-nitrátot tartalmaz (RASMUSSEN 1995).

2.7. Az orchidea típusú mikorrhiza, és izolálási módszerei

Az orchideáknak igen apró (0,3–14 µg tömegű), porszerű magjaik vannak. Az embrió, amelyből később az új egyed létrejön, differenciálatlan és a kezdeti fejlődéséhez szükséges tartalék tápanyag nincsen körülötte (BURGEFF 1936). Ezért van szükség a mikorrhiza gombákkal való kapcsolat kialakítására, amely a csírázáshoz és a csíranövény korai fejlődési szakaszához szükséges tápanyagokat biztosítani tudja (RASMUSSEN és WHIGHAM 2002).

Amikor az orchidea mag a talajba kerül és elkezd onnan vizet felvenni, az embrióból néhány osztódás után egy differenciálatlan, kezdetleges csíranövény, az úgynevezett protokorm alakul ki. Ez egy gömbszerű képlet, amely kissé nagyobb a magnál, felületén szőröket növeszt, majd a növekedése leáll. A további fejlődés akkor indul meg, ha a megfelelő gombapartnerrel kapcsolatot alakít ki (RASMUSSEN 1995).

A természetben tehát az orchidea magok csírázása a mikorrhiza gombákkal összekapcsolt folyamat. A csírázásához kompatibilis, szimbióta gombák szükségesek, amelyek szabadon élő

szaprofiták vagy ektomikorhizás gombák, amelyek a *Basidiomycota* vagy az *Ascomycota* törzshöz tartoznak. A szimbiózisok, mint kulcsfontosságú kölcsönhatások, mindenütt jelen vannak és részt vesznek az ökológiai közösségek felépítésében (MCCORMICK et al. 2018). Megannyi kutatás készült és van jelenleg is folyamatban, amely alapján rájöttünk, hogy a mikorrhiza kapcsolat olyan változatos növény- és populációs tulajdonságokat képes befolyásolni, mint például a virágzás ideje (WAGNER et al. 2014; PANKE-BUISSE et al. 2015), a kórokozókkal és növényevőkkel szembeni rezisztencia (ROGER et al. 2013, MINTON et al. 2016), a nem őshonos (MENZEL et al. 2017) és az őshonos fajok eloszlása (MCCORMICK et al. 2018), valamint a tápanyagszegény szubsztrátumokon való megélés képessége (DENISON és KIERS 2011).

Az orchideák filogenetikai és ökológiai szempontból igen sokféle gombával alakítanak ki mikorrhizális kapcsolatot. DEARNALEY et al. (2012) kutatásai alapján a leggyakrabban előforduló gombanemzetségeknek, amelyek orchideákkal mikorrhizás kapcsolatot alakítanak ki, a *Tulasnella*, a *Ceratobasidium* és a *Serendipita* nemzetségeket találták, amelyek egyaránt tartalmaznak szaprotróf, ektomikorhiza és gyökér endofita fajokat, valamint néhány parazita és növényi kórokozó fajt egyaránt. Egyes orchidea fajok egyéb ektomikorhiza bazídiomos gombákkal, tömlősgombákkal (BIDARTONDO et al. 2004, SELOSSE et al. 2004, DEARNALEY 2007), fabontó gombafajokkal (KINOSHITA et al. 2016) és egyéb szaprotróf bazídiomos gombákkal (OGURA-TSUJITA és YUKAWA 2008; MARTOS et al. 2009; KOTTKE et al. 2010; LEE et al. 2015) képesek társulást alkotni. A mikorrhiza kapcsolat során létrejövő kölcsönhatások különösen kritikusak lehetnek azokban a növényfajokban, amelyek részben (ROY et al. 2013), vagy teljesen mikoheterotrófok (HYNSON et al. 2016). Minden orchideafaj legalább kezdetben mikoheterotróf (LEAKE 1994; RASMUSSEN 2002), a protokorm stádiumban teljes mértékben a mikorrhiza gombáktól függenek, majd a csíranövény stádiumban és a fejlődésük további szakaszában már különböző mértékben lépnek kölcsönhatásba a gombapartnereikkel (WHIGHAM et al. 2008; SELOSSE és MARTOS 2014, STÖCKEL et al. 2014). Mindezek alapján feltételezhető, hogy az orchideák rendkívül egyedülálló tulajdonságai és az igen változatos megjelenésük a mikorrhiza gombákkal való kapcsolatuknak is tulajdoníthatók (SMITH és READ 2008).

Ma úgy gondoljuk, hogy a mikorrhizák legfontosabb szerepe a növény tápanyagellátásában rejlik. Több kutatás során is bebizonyosodott, hogy a foszfátokon és egyéb ásványianyagokon kívül a gomba szén, vitamin és egyéb növekedést segítő tényezők forrásaként is szolgál az orchidea számára (PURVES és HADLEY 1975; HADLEY és ONG 1978; HADLEY 1982, 1984).

A mikorrhiza gomba a csíranövény szövetei között áthatolva bejut a sejt belsejébe, miközben maga előtt tolja a növényi sejt plazmamembránját. A szimbionta gombafajok hifái az orchideamagokat vagy a szuszpenzoron (PETERSON és CURRAH 1990; RICHARDSON et al.

1992; RASMUSSEN és RASMUSSEN 2009), vagy az epidermális szőrökön (WILLIAMSON és HADLEY 1970) keresztül hatolják át, így a gombafonal a külső sejtfalon belülré kerül, majd többszörösen elágazik és feltekeredik, ezzel képezve a sűrű micéliumtekercseket, az úgynevezett pelotonokat (ILLYÉS 2011). A gomba lokálisan lebontva töri át a sejtfalat, és kissé elvékonyodva halad át rajta (PETERSON és CURRAH 1990).

A kölcsönös és együttműködő szimbiotikus kapcsolatokkal, mint például az arbuszkuláris mikorrhizális szimbiózissal szemben az orchidea-mikorrhiza kapcsolatok általában instabilak (MCCORMICK et al. 2018). A szimbiotikus gombák potenciálisan kórokozó parazitákká válhatnak, vagy nem képesek kolonizálni a protokormokat, ha a hőmérséklet vagy a tápanyagösszetétel nem megfelelő számukra a szimbiózishoz (HARVAIS és HADLEY 1967; BEYRLE et al. 1995). A gombákkal való szimbiotikus kapcsolat tehát magában hordozza a kockázatát, hogy az akár súlyos károkat is okozhat az orchideanövényben (HADLEY 1970; BLAKEMAN et al. 1976).

Széles körű feltételezés, hogy a felnőtt stádiumú egyedek esetében a fotoszintézis csökkent az orchideák „gombafüggése” miatt (SMITH és READ 2008). Azonban, a fotoszintézisből származó szén-dioxid nyereség valószínűleg minimális mértékű a mélyen árnyékolt trópusi erdőkben élő, fotoszintetizáló orchideák többségében (BIDARTONDO et al. 2004). Ezért nagyon valószínű, hogy a gombák részt vesznek az ásványi tápanyagok felvételében a több éves, kifejlett egyedek esetében is, de ezt még egyértelműen nem bizonyították, és a gomba-orchidea fiziológiai egymásra hatásáról is alig van információnk, így erre vonatkozó modelljeink is gyerekcipőben járnak (SMITH és READ 2008).

Az orchideák mikorrhiza partnerei általában fejlett növény gyökeréből vagy csíranövényből izolálhatók különböző módszerekkel. Gumóból való mikorrhiza izolálás még nem járt sikerrel (RASMUSSEN 1995), és jelenleg sem találhatók még ezzel kapcsolatos publikált eredmények. Kifejlett orchidea egyed esetében a mikorrhiza gomba legvalószínűbb előfordulási helye a gyökércsúcs közelében található epidermális szőrök alatti gyökérrészben található (BERNARD 1909).

Gyökérből két fő módszerrel is kinyerhetők a gombapartnerek. Mindkettő esetében az első lépés a gyökerek felületének megtisztítása, az ott levő talajrészecskék és egyéb felületi gombák, baktériumok eltávolítása. A felületi sterilizálásához leggyakrabban használt szerek a hidrogén-peroxid (ALEXANDER és HADLEY 1983), nátrium- vagy kalcium-hipokloritos oldat (HARVAIS 1974), higany-klorid (BURGEFF 1936) vagy etanol (NIEUWDORP 1972). Ezt követően a megfelelő lemosás után a gyökérszegmens táptalajra helyezhető. Kitenyésztéshez is többféle táptalaj használható, leggyakrabban a PDA táptalaj használatos. Ez egy gyors módszer a gombák kinyerésére, de számos hátránya van. Egyrészt, vannak olyan fajok, amelyeket igen

nehéz izolálni vagy életben tartani agaros közegben. Ilyen például a *Thanatephorus pennatus* (CURRAH et al. 1997). Másrészt, nem lehetünk biztosak abban, hogy a kitenyészett gombák valóban a gyökérben élő pelotonokból származnak, vagy esetleg csak a gyökérben élnek, de nem alakítanak ki szimbiózist a növényvel, esetleg parazitálják azokat, de az is lehetséges, hogy bár a felületi sterilizálás nagymértékben eltávolítja a felületen található egyéb gombákat, nem zárható ki, hogy ezek közül a valójában csak talajgombák közül tenyészik ki a táptalajunkon egy. Harmadsorban pedig, mivel az olyan basidiomycoták, mint az *Epulorhiza spp.* vagy a potenciális mikorrhizák, mint például az *Acremonium spp.* és *Oidiodendron spp.* annyira lassú növekedésűek, hogy az egyéb gyökérből kitenyésző gombák elnyomják azokat (CURRAH et al. 1997).

A másik izolálási eljárás kifejezetten a kortikális pelotonokat képző gombák kinyerésére irányul. Ennek során a gyökér felületi sterilizálása után, egy steril szikével egy kis mennyiségű gyökérfelület eltávolítása szükséges, amelyre aztán egy csepp steril vizet cseppentve, a pelotonok felszabadulnak a sejtekből. A pelotonokat kiemelve, többszöri steril vizes öblítés után Petri-csészébe, agarra helyezve várható a gomba kitenyészése (CURRAH et al. 1997, ILLYÉS 2011). Ennek a módszernek is több hátránya van. Egyrészt, a kinyerhető pelotonok korlátozva vannak méretük szerint, mivel csak a mikroszkóp alatt, általunk látható méretű pelotonokat tudjuk kiemelni. Másrészt pedig a nagyon vékony hifával rendelkező endofita gombák kiemelésénél azok megsértésével, a táptalajra helyezve már nem lesznek életképesek, és nem lesznek kitenyészthetők (CURRAH et al. 1997).

Az előző két módszer hátrányait küszöböli ki a DNS kinyerés és a molekuláris genetikai azonosítás különböző ITS régiók segítségével. A molekuláris módszerek nemcsak abban segítenek, hogy a klasszikus technikával (alaktani meghatározás, szelektív tápközeg) nehezen elkülöníthető vagy nem meghatározható fajok meghatározásra kerülhetnek (FRANCO-DUARTE et al. 2019), hanem sokkal specifikusabb és gyorsabb eredményeket is kaphatunk ezzel az eljárással (GARIBYAN és AVASHIA 2013). Az eljárás hátránya viszont, hogy ezzel a módszerrel csak azonosítani lehet, további kísérletekhez használható tenyészetet létrehozni azonban nem.

A fajok azonosítására a ma legelterjedtebb módszer a PCR, azaz a polimeráz lánreakció (GARIBYAN és AVASHIA 2013). A PCR lényege, hogy egy fajspecifikus DNS szakaszt nagy mennyiségben fel lehet szaporítani a megfelelő körülmények és indítószekvenciák segítségével. A fajok a megfelelő DNS szakasz kiválasztásával így azonosíthatóvá válnak. Ehhez a leggyakrabban a riboszómák RNS komponenseit is kódoló régió gének közti DNS szakasz használható, amelyet ITS (Internal Transcribed Spacer) szakasznak neveznek (ILLYÉS 2011).

Gombák esetén általánosan használják ezeket a sejtmagi riboszomális géneket elválasztó átíródo régiót. Ez a 18 S és 5,8 S riboszomális gének között található ITS1, és az 5,8 S és 28 S riboszomális gének között található ITS2 szakaszokat foglalja magába. Az egész régiót szokás

vizsgálni, melyben nagyon variábilis rész is (ITS1 és ITS2), illetve konzervált rész is (5,8 S és a 18 S és 28 S riboszomális szakaszok részletei) található (BENGTSSON-PALME et al. 2013).

A DNS felszaporítása után a gélelektroforézis (amely a PCR termék megjelenítésének és elemzésének legegyszerűbb módszere) és a PCR-termékek tisztítása, szekvenálása következik. A kapott DNS-szekvenciákat különböző programok segítségével ellenőrizhetjük, majd az ellenőrzött szekvenciákhoz hasonló, már leközölt adatokat nemzetközi adatbázisokban kereshetjük (ILLYÉS 2011).

Ennek a módszernek a segítségével a korábban nem ismert, vagy táptalajon nem kinyerhető gombapartnereket is sikerült azonosítani (DEARNALEY 2007).

Bár a PCR-nek rengeteg előnye van, azonban korlátokkal is rendelkezik. Mivel az eljárás nagyon érzékeny, így a minta bármilyen formájú, akár egy minimális mennyiségű DNS-sel való szennyeződése is félrevezető eredményeket hozhat. Továbbá, új primerek megtervezéséhez szükség van néhány korábbi szekvencia-adatra. Ezért a PCR csak már ismert patogén vagy gén jelenlétének, vagy hiányának azonosítására használható. Egy másik korlátja az eljárásnak pedig az, hogy a PCR-hez használt primerek képesek nem specifikusan olyan szekvenciákhoz is kapcsolódni, amelyek hasonlóak, de nem teljesen azonosak a cél-DNS-sel. Ezenkívül a DNS-polimeráz által nem megfelelő nukleotidok is beépülhetnek a PCR-szekvenciába, bár ilyen igen alacsony arányban fordul elő (GARIBYAN és AVASHIA 2013).

Orchidea protokormból pedig ugyanezekkel a módszerekkel nyerhetők ki a gombapartnerek.

2.8. Orchidea mikorrhiza gombacsoportok

2.8.1. *Rhizoctonia*-forma nemzetség

Az orchideák és a *Rhizoctonia spp.* fajok közötti kapcsolatnak már igen korán létre kellett jönnie az *Orchidaceae* család fejlődése során, mivel az orchideák mindhárom fő csoportja mikorrhiza gombákkal él együtt (SNEH et al. 1991). Az orchideák és a *Rhizoctonia* fajok közti kapcsolat létfontosságú a magok csírázásához és a csíranövény kezdeti egyedfejlődése során (WARCUP 1973).

Vannak olyan esetek, amikor az orchideákból izolált *Rhizoctonia* fajokat más növények gyökereiben patogénként (WARCUP 1985; ZELMER et al. 1996), vagy a VAM (vezikuláris mikorrhiza) gombák parazitáiként azonosítottak (WILLIAMS 1985). Azonban a legtöbb orchidea olyan *Rhizoctonia* törzsekkel van specifikus kapcsolatban, amelyekről eddig nem ismert, hogy más növények kórokozói lennének (WARCUP 1981; RAMSAY et al. 1987; MUIR 1989; CURRAH et al. 1997; SEN et al. 1999).

A *Rhizoctonia* forma-nemzetség egy anamorfi, ivaros szaporító képletek nélküli csoport, amely kizárólag a gombahifa alaktani bélyegeire épül (WARCUP 1981). Azonban egyes

izolátumoknál ivaros, teleomorf gombákat is sikerült találni, így körvonalazódott, hogy a korábban egységesnek tűnő *Rhizoctonia* forma-nemzetség valójában legalább három, egymástól rendszertanilag távol álló gombacsoportot foglal magába (WARCUP és TALBOT 1967, 1971, 1980). Később ezt DNS alapú vizsgálatokkal is sikeresen alátámasztották (MA et al. 2003). Az egyik nagy csoportot a *Ceratobasidium* és a *Thanatephorus* nemzetség alkotja, amely a *Ceratobasidiaceae* család két közel rokon nemzetsége. A második csoport a *Tulasnellaceae* gombacsalád *Tulasnella* nemzetsége, a harmadik pedig a *Sebacinaceae* gombacsalád *Sebacina* nemzetsége (ILLYÉS 2011).

A tágran értelmezett „*Rhizoctonia*” forma-nemzetségen belül a *Tulasnella* gombanemzetség egyes fajai az anamorf *Epulorhiza* nemzetség egyes fajainak teleomorf megfelelői (WARCUP és TALBOT 1971). CURRAH et al. (1997) az orchideák leggyakoribb mikorrhiza gombáiként az *Epulorhiza* és a *Ceratorhiza* (teleomorf nemzetségek: *Ceratobasidium*, *Thanatephorus*) anamorf nemzetségeket tartja.

Jelenleg nincs elegendő információ ahhoz, hogy bizonyossággal kijelenthető legyen, hogy az orchideák inkább mutualista vagy kizsákmányoló kapcsolatban állnak a talajban és a gyökereikben élő gombákkal. Nagyon keveset tudunk egyelőre az orchideákat mikorrhizáló gombák további szerepéről a talajban (BATTY et al. 2002).

2.8.2. Egyéb bazídiumos és aszkuszos gombák

Manapság egyre több, nem *Rhizoctonia*-forma nemzetségbe tartozó bazídiumos gombát sikerül izolálni teresztrisz orchideák gyökereiből. Kimutatták már például a *Boletales*, tinórugomba-alkatúak (ROY et al. 2009), a *Russulales*, galambgomba-alkatúak néhány fajtát is (SELOSSE et al. 2004; GIRLANDA et al. 2006; ROY et al. 2009; STARK et al. 2009). Az érdekesség ezekkel a fajokkal kapcsolatban, hogy egyelőre még csak részlegesen, vagy teljesen zöld színtest vesztett, azaz csak részben vagy egyáltalán nem fotoszintetizáló orchideafaj gyökereiből sikerült kimutatni őket. A *Thelephora* és a *Tomentella* nemzetség fajait (*Thelephorales*), valamint a *Hebeloma*, *Hymenogaster*, *Inocybe*, *Cortinarius* nemzetség fajait (*Agaricales*) inkább erdei élőhelyeken található orchideák: *Cephalanthera* (BIDARTONDO et al. 2004), *Epipactis* (SELOSSE et al. 2004), *Epipogium* (ROY et al. 2009) és *Corallorhiza* (ZIMMER et al. 2008) nemzetségek fajainak gombapartnereiként írták le. *Gymnadenia conopsea* gyökeréből a fent említetteken kívül STARK et al. (2009) *Lactarius* és *Cryptococcus* fajokat is kimutattak.

Az orchideák azonban, egyre inkább úgy tűnik, hogy a korábbi feltételezésekkel ellentétben a bazídiumos gombákon kívül *Ascomycotákkal*, aszkuszos gombákkal is alakíthatnak ki mikorrhiza kapcsolatot (BIDARTONDO et al. 2004). Már több alkalommal is sikerült erdei orchideafajok (*Cephalanthera*, *Epipactis*) gyökereiből a *Tuber* és a *Wilcoxina* nemzetség fajait kimutatni (BIDARTONDO et al. 2004; SELOSSE et al. 2004; STARK et al. 2009). OUANPHANIVANH

et al. (2008) *Epipactis helleborine* és *Cephalanthera damasonium* gyökerekből *Tuber maculatum*-ot, *Epipactis microphylla* gyökérből pedig *Tuber excavatum*-ot mutatott ki. STARK et al. (2009) a *Wilcoxina rehmi*-n kívül további 18 aszkuszos gombát (pl. *Terfezia*, *Tetracladium*, *Leptodontidium*, *Exophiala* nemzetségek fajait) izolálták *Gymnadenia conopsea* gyökérből.

További tömlősgomba csoportokat is izoláltak már orchideák gyökereiből, de a szakirodalomban ezen nemzetségek fajainak mikorrhiza-alkotó tulajdonsága még kérdéses. KHAMCHATRA et al. (2016) *Fusarium* sp. és *Beauveria* sp. fajokat is izoláltak, bár epifita *Dendrobium friedericksianum* fajból, és ezeket egyértelműen nem mikorrhiza partnerként közlik publikációjukban.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. *H. adriaticum* magok *in vitro* aszimbiotikus csíráztatási kísérletei

3.1.1. 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 populációiból 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, bármilyen szárítási kezelés nélkül. Minden kísérlet során a magvetések alkalmával megközelítőleg 500-500 db mag került a táptalajok felszínére.

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

Az *in vitro* csíráztatás során a lombikok sterilizálására, a táptalajfőzésre, annak steril boxban (lamináris fülke) 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 (1. táblázat), ezt módosítottam minden alkalommal a kísérleteimnek megfelelően (2. 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: A „módosított Fast táptalaj” receptje R. ESZÉKI és SZENDRÁK (1992) alapján.

1200ml	Mennyiség
pH:5,5	
Ca (NO₃)₂ X 4H₂O	100 mg
NH₄NO₃	200 mg
KH₂PO₄	100 mg
KCl	200 mg
MgSO₄ X 7H₂O	100 mg
Fe-kelát	30 mg
Heller- mikro	1 ml
Szaharóz	14 g
Fruktóz	6 g
Pepton	1 g
Polivitaplex	250 mg
Inozit	100 mg
Agar	10 g

2.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 peptont 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 triptonra. 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 ötféle 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 esetben 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.

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

A *H. adriaticum* magjainak *in vitro* aszimbiotikus táptalajra vetése előtt a magokon klórmeszes előkezelést alkalmaztam, amely során 10 g klórmeszet 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 (4. ábra), 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 (5. ábra) azért, hogy a magok felülre, a kémcső szájához közelre üljenek ki, így amikor óvatosan kiszedtem a dugót, hogy a klórmeszes szűrletet kiengedjem, a magok a kémcső falára ragadva ott maradtak.

Az előkezelt magvakat steril fülkében, steril szikével juttattam a kémcsövek faláról (6. ábra) a lombikokban levő, steril körülmények között korábban elkészített táptalajok felszínére (7. ábra), majd a magok egyenletes eloszlása érdekében egy csepp steril vizet a táptalajra juttatva steril üvegbot segítségével szélesztettem őket (8. ábra). Ezek után a lombikok száját a fertőzések és a kiszáradás ellen kétszeres légáteresztő fóliával lefedtem (9. ábra), majd dobozba helyezve egy hétig 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.



4. ábra Az elvetendő magok előkezelése klórmeszes szűrletben



5. ábra Fejjel lefelé fordított kémcsövek, az előkezelt magok a szűrlet felülúszójában maradnak



6. ábra Steril szike segítségével az előkezelt magok kivétele a kémcsőből



7. ábra Az előkezelt magok táptalajra juttatása



8. ábra Steril üvegbot segítségével 1 csepp steril desztillált víz szélesztése a táptalajon



9. ábra A lombikok lefedése légáteresztő fóliával

3.2. 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 meghatározhassuk 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 (3. táblázat) 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.

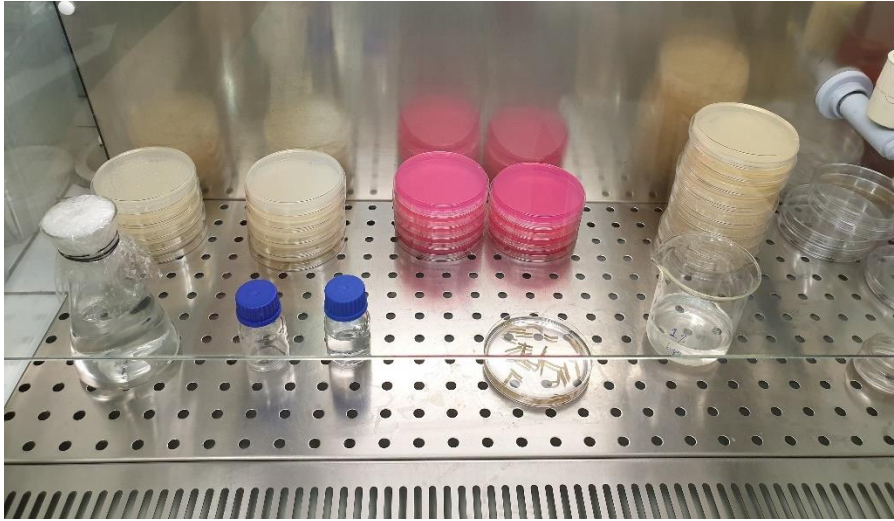
3. táblázat: A 2019. év FA táptalaj módosítási kísérletei, új összetevőik és azok mennyisége

Kísérlet	Összetevők	Új mennyiség
Baktericid, növekedésserkentő, etilén-gátló	AgNO ₃	4mg/1200ml
Csírázás- és növekedésserkentő	Kókuszvíz	10;20;30;40;50 ml/1200ml
Baktericid, csírázás-, növekedésserkentő és etilén-gátló hatás együttes megfigyelése	AgNO ₃ +kókuszvíz	4 mg/1200ml és 25ml/1200ml

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

3.3. 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 (10. ábra).



10. ábra *A. H. adriaticum* gyökérminták különböző táptalajokra helyezése

3.3.1. 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 három féle táptalaj összetételét a 4. táblázatban foglaltam össze.

4.táblázat: A mikorrhiza gombák kitenyésztéséhez használt táptalajok összetétele

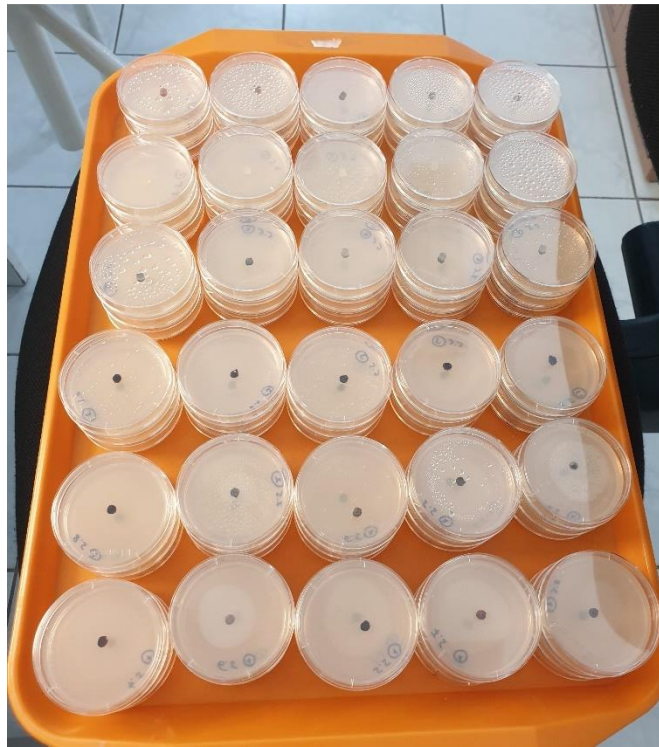
Táptalaj	Összetevők
PDA	• 20g burgonyapüré
	• 20g glükóz
	• 17g agar
	• 10ml kloramfenikol
BM	• 5g maláta
	• 10g agar
	• 2,5ml benomil
BRM	• 5g maláta
	• 10g agar
	• 2,5ml bengálrózsa

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 csapvízes 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 kitenyésztéséig 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.

3.3.2. 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 (11. ábra).



11. ábra *A. H. adriaticum* gyökérből kitenyészett gombák pH sorra oltása

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 dugófűrő 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.

3.3.3. A Petri-csészében kitenyészett, izolálásra beadott gombafaj meghatározása molekuláris genetikai vizsgálatokkal

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

A többi kitenyészett mintát azért nem küldtük el, mert mikroszkóp alatt megfigyelve, egyértelműen kijelenthető volt, hogy nem bazídiumos gombák tenyésztek 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 tenyészthető törzsekre szűkítették.

A DNS izolálás az ABI Prepman Ultra Kittel történt (INTERNET-4). 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.

3.3.4. *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 alapján történt, melynek protokollja a 2.sz. mellékletben található. A szekvenálást a Loop Genomics Mycobiome – fungál, 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-5) és az útmutató (INTERNET-6) 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.

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

A csíranövények szimbiotikus csíráztatásához és neveléséhez 2019. szeptemberében úgynevezett „H1 oat medium”, finomra darált zabpelyhes táptalajt készítettem az 5. táblázatban leírt receptúra alapján. A finomra őrölt zabot zabpehelyből készítettem, melyet alaposan átdaráltam, majd apró szemű konyhai szitán átszitáltam. A táptalajkészítés menete és tárolása a MFA táptalajével megegyezően zajlott.

5. táblázat: A H1 zabpelyhes táptalaj receptje. (CLEMENTS et al. 1986, módosítva: RASMUSSEN et al 1990 alapján)

Összetevő	Mennyiség/liter
Ca(NO ₃) ₂ *4H ₂ O	200mg
KCl	100mg
KH ₂ PO ₄	200mg
MgSO ₄ *7H ₂ O	100mg
Élesztő kivonat (Difco)	100mg
Szacharóz	2g
Finomra őrölt zab	3g
Agar	12g

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 (12. ábra). Minden gombafaj esetében 1 kísérleti szimbiotikus vetést készítettem (13. ábra, 3.sz. melléklet).



12. ábra: Gomba minta *H. adriaticum* magok mellé helyezése zabpelyhes táptalajon.



13. ábra: A *H. adriaticum* magok mellé helyezett gombaminta.

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 lencsén keresztül készítettem.

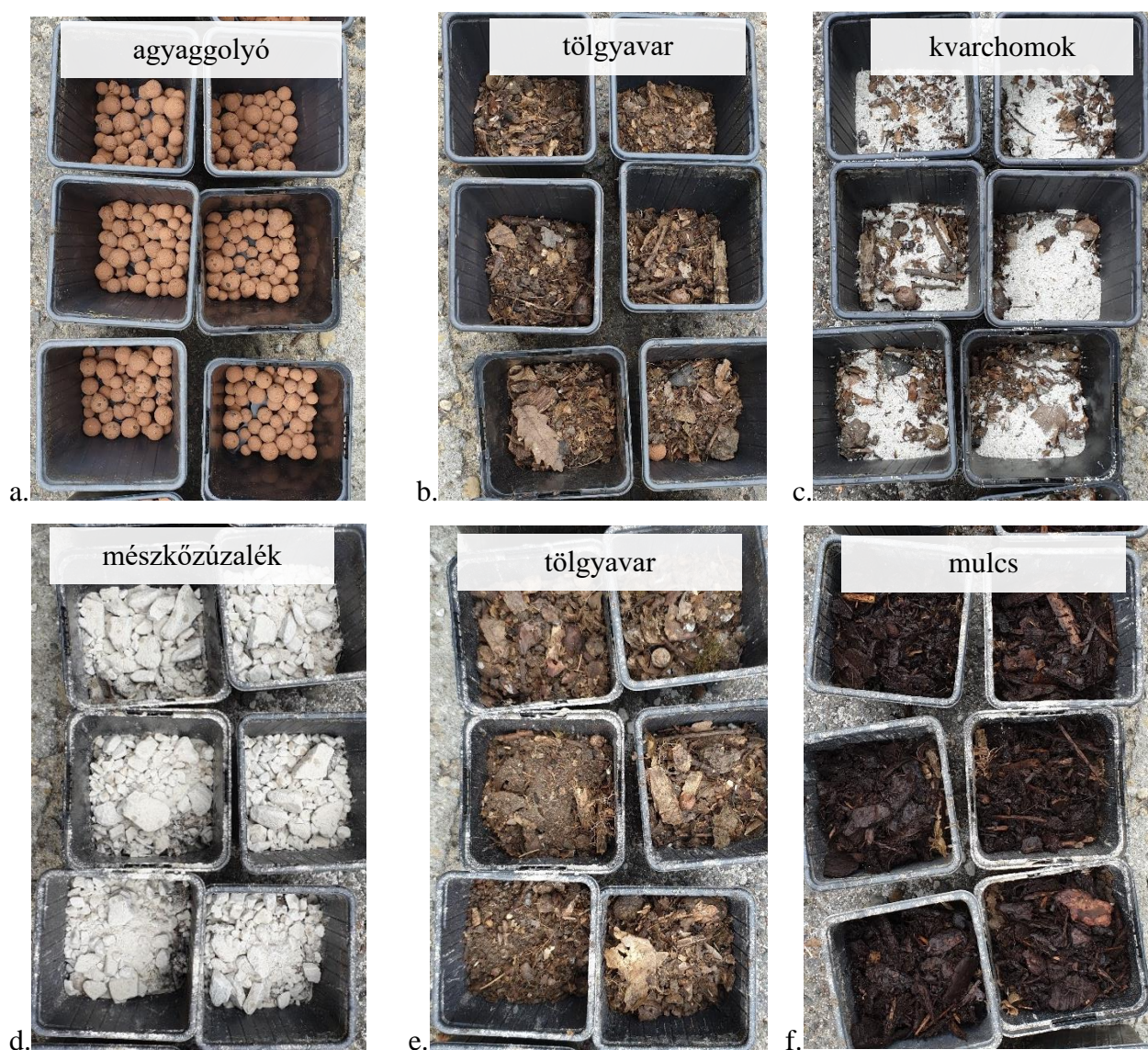
3.5. Az *in vitro* nevelt *H. adriaticum* növények kiültetési kísérletei

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 (14. a-f ábra). 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 (15. ábra) 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 (16. ábra). Ezt a 6 egyedet egymás mellett szobahőmérsékleten, napközben 24-28°C, éjjel 18-20°C-os hőmérsékleten, természetes fénynél tartottam.

A maradék 2 egyedeket 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 (17. ábra), 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 cserepet a Botanikus Kert sziklakertjében a cserép pereméig a talajba beásta 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 gúlat 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.



14. a-f ábra A megfelelő kiültető közeg elkészítéséhez használt alapanyagok sorrendben



15. ábra A Greenman Floraria termékkel öntözött kísérleti egyedek



16. ábra A folyékony MFA táptalajjal öntözött kísérleti egyedek



17. ábra A lombikból az eredeti élőhelyről hozott talajba kiültetésre kerülő *H. adriaticum* növény

3.6. Az adatfeldolgozás módszerei

A munkám során kapott adatokat Microsoft Excel táblázatba vittem fel, az alpműveleteket ezzel a programmal számoltam ki. A statisztikai elemzéseket (lásd lentebb) 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 táblázatot (4. sz. melléklet) 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.

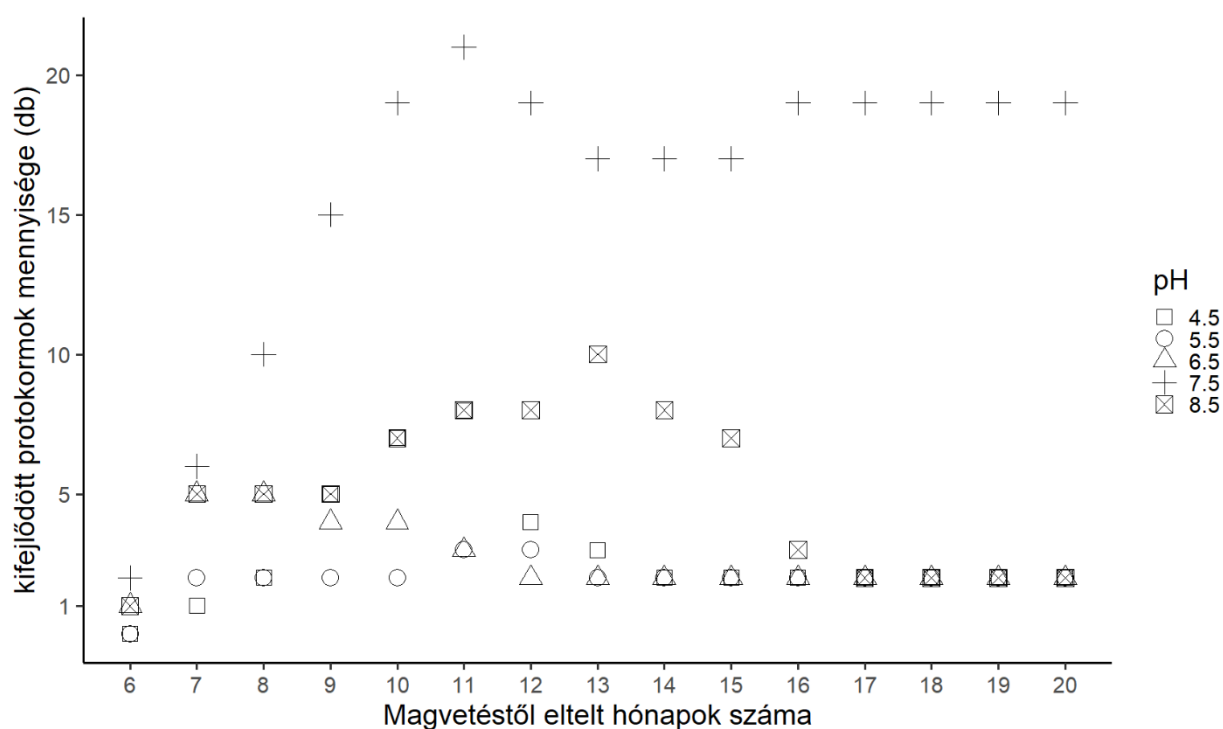
4. EREDMÉNYEK

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

4.1.1. 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.

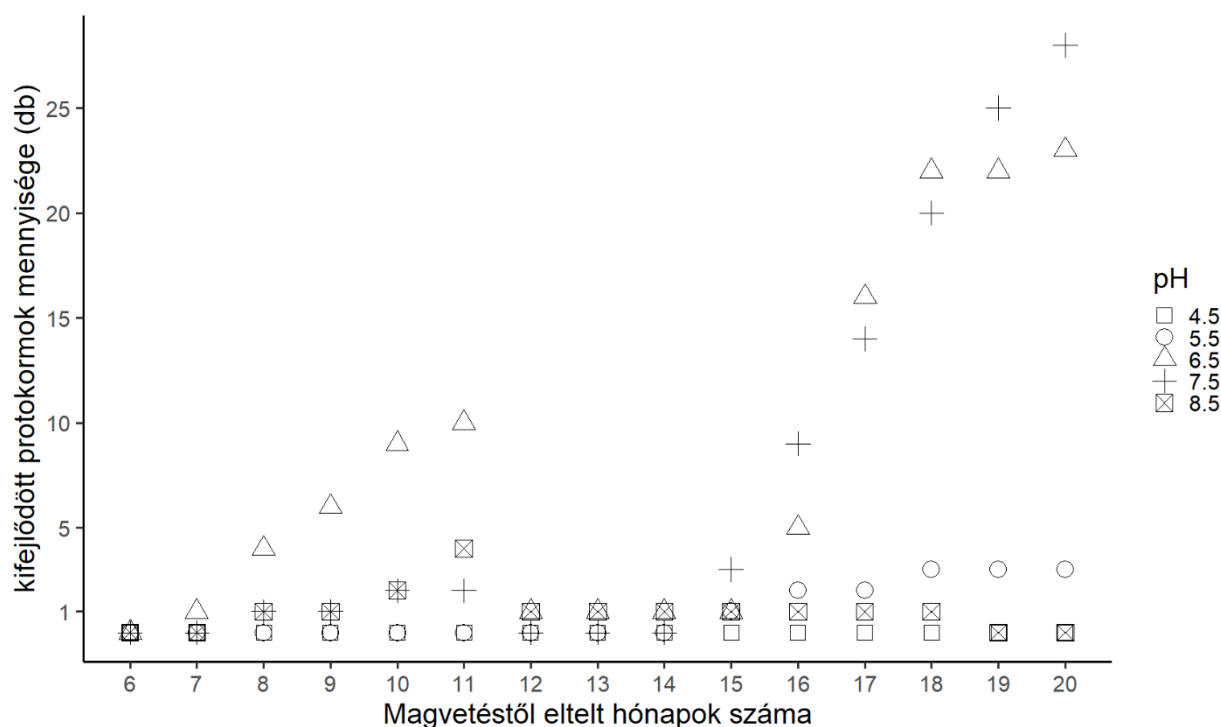
A magmaradt és felhasznált 5-5 lombiknyi magvetésből, a pH gradiens mentén kapott csírázási eredmények a 18. ábrán láthatók.



18. ábra: A 2016-ban gyűjtött *H. adriaticum* magok csírázása a pH gradiens mentén MFA táptalajon

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 18. ábrán a 8,5-es, illetve a 4,5-es pH-jú lombikok esetében szembetűnő, de a 7,5-es pH esetében 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 magok csírázása a pH gradiens mentén a 19. ábrán látható.



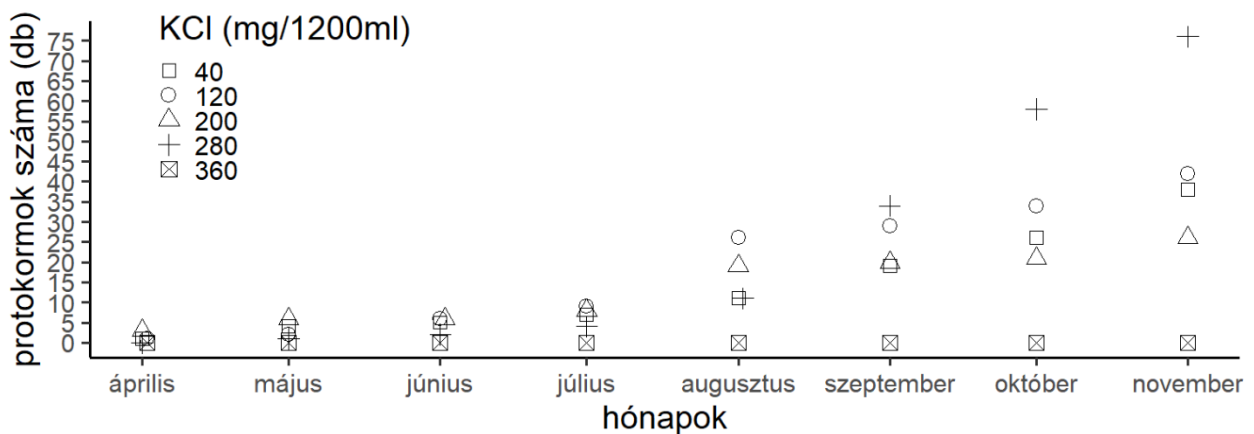
149. ábra: A 2017-ben gyűjtött *H. adriaticum* magok csírázása a pH gradiens mentén MFA táptalajon

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 a 19. ábrán jól látható, hogy 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 19. ábrán 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.

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

A *H. adriaticum* magokból hónapról-hónapra kifejlődött protokormok mennyiségét a táptalaj kálium-klorid tartalmának változásával a 20. ábra mutatja be.



20. ábra: *H. adriaticum* protokormok megjelenése a kálium-klorid gradiens mentén MFA táptalajon

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 20. ábráról leolvasható, hogy 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.

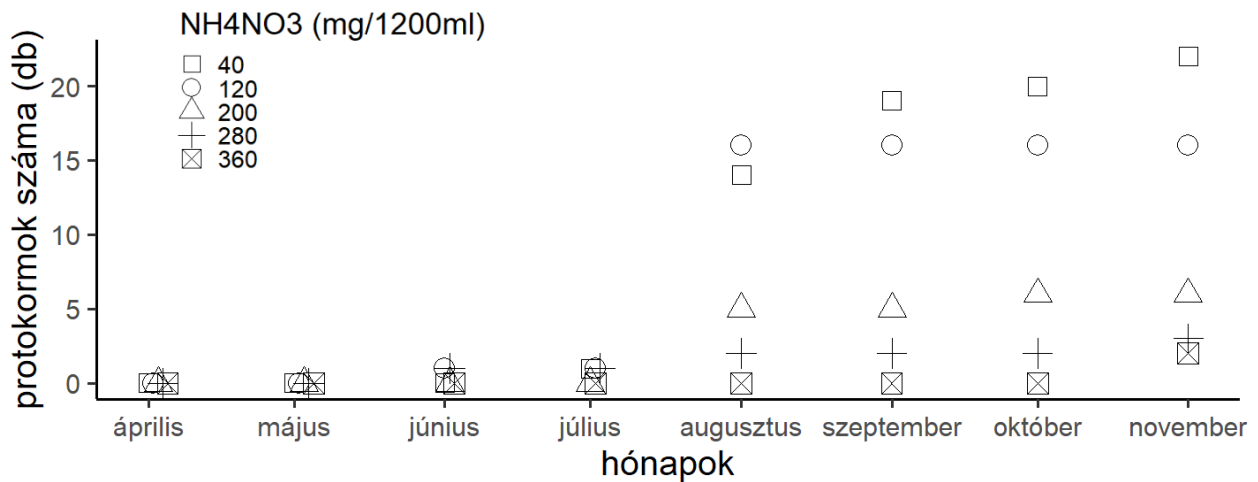
13 hónappal a magvetés után a 40, 120, 200, és 280 mg/1200 ml kálium-kloridot tartalmazó MFA táptalajokon kialakult protokormok állapota a 21. ábrán látható.



21. ábra: A 40, 120, 200, és 280 mg/1200 ml kálium-kloridot tartalmazó MFA táptalajokon kialakult protokormok 13 hónappal a magvetés után

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

A táptalaj változó NH_4NO_3 tartalmának hatására kifejlődött *H. adriaticum* protokormok mennyiségét a 22. ábra mutatja be.



22. ábra: *H. adriaticum* protokormok megjelenése az ammónium-nitrát gradiens mentén

A 22. ábrán jól látható, hogy az NH_4NO_3 koncentrációjának emelésével csökkent a protokormok száma.

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 22. ábráról leolvasható, hogy 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. 13 hónappal a magvetés után a 40, 120, 200, 280, és 360 mg/1200 ml ammónium-nitrátot tartalmazó MFA táptalajokon kialakult protokormok állapota a 23. ábrán látható.



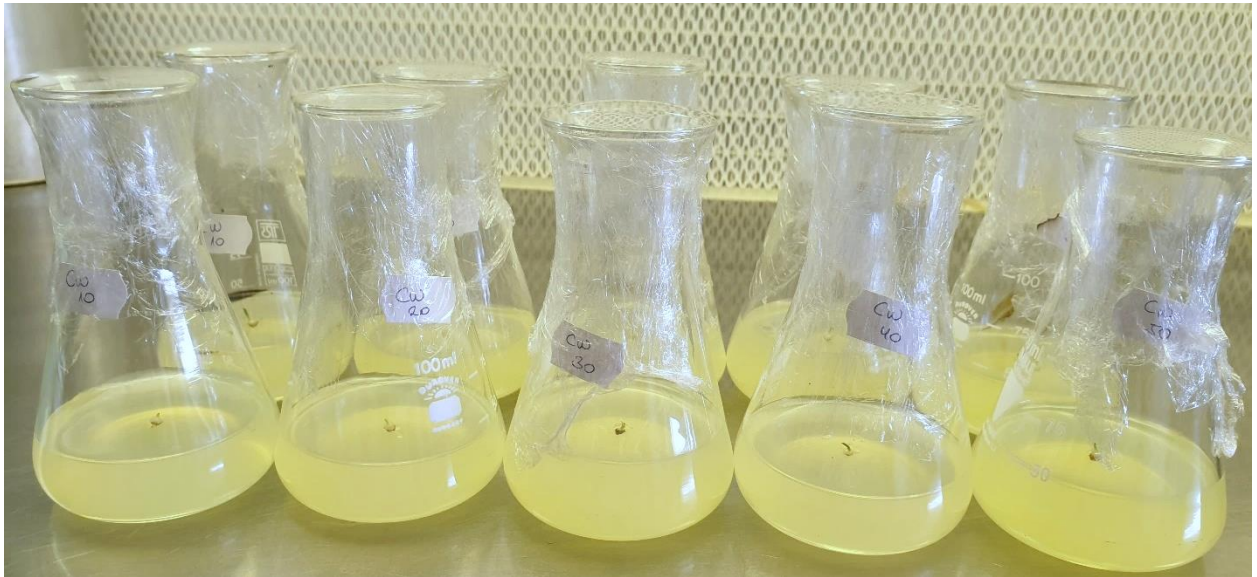
23. ábra A 40, 120, 200, 280, és 360 mg/1200 ml ammónium-nitrátot tartalmazó MFA táptalajokon kialakult protokormok 13 hónappal a magvetés után

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

4.2.1. A kókuszvíz hatása a csíranövények fejlődésére

A csíranövények állapota a különböző mértékű kókuszvízes MFA táptalajra tűzdeléskor a 24. ábrán látható. Egy hónappal a csíranövények kókuszvízes MFA táptalajra tűzdelése után szemmel látható volt a kókuszvíz növekedésserkentő hatása (25. ábra). Az is szemmel látható a 26-30. ábrákon, hogy a kókuszvíz mennyiségének növelésével a növekedésserkentő hatás is növekszik,

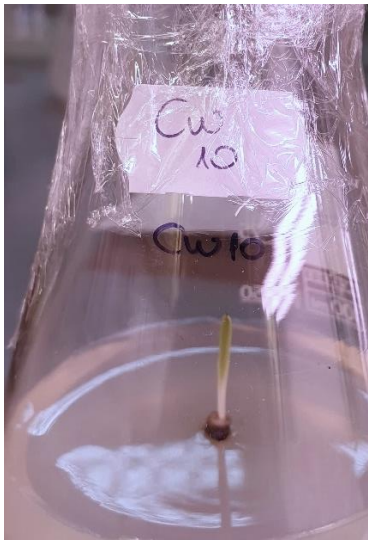
már 10 ml/1200 ml mennyiség is megindítja a zöld levél fejlődését, de a mennyiség növelésével egyre erőteljesebb ez a folyamat, 40 ml/1200 ml mennyiségnél már a gyökérfejlődés is megindul (29. ábra), 50 ml/1200 ml mennyiségnél pedig a gyökérfejlődés mértéke is fokozódik (30. ábra).



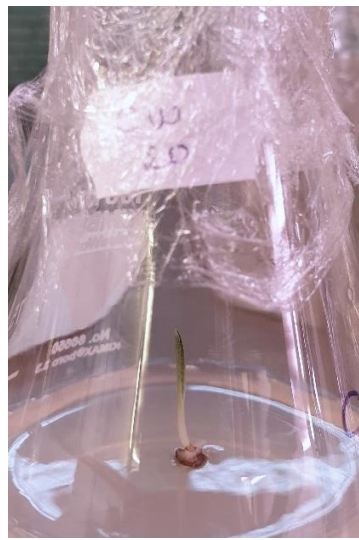
24. ábra: A csíranövények állapota a kókuszvizés MFA táptalajra tűzdeléskor



25. ábra: A csíranövények állapota 1 hónappal a kókuszvizés MFA táptalajra tűzdelés után



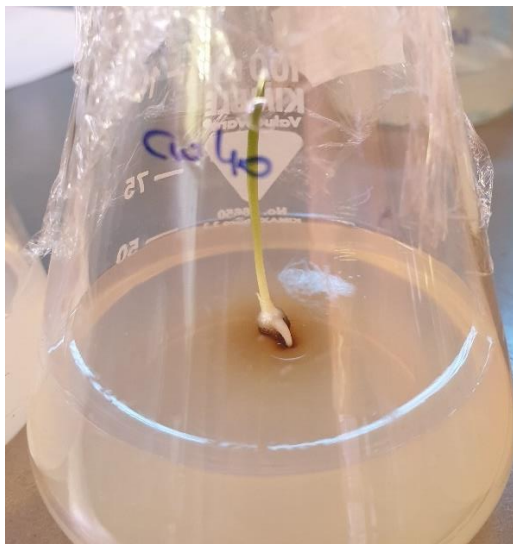
26. ábra: 1 hónapos csíranövény állapota a 10 ml/1200 ml kókuszvizet tartalmazó táptalajon



27. ábra: 1 hónapos csíranövény állapota a 20 ml/1200 ml kókuszvizet tartalmazó táptalajon



28. ábra: 1 hónapos csíranövény állapota a 30 ml/1200 ml kókuszvizet tartalmazó táptalajon



29. ábra: 1 hónapos csíranövény állapota 1 hónappal a 40 ml/1200 ml kókuszvizet tartalmazó táptalajon



30. ábra: 1 hónapos csíranövény állapota az 50 ml/1200 ml kókuszvizet tartalmazó táptalajon

A 2,5 hónappal a kókuszvizet tartalmazó táptalajra tűzdelés utáni állapotokat a 31-35. ábrák mutatják be. Ezeken az ábrákon látható, hogy 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 (35. ábra).



31. ábra 2,5 hónapos csíranövény állapota a 10 ml/1200 ml kókuszvizet tartalmazó táptalajon



32. ábra 2,5 hónapos csíranövény állapota a 20 ml/1200 ml kókuszvizet tartalmazó táptalajon



33. ábra 2,5 hónapos csíranövény állapota a 30 ml/1200 ml kókuszvizet tartalmazó táptalajon



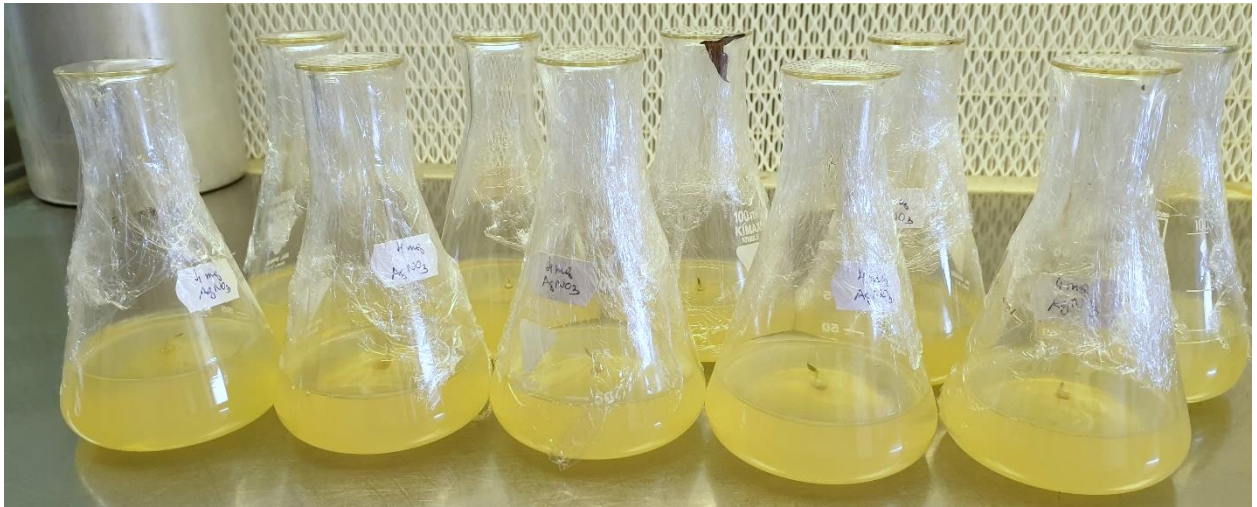
34. ábra 2,5 hónapos csíranövény állapota a 40 ml/1200 ml kókuszvizet tartalmazó táptalajon



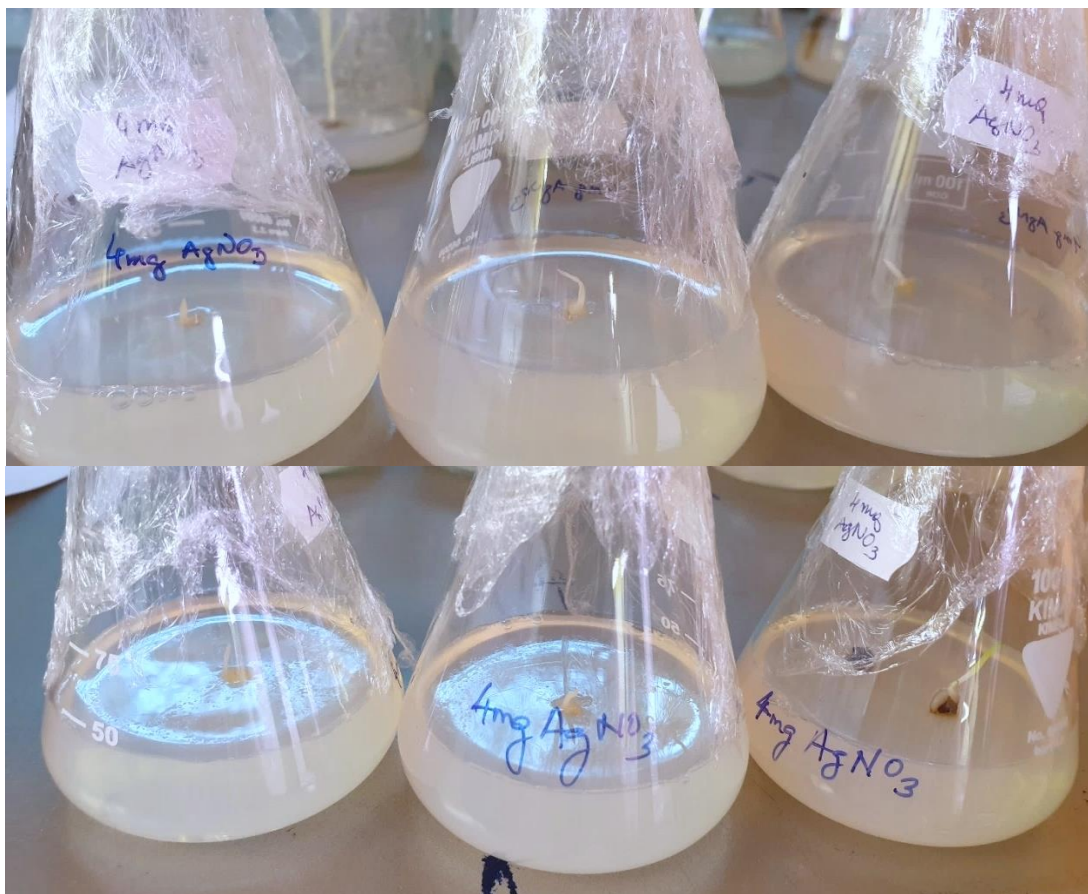
35. ábra 2,5 hónapos csíranövény állapota a 50 ml/1200 ml kókuszvizet tartalmazó táptalajon

4.2.2. Az ezüst-nitrát hatása a csíranövények fejlődésére

A csíranövények állapota a 4 mg/1200ml ezüst-nitrátot tartalmazó MFA táptalajra tűzdeléskor a 36. ábrán látható. Egy hónappal az tűzdelés után a csíranövények állapotában érdemi változást nem tapasztaltunk a különböző AgNO_3 koncentrációk mellett (37. ábra).



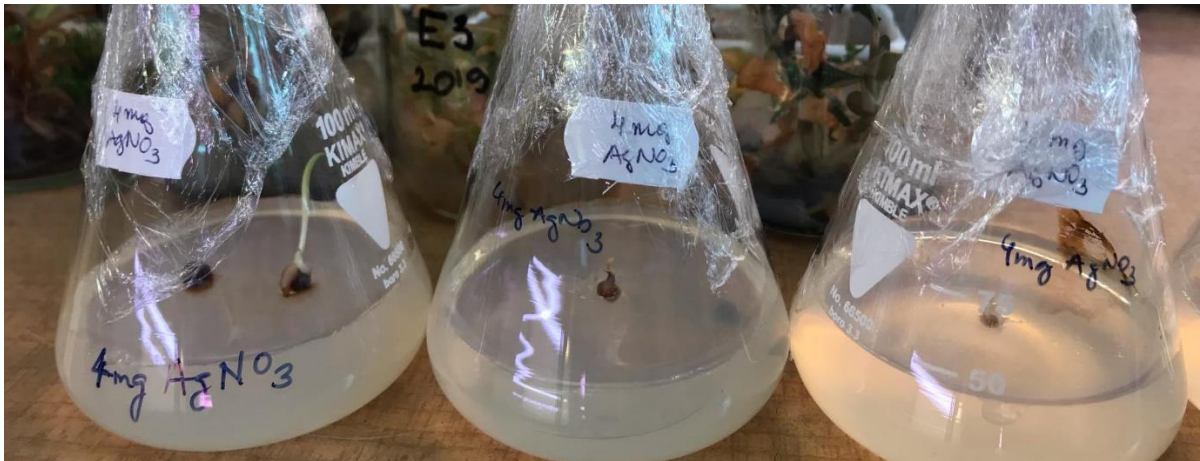
36. ábra: A csíranövények állapota a 4 mg/1200 ml ezüst-nitrátot tartalmazó MFA táptalajra tűzdeléskor



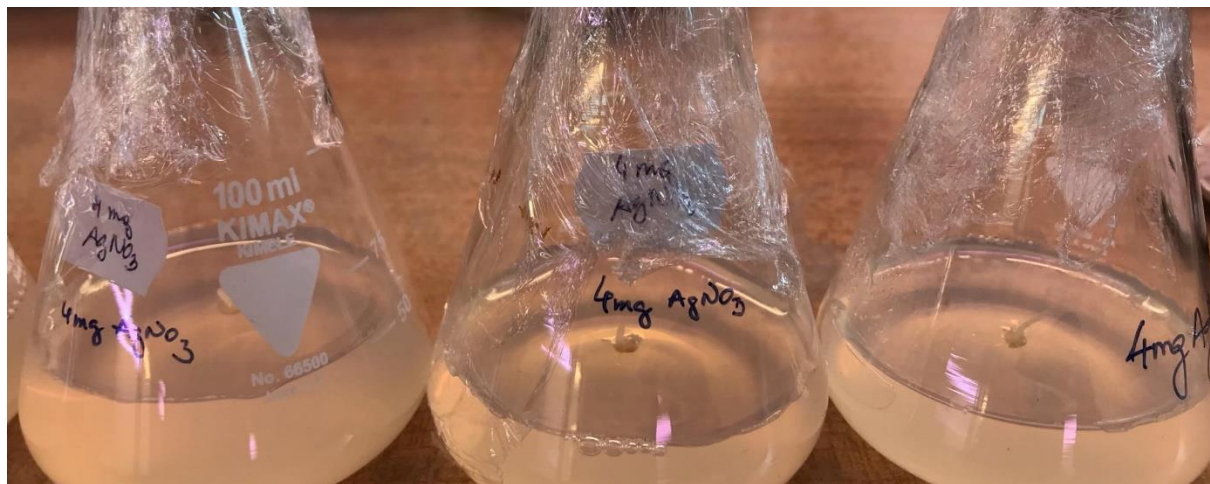
37. ábra: 1 hónapos csíranövények állapota a 4 mg/1200 ml ezüst-nitrátot tartalmazó táptalajon

2,5 hónap elteltével a 4 mg ezüst-nitrátot tartalmazó táptalajokon nem sok változás volt tapasztalható (38-39. ábra) 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, vékonynak és törékenynek tűnt (38. ábra, bal szélső lombik).



38. ábra 2,5 hónapos csíranövények állapota a 4 mg/1200 ml ezüst-nitrátot tartalmazó táptalajon



39. ábra 2,5 hónapos csíranövények állapota a 4 mg/1200 ml ezüst-nitrátot tartalmazó táptalajon

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

A csíranövények állapota a 4 mg/1200 ml ezüst-nitrátot és 25 ml/1200 ml kókuszvizet együttesen tartalmazó MFA táptalajra tűzdeléskor a 40. ábrán látható. Egy hónappal a csíranövények táptalajra tűzdelése után szemmel látható volt az ezüst-nitrát és a kókuszvíz együttes növekedésserkentő hatása (41.a-b, 42.a-e ábrák). A három kísérlet közül egyértelműen ez bizonyult a leglátványosabb növekedésserkentő hatásúnak.



40. ábra: A csíranövények állapota a 4 mg/1200 ml ezüst-nitrátot és 25 ml/1200 ml kókuszvizet együttesen tartalmazó MFA táptalajra tűzdeléskor

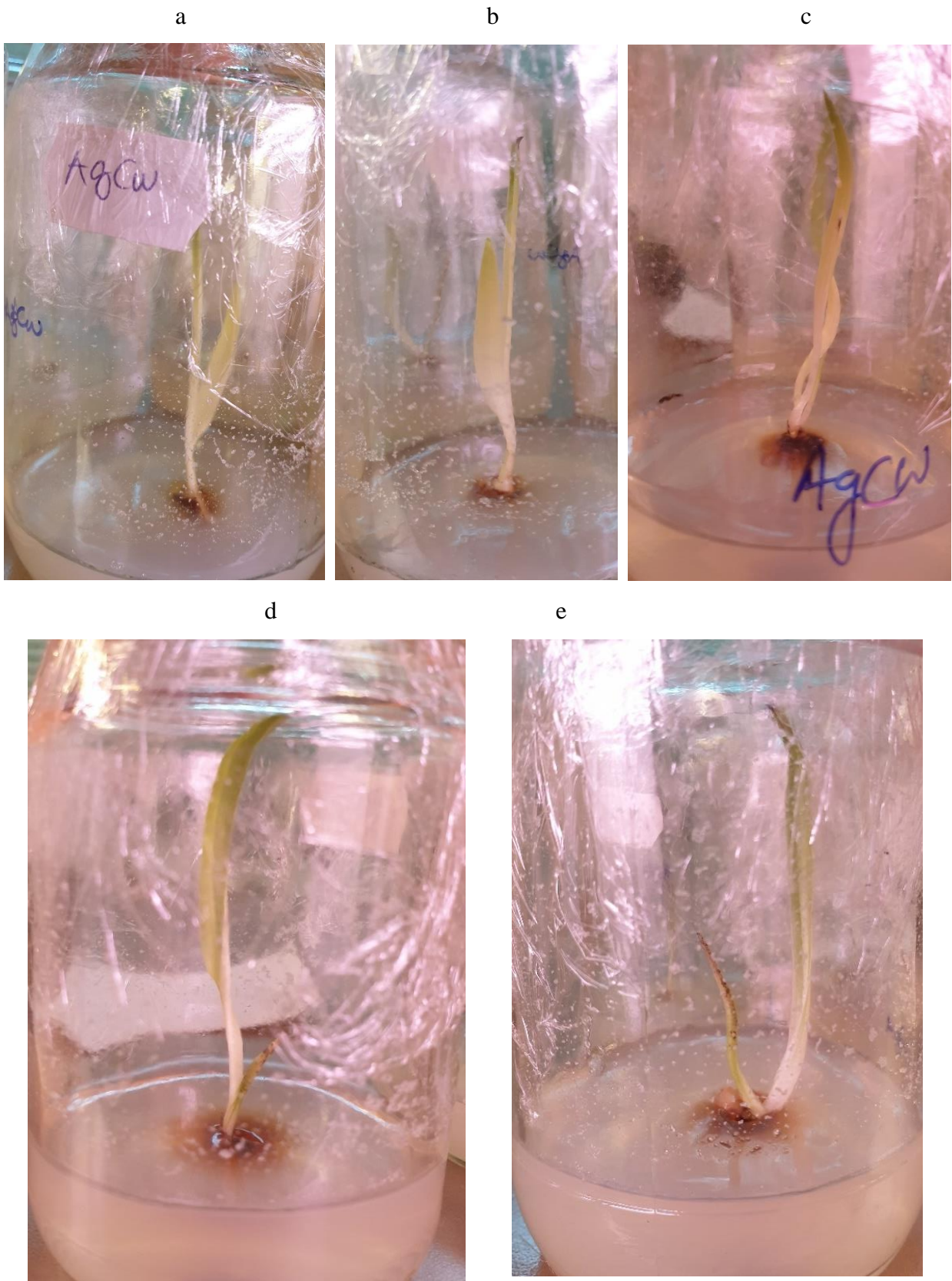
a



b



41.a-b ábra: 1 hónapos csíranövények állapota a 4 mg/1200 ml ezüst-nitrátot és 25 ml/1200 ml kókuszvizet együttesen tartalmazó MFA táptalajon



42. a-e ábra: 1 hónapos csíranövények állapota közelről a 4 mg/1200 ml ezüst-nitrátot és 25 ml/1200 ml kókuszvizet együttesen tartalmazó táptalajon

A tüzdeléstől számított két és fél hónap elteltével a csíranövények tovább növekedtek és erősödtek, több lombikban kifejezetten erős, életképes, sötétzöld levelű növényeket találtam (43-44. ábrák).



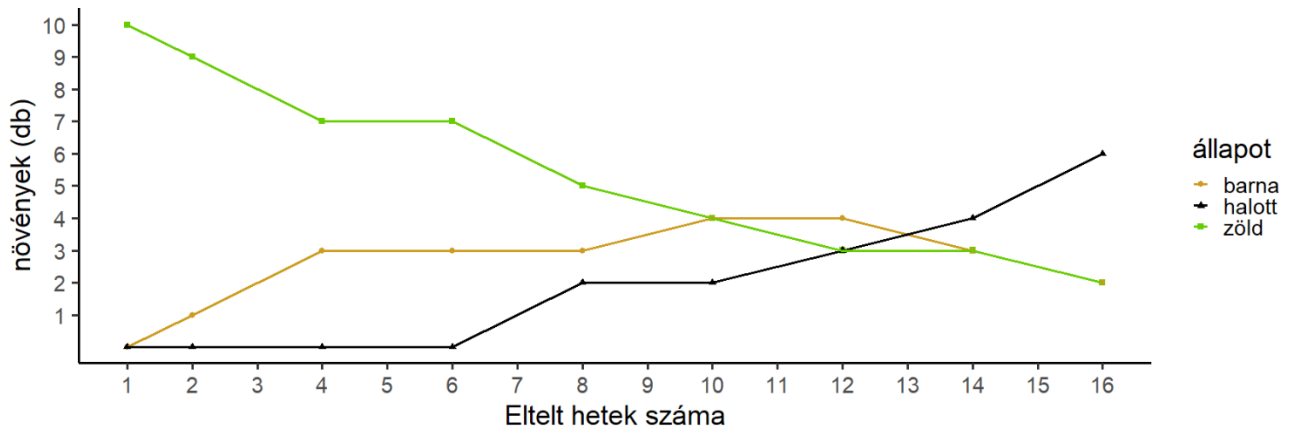
43. ábra 2,5 hónapos csíranövények állapota a 4 mg/1200 ml ezüst-nitrátot és 25 ml/1200 ml kókuszvizet együttesen tartalmazó táptalajon



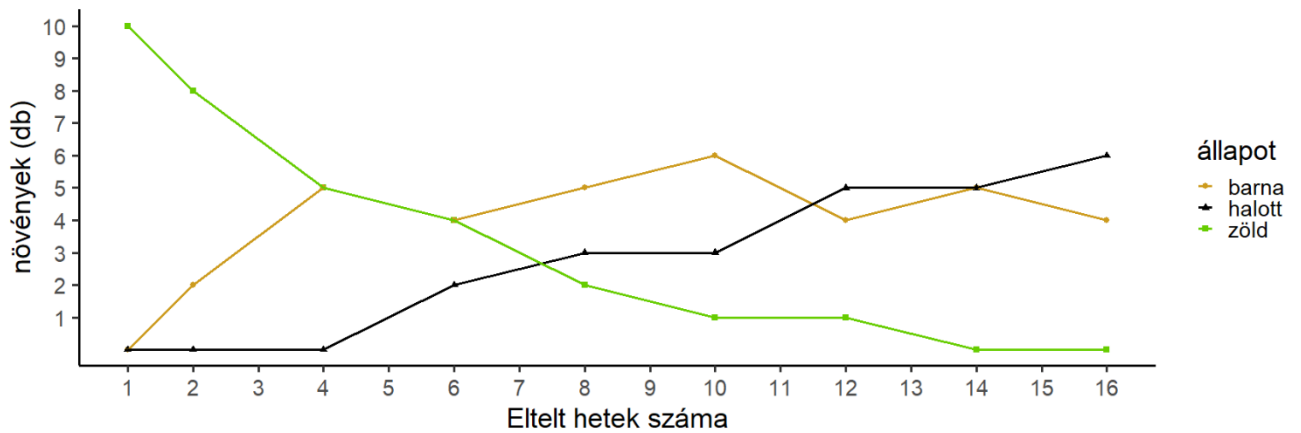
44. ábra 2,5 hónapos csíranövények állapota a 4 mg/1200 ml ezüst-nitrátot és 25 ml/1200 ml kókuszvizet együttesen tartalmazó táptalajon

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

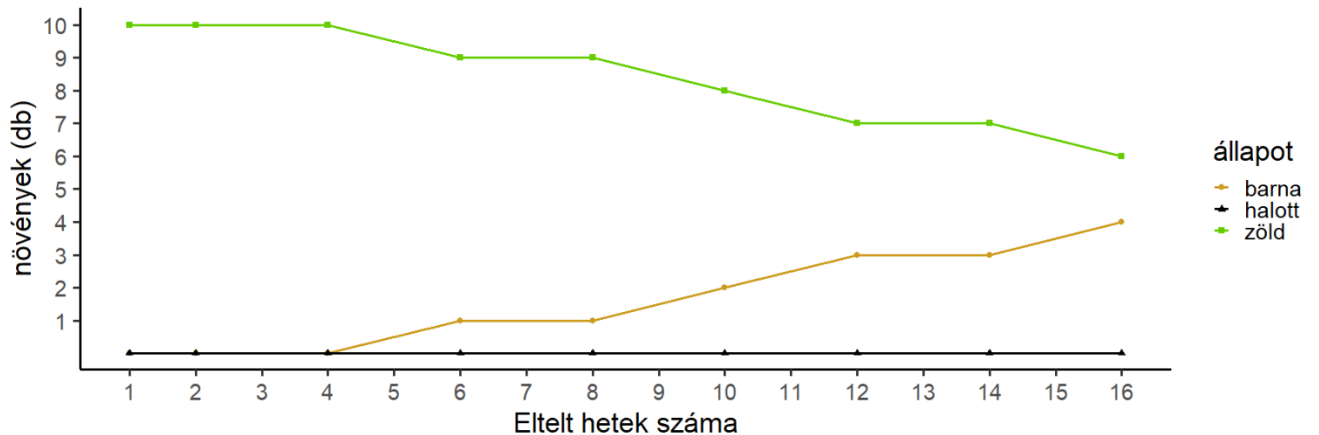
Az *in vitro* nevelt növények fejlődését az idő múlásával a különböző szobákban a 45-48. ábrákon látható diagramok mutatják be.



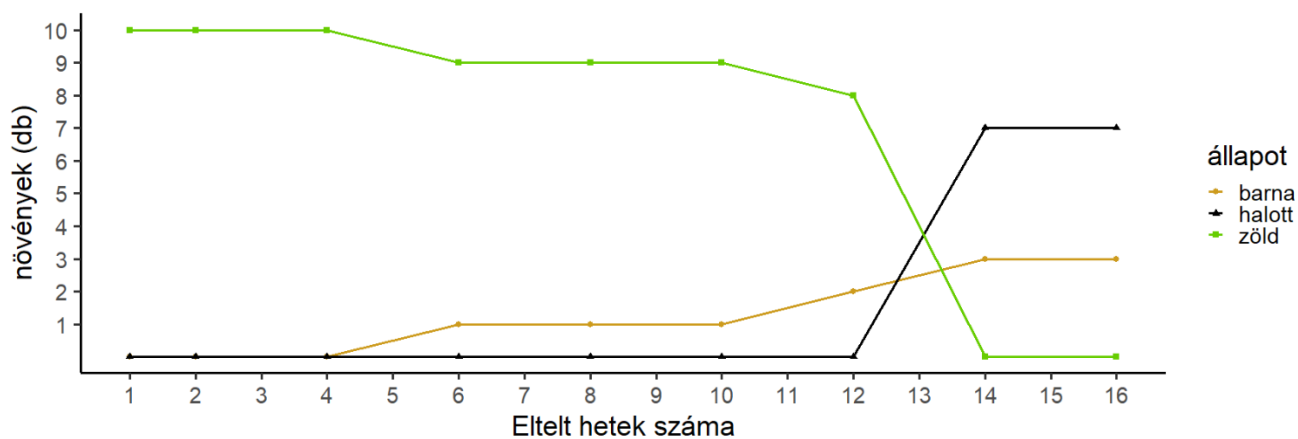
45. ábra: Az in vitro nevelt növények állapotának változása a fényszobában a 16 héten keresztül tartó kísérlet során. Mesterséges megvilágítás időtartama 16 óra/nap, hőmérséklet 21°C.



46. ábra: Az in vitro nevelt növények állapotának változása a D-i tájolású szobában, természetes megvilágítás és 28-30°C mellett. a 16 héten keresztül tartó kísérlet során.



47. ábra: Az in vitro nevelt növények állapotának változása az É-i tájolású szobában, természetes megvilágítás és 22-26°C mellett a 16 héten keresztül tartó kísérlet során.



48. ábra: Az *in vitro* nevelt növények állapotának változása D-i tájolású szobában, természetes megvilágítás és állandó 24°C-os légkondicionált szobában a 16 héten keresztül tartó kísérlet során.

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 kitettséű, 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.

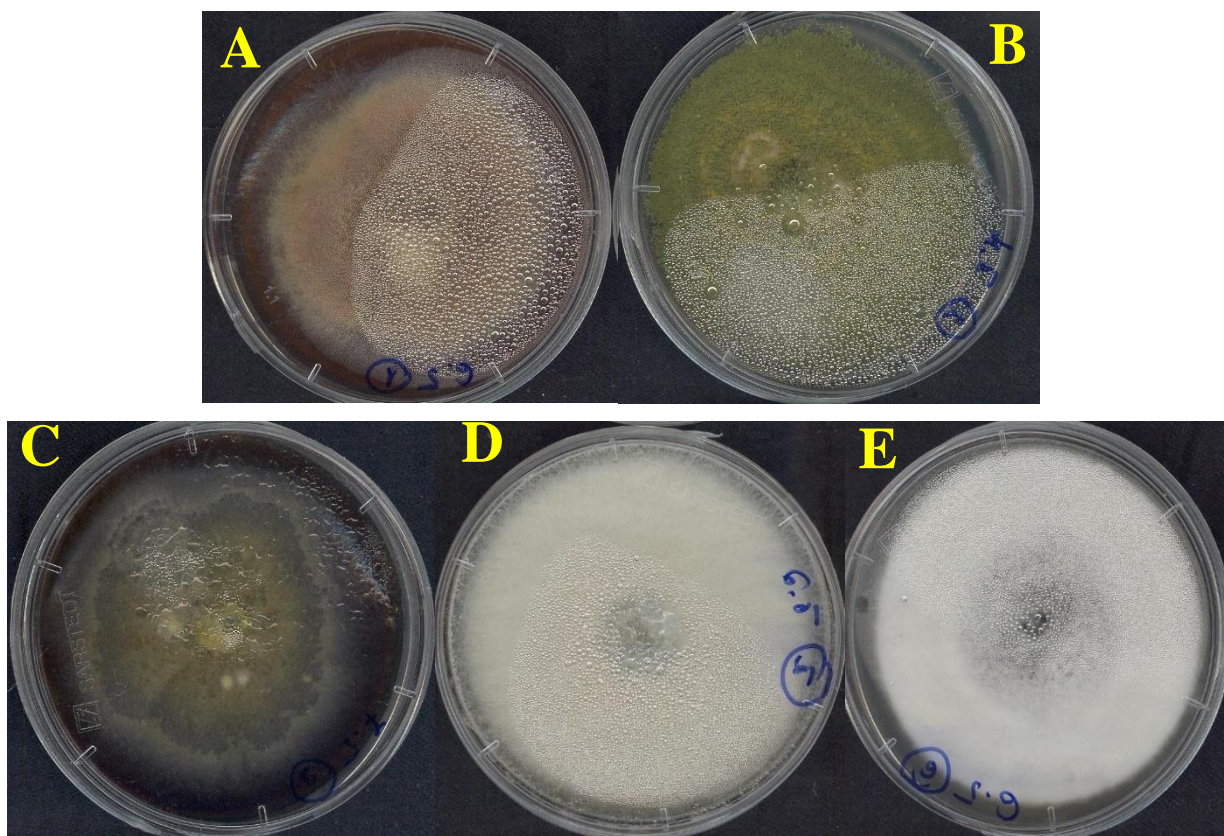
A negyedik, éjjel-nappal 24°C hőmérsékletű, déli kitettséű, természetes fényt kapó szobában a 12. hétig kapott eredmények a számottevők (május-június-július), ugyanis ekkor egy számunkra be nem jelentett, augusztusi kötelező szabadság alatt bekövetkező több napos áramkimaradás (karbantartás) miatt a 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.

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

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

A gyökérminták felületi fertőtlenítése esetében az 5 percig 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 kitenyésztett 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 (49. ábra).

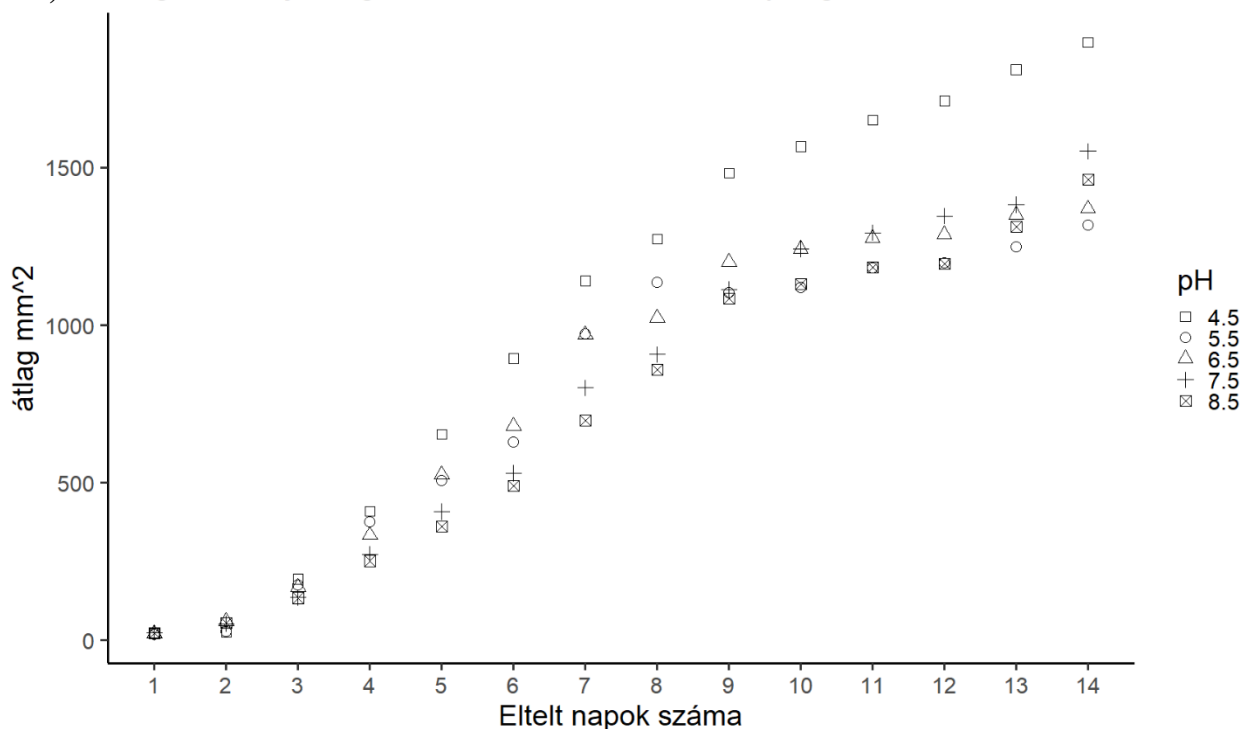


49. ábra: A kitenyésztett gombafajok. Bal felső képtől kezdve jobb irányba: A, B, C, D, E faj.

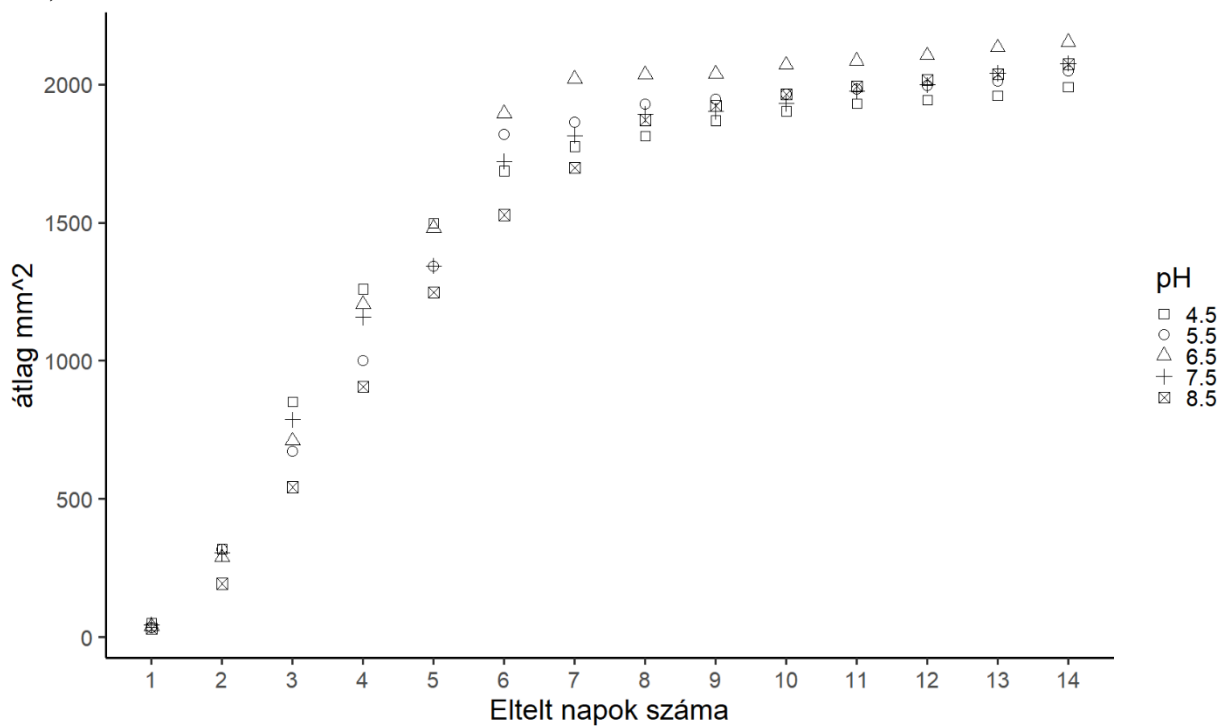
4.3.2. A kitenyészített gombák számára optimális pH meghatározásának kísérlete

A kitenyészített gombák 14 napon át tartó növekedési kísérlete során, különböző pH-kon kapott eredményeit az 50.a-e ábrákon mutatom be.

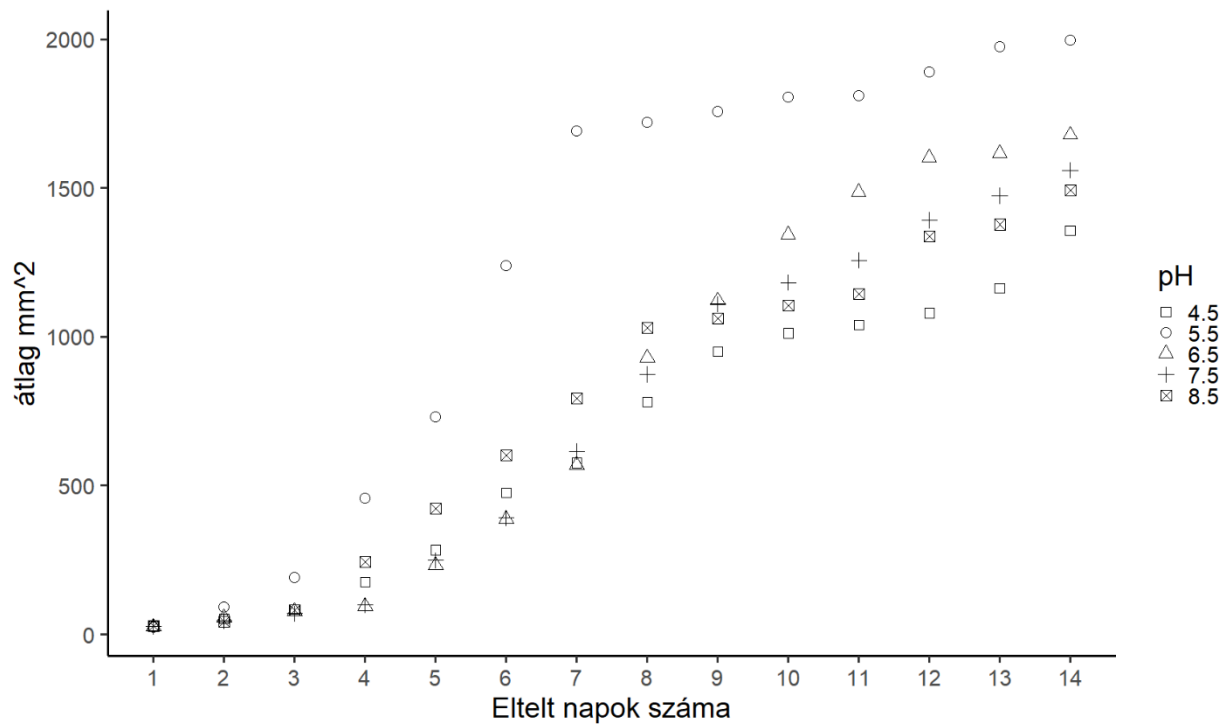
a.) 'A' gombafaj átlagos növekedési mértéke a pH grádiens mentén



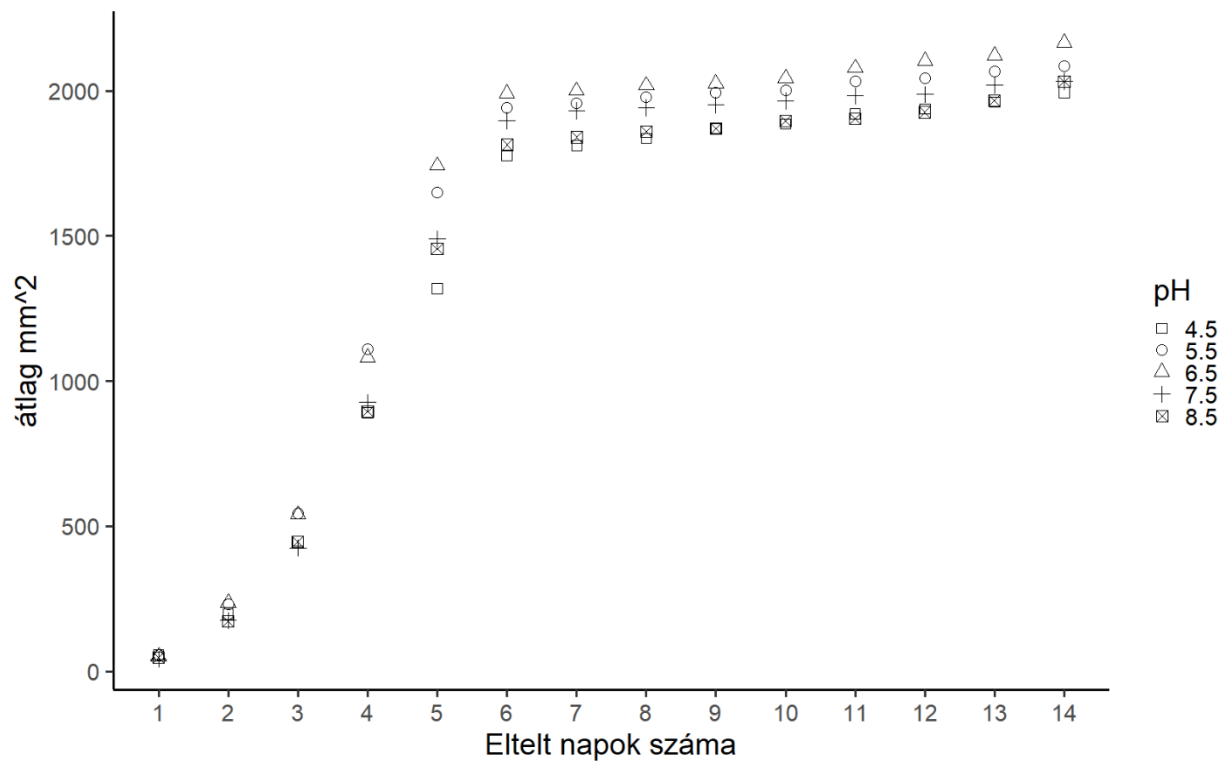
b.) 'B' gombafaj átlagos növekedési mértéke a pH grádiens mentén



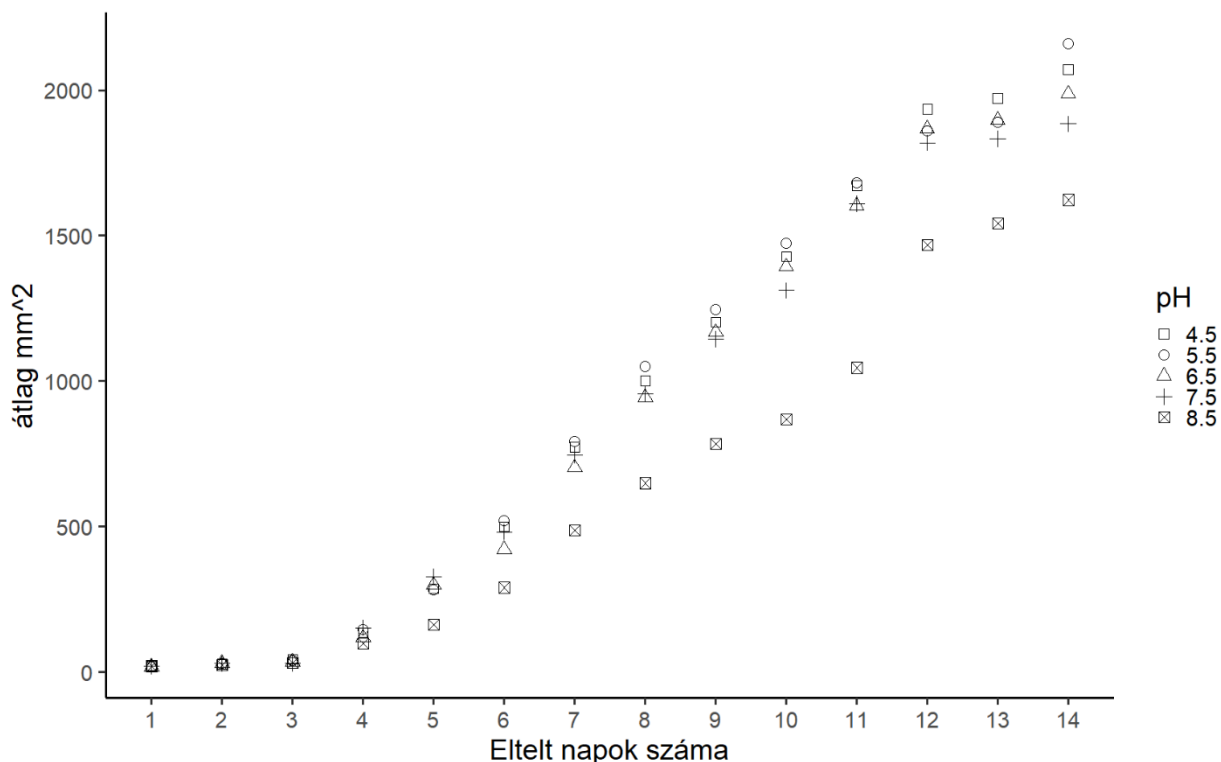
c.) 'C' gombafaj átlagos növekedési mértéke a pH grádiens mentén



d.) 'D' gombafaj átlagos növekedési mértéke a pH grádiens mentén



e.) 'E' gombafaj átlagos növekedési mértéke a pH grádiens mentén



50. ábra: a-e.) Az egyes kitenyészített gombák növekedési mértékei a pH grádiens mentén

Az ábrákról leolvasható, hogy a kitenyészített különböző gombafajoknak igen különböző 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 (50.a ábra). A „B” gombafaj pH optimuma a pH 6,5, de látható, hogy igazából nincsen túl nagy különbség a faj növekedési sebességében különböző pH-kon (50.b ábra), 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 (50.c ábra). A „D” gombafaj optimális talaj pH-ja a kísérlet alapján a pH 6,5, de az 50.d ábráról az is látszik, hogy 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 (50.e ábra). Ennek a fajnak a növekedési mértéke egyértelműen csökken a talaj pH növekedésével.

Az egyes gombafajok pH-nkénti R^2 értékeit a 6. táblázat, míg a varianciaanalízis során kapott p-értékeket a 7. táblázat tartalmazza. A nullhipotézisünk: nincs különbség az átlagok között, a kezelések/csoportok a célváltozó átlagára nézve minden mintában/kezelési csoportban azonosak.

6. táblázat: A kitenyésztett gombafajok különböző pH-n való átlagnövekedéséhez illesztett lineáris trendvonal R^2 értékei

Gombafajok/pH	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5
A	0,9653	0,9086	0,9338	0,977	0,9757
B	0,7543	0,7772	0,7599	0,7976	0,8492
C	0,9733	0,8755	0,9531	0,9647	0,9698
D	0,7772	0,7236	0,7263	0,7369	0,7563
E	0,9712	0,9741	0,9677	0,972	0,9463

7. táblázat: A varianciaanalízis eredményei

Gomba	p-érték	Megállapítás
A	0,578	Nincs szignifikáns különbség a különböző pH-kon kapott növekedési átlagok között
B	0,984	Nincs szignifikáns különbség a különböző pH-kon kapott növekedési átlagok között
C	0,101	Nincs szignifikáns különbség a különböző pH-kon kapott növekedési átlagok között
D	0,972	Nincs szignifikáns különbség a különböző pH-kon kapott növekedési átlagok között
E	0,822	Nincs szignifikáns különbség a különböző pH-kon kapott növekedési átlagok között

A 6. táblázatban található R^2 értékek mindegyike azt mutatja, hogy az adott pH-n mért növekedési pontokra szignifikánsan illeszkedik a hozzájuk rendelt lineáris trendvonal. A 4.sz. melléklet alapján 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 kitenyésztett gombafajok növekedési mértékei a különböző pH-kon egyik esetben sem különböznek szignifikánsan egymástól, tehát ezek alapján az összes kitenyésztett gombafaj széles pH referenciával rendelkező faj, és kevésbé függenek a talaj pH értékétől.

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

Az izolálásra, a BIOMI Biotechnológiai Szolgáltató Kft.-hez beadott „A” gomba minta esetében az illesztések eredményét az 8. és 9. táblázatok tartalmazzák.

8. táblázat: NCBI BLAST Találati Lista Összesítés

*: BLAST Pontszám= az illesztés minőségére jellemző érték. A nagyobb pontszám nagyobb fokú hasonlóságot jelent

NCBI BLAST Találati Lista Összesítése			
Izolátum	Találatok	Blast Pontszám*	Találatok száma
„A” faj	...Ilyonectria robusta	935	37
	...Ilyonectria sp.	929	15
	...Ilyonectria destructans	929	7
	...Ilyonectria sp. HB 4	924	1
	...Ilyonectria sp. HB 2	924	1
	...Ilyonectria sp. HB 1	924	1
	...Ilyonectria sp. nwa_sqmc_25_5c1_1	924	1
	...Ilyonectria sp. osu_besc_4e	922	1
	...Ilyonectria sp. nwa_sqmc_25_5g	922	1
	...Ilyonectria sp. nwa_sqmc_25_5c1	920	1
	...Ilyonectria sp. nwa_ktma_25_5c	920	1
	...Ilyonectria sp. bc_lilb_26_5h	920	1
	...Ilyonectria sp. bc_pdelt_109b	920	1
	...Ilyonectria sp. HB 5	918	1
	...Ilyonectria sp. HB 3	918	1
	...Ilyonectria sp. nwa_besc_246b	913	1
	...Ilyonectria sp. bc_besc_314b	913	1
	...Ilyonectria sp. bc_besc_294i	911	1
	...Ilyonectria sp. nwa_ktma_25_5a	909	1
	...Ilyonectria sp. nc_gw_9967d	909	1
	...Ilyonectria europaea	907	4
	...Ilyonectria lusitanica	907	2
	...Ilyonectria sp. nc_besc_890c	905	1
	...Cylindrocarpon sp. 4/97-1	929	1
	...Nectriaceae sp. AS20-1	924	1
	...Nectriaceae sp. AS4-1	922	1
	...Neonectria sp. NCP02/03	920	1
	...Neonectria sp. 215c	913	1
	...Neonectria sp. 210d	913	1
	...Neonectria sp. 9h	913	1
	...Neonectria sp. 9e	913	1
	...Neonectria sp. 9d	909	1
	...Neonectria sp. O_2_BESC_883h	909	1
...Neonectria sp. C_1_BESC_294n	909	1	
...Neonectria sp. C_BESC_184y	909	1	

Izolátum	Találatok	Blast Pontszám*	Találatok száma
„A” faj	...Neonectria sp. C_BESC_184x	909	1
	...Neonectria sp. C_BESC_184v	909	1
	...Neonectria sp. C_BESC_184f	909	1
	...Neonectria sp. C_BESC_184ae	909	1
	...Neonectria sp. C_BESC_184ac	909	1
	...Neonectria sp. C_BESC_184af	909	1
	...Fusarium sp. C_2_BESC_319m	909	1
	...Neonectria sp. C_BESC_184ab	909	1
	...Neonectria sp. BESC103a	909	1
	...Neonectria sp. C_BESC_184w	909	1
	...Fusarium sp. C_2_BESC_319l	909	1
	...Neonectria sp. O_2_BESC_883k	907	1
	...Cylindrocarpon sp. 866	907	1
	...Cylindrocarpon sp. cy131	907	1
	...Cylindrocarpon sp. 5/97-12	907	1
	..Ascomycota sp. H-23	922	1
	.fungus sp.	924	5

9. táblázat: Szekvencia illesztések eredménye

*: A polimorf nukleotidokat különbségnek veszi

NCBI BLAST illesztés eredménye				
Izolátum	Találatok	Kód	Azonosság (%)	Nukleotid eltérés*
„A” faj	<i>Ilyonectria robusta</i>	MK459421	100%	0/506
	<i>Ilyonectria destructans</i>	KF915980	99%	1/506
	<i>Neonectria radicecola</i>	GU479904	99%	1/506
	<i>Ilyonectria europaea</i>	MH497571	99%	5/506
	<i>Ilyonectria lusitanica</i>	NR_156240	99%	5/506
	<i>Ilyonectria europaea</i>	JF735294	99%	5/506

A 2019/409-es izolátum az *Ilyonectria* genus tagja (100%). Legvalószínűbb faji besorolása a vizsgált 506 nukleotid hosszúságú ITS1-2 szekvencia alapján ***Ilyonectria robusta***

Tehát a vizsgált 506 nukleotid hosszúságú ITS1-2 szekvencia alapján a beadott „A” minta az *Ilyonectria robusta* faj. 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 opportunista növényi gyökérgórkórokozóként 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*.

4.3.4. A beadott *H. adriaticum* gyökérszegmensből meghatározásra került gombapartnerek

A Loop Genomics Mycobiome Kit alapján, a szekvenálás során kapott és a Unite (INTERNET- 7) illetve a Silva (INTERNET- 8) nemzetközi adatbázisokból kiértékelt, összesített eredményeket a 10. táblázat tartalmazza.

10. táblázat: A gyökérminta szekvenálása során kapott, nemzetközi adatbázisokból kiértékelt, összesített eredmények. (ab*: abundancia)

Nemzetség	Faj	szám	ab*	Taxon
Himantoglossum	<i>Himantoglossum adriaticum</i>	206	0,665	<i>Orchideaceae (terresztris)</i>
Dactylorhiza	<i>Dactylorhiza incarnata</i>	25	0,081	<i>Orchideaceae (terresztris)</i>
Dactylorhiza	<i>Dactylorhiza fuchsii</i>	17	0,055	<i>Orchideaceae (terresztris)</i>
Lobosporangium	unidentified	9	0,029	<i>Mortierellomycota</i>
Himantoglossum	<i>Himantoglossum hircinum</i>	6	0,019	<i>Orchideaceae (terresztris)</i>
Valsa	<i>Valsa mali</i>	4	0,013	<i>Ascomycota</i>
Neocallimastix	unidentified	3	0,01	<i>Neocallimastigomycota</i>
Asphodeline	<i>Asphodeline taurica</i>	2	0,006	<i>Asphodelaceae</i>
Cercomonas	<i>Cercomonas longicauda</i>	2	0,006	<i>Algae</i>
Cercomonas	<i>Cercomonas sp.</i>	2	0,006	<i>Algae</i>
Fusarium	<i>Fusarium oxysporum</i>	2	0,006	<i>Ascomycota</i>
Penicillium	<i>Penicillium sp.</i>	2	0,006	<i>Ascomycota</i>
Aspergillus	<i>Aspergillus oryzae</i>	1	0,003	<i>Ascomycota</i>
Cephalanthera	<i>Cephalanthera austiniiae</i>	1	0,003	<i>Orchideaceae (terresztris)</i>
Colpodida	<i>Colpodida sp.</i>	1	0,003	<i>Protozoa</i>
Dactylonectria	<i>Dactylonectria torresensis</i>	1	0,003	≡ <i>Ilyonectria torresensis</i> , <i>Ascomycota</i>
Dendrobium	<i>Dendrobium catenatum</i>	1	0,003	<i>Orchidea (epifita)</i>
Ditylenchus	<i>Ditylenchus destructor</i>	1	0,003	<i>Nematode</i>
Erysiphe	<i>Erysiphe pulchra</i>	1	0,003	<i>Ascomycota</i>
Eucalyptus	<i>Eucalyptus alba</i>	1	0,003	<i>Myrtaceae</i>
Heteromita	<i>Heteromita sp.</i>	1	0,003	<i>Algae</i>
Kniphofia	<i>Kniphofia uvaria</i>	1	0,003	<i>Asphodelaceae</i>
Koelreuteria	<i>Koelreuteria sp.</i>	1	0,003	<i>Sapindaceae</i>
Kraken	<i>Kraken carinae</i>	1	0,003	<i>Cercozoa, amoebae</i>
Leohumicola	<i>Leohumicola sp.</i>	1	0,003	<i>Ascomycota</i>
Medeolaria	<i>Medeolaria sp.</i>	1	0,003	<i>Ascomycota</i>
Meliniomyces	<i>Meliniomyces sp.</i>	1	0,003	<i>Ascomycota</i>
Orchis	<i>Orchis quadripunctata</i>	1	0,003	<i>Orchideaceae (terresztris)</i>
Paracercomonas	<i>Paracercomonas sp.</i>	1	0,003	<i>Cercozoa</i>
Pedospumella	<i>Pedospumella encystans</i>	1	0,003	<i>Algae</i>
Penicillium	<i>Penicillium corylophilum</i>	1	0,003	<i>Ascomycota</i>
Phalansterium	<i>Phalansterium sp.</i>	1	0,003	<i>Flagellata, amoebosoa</i>
Rhizoctonia	<i>Rhizoctonia solani</i>	1	0,003	<i>Basidiomycota</i>
Rubus	<i>Rubus allegheniensis</i>	1	0,003	<i>Rosaceae</i>
Saitoella	<i>Saitoella complicata</i>	1	0,003	<i>Ascomycota</i>
Tetracladium	<i>Tetracladium marchalianum</i>	1	0,003	<i>Ascomycota</i>

Nemzetség	Faj	szám	ab*	Taxon
Tetracladium	<i>Tetracladium sp.</i>	1	0,003	<i>Ascomycota</i>
Thaumatomonas	<i>Thaumatomonas coloniensis</i>	1	0,003	<i>Cercozoa</i>
Thaumatomonas	<i>Thaumatomonas sp.</i>	1	0,003	<i>Cercozoa</i>
Trichoderma	<i>Trichoderma reesei</i>	1	0,003	<i>Ascomycota</i>
Tulasnella	<i>Tulasnella sp.</i>	1	0,003	<i>Basidiomycota</i>
Cryptococcus	<i>Cryptococcus neoformans</i>	1	0,003	<i>Basidiomycota</i>

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 austiniiae*, *Orchis quadripunctata*, *Dendrobium catenatum*) DNS szekvenciája. Ezek az eredmények valószínűleg az *Orchidaceae* családon belüli DNS szakasz hasonlóságoknak tudhatók be. A 10. táblázatban található, összes többi, szintén bázissorrend hasonlóságok alapján (jóval alacsonyabb abundanciával) megjelenő taxon szintén rendkívül bizonytalan, a zárwatermők esetében pedig teljességgel kizárható a jelenlétük.

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. adriaticum*nak. 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 baktésztát 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. Talajbéli 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-előállítás 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.

A 8. táblázatban *Dactylonectria torresensis*-ként megjelenő *Ascomycota* gombafaj szinonim neve: *Ilyonectria torresensis*. Ez azért igen lényeges, mert a Petri-csészében kitenyésztett, majd DNS szekvencia által a BIOMI-ban meghatározott faj is az *Ilyonectria* genus tagja volt, melyet fajszinten legvalószínűbbnek *Ilyonectria robusta*-ként azonosították. 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.

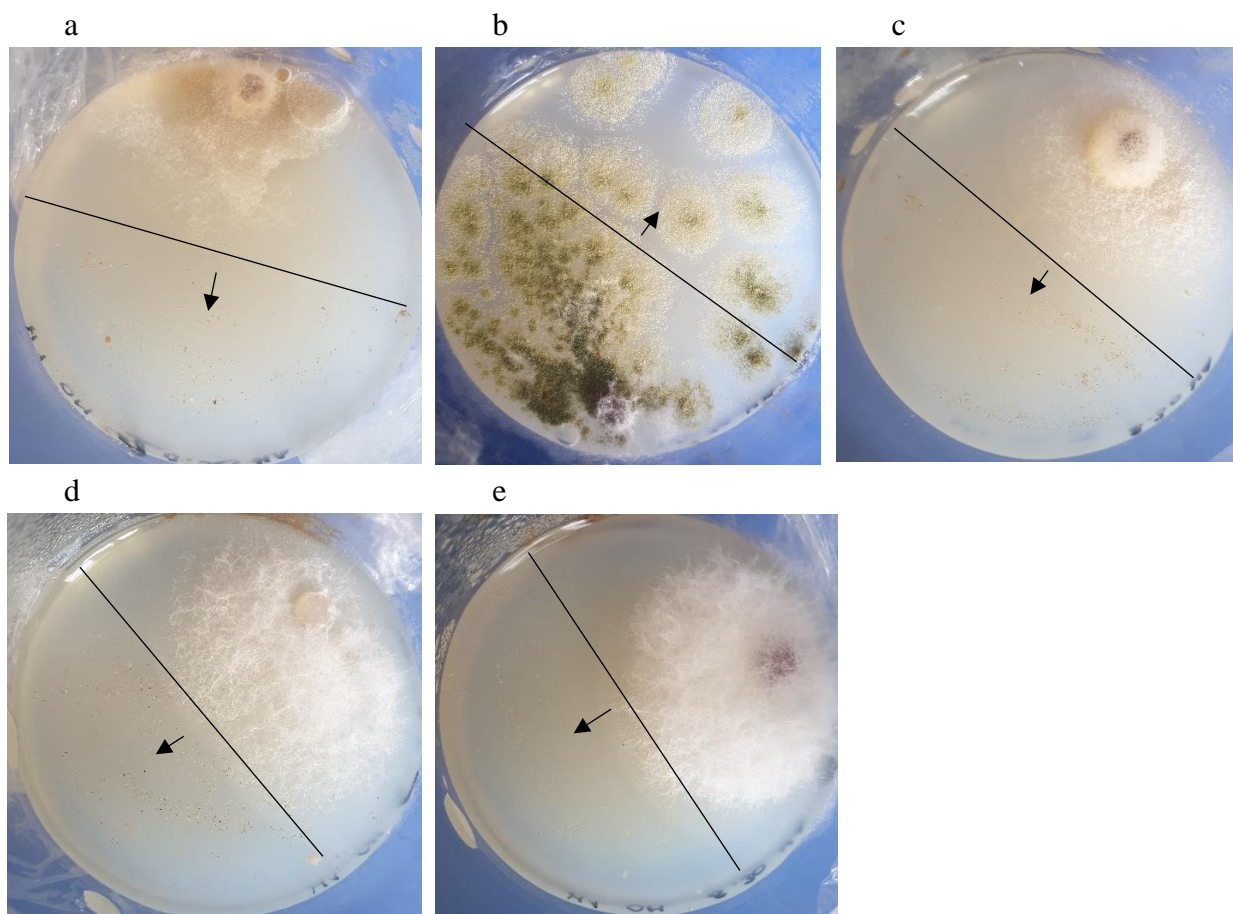
4.4. A *H. adriaticum* magok szimbiotikus csíráztatási és nevelési kísérleteinek eredményei

A *H. adriaticum* szimbiotikus csíráztatási és nevelési kísérletei során az öt különböző, Petri-csészékben *H. adriaticum* gyökérből kitenyésztett gombafaj és a *H. adriaticum* magok H1 zabpelyhes táptalajon megfigyelt egymásra hatását, valamint a magok állapotának változását 1 héttel, 2 héttel, 1, 2 és 3 hónappal a gombák táptalajra oltása után az 51-55. ábrák szemléltetik.

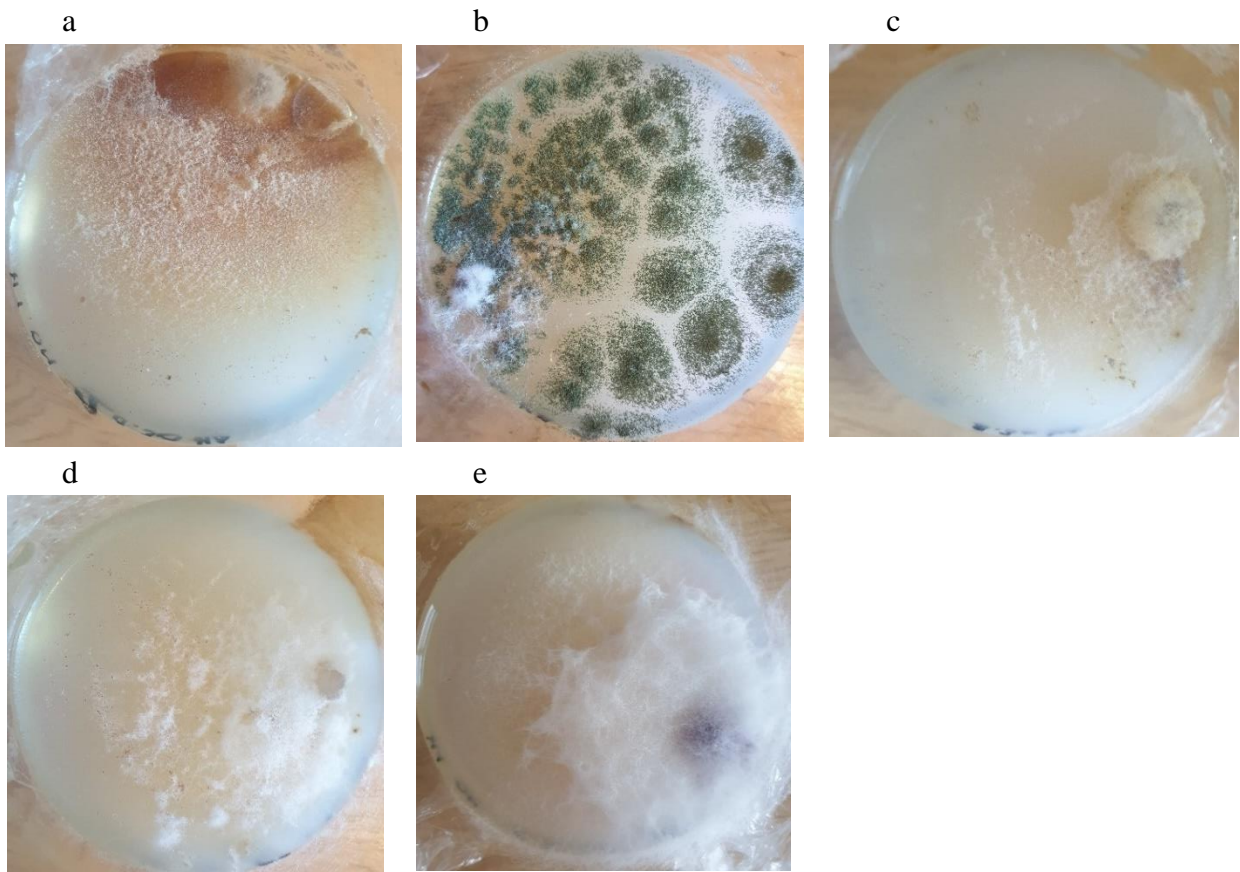
Az 51.a-e ábrákon jól látszik, hogy a „B” gombán kívül a többi faj 1 hét alatt nem, vagy csak épphogy elérte a táptalaj középvonalát, ahol találkozni tudott a *H. adriaticum* magokkal.

Az 52.a-e ábrán látható, hogy 2 hét alatt mind az öt gombafaj átért a táptalaj középvonalán és elérték a *H. adriaticum* magokat. A magok és a gombák között interakció ennyi idő után még nem volt megfigyelhető.

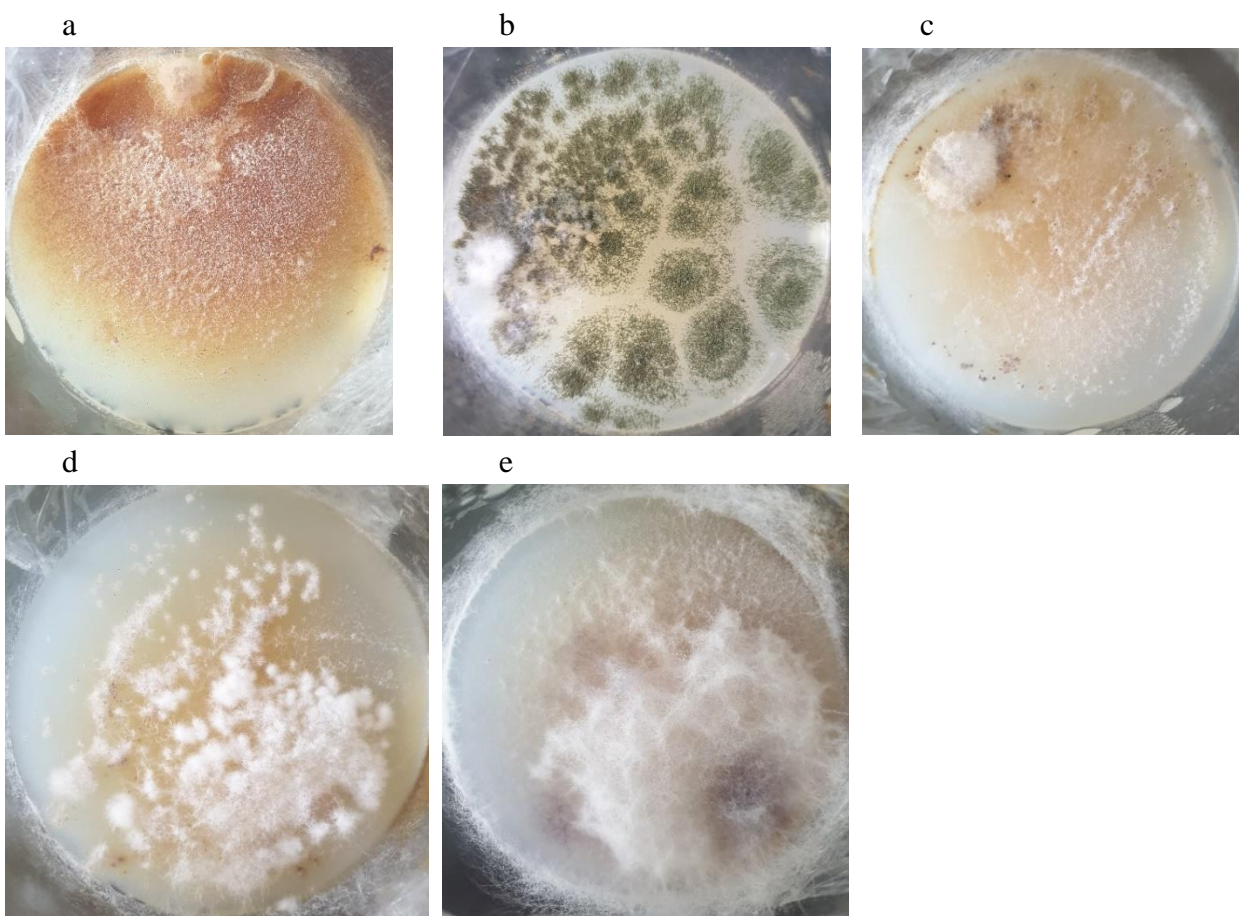
Az 53.a-e ábrán már látható, hogy 1 hónappal a *H. adriaticum* magok mellé oltása után a gombafajok teljesen átszőtték a táptalaj felszínét, de a magokon változás még továbbra sem volt megfigyelhető.



51.a-e ábra A kitenyésztett gombafajok 1 héttel a *H. adriaticum* magokat tartalmazó H1 zabpelyhes táptalajon. A vonal és nyíl iránya a *H. adriaticum* magok elhelyezkedését mutatja a táptalajon.



52.a-e ábra A gombafajok 2 hét után elérték a *H. adriaticum* magokat, de interakció még nincs

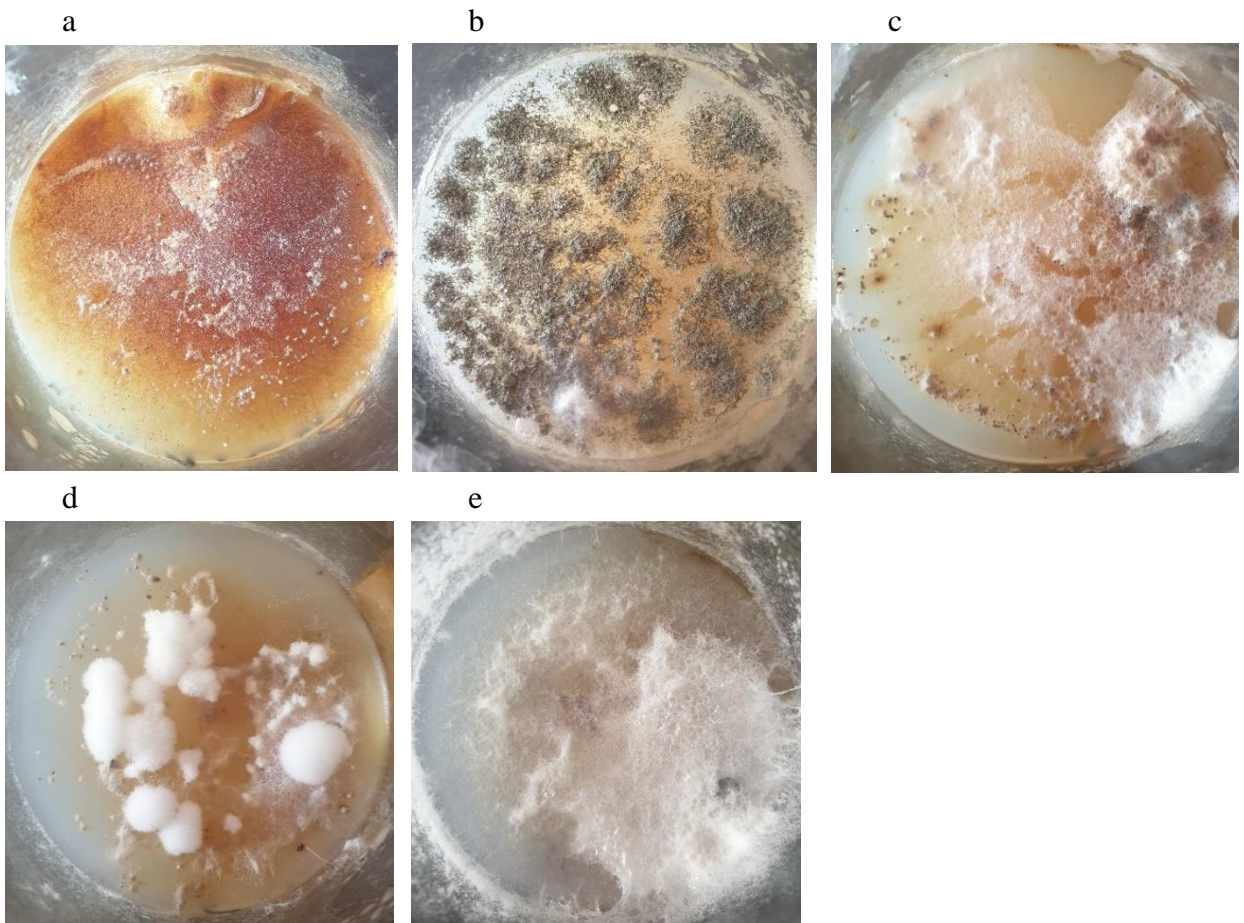


53.a-e ábra A gombafajok állapota 1 hónappal a *H. adriaticum* magokat tartalmazó H1 zabpelyhes táptalajon. Interakció még nincs.

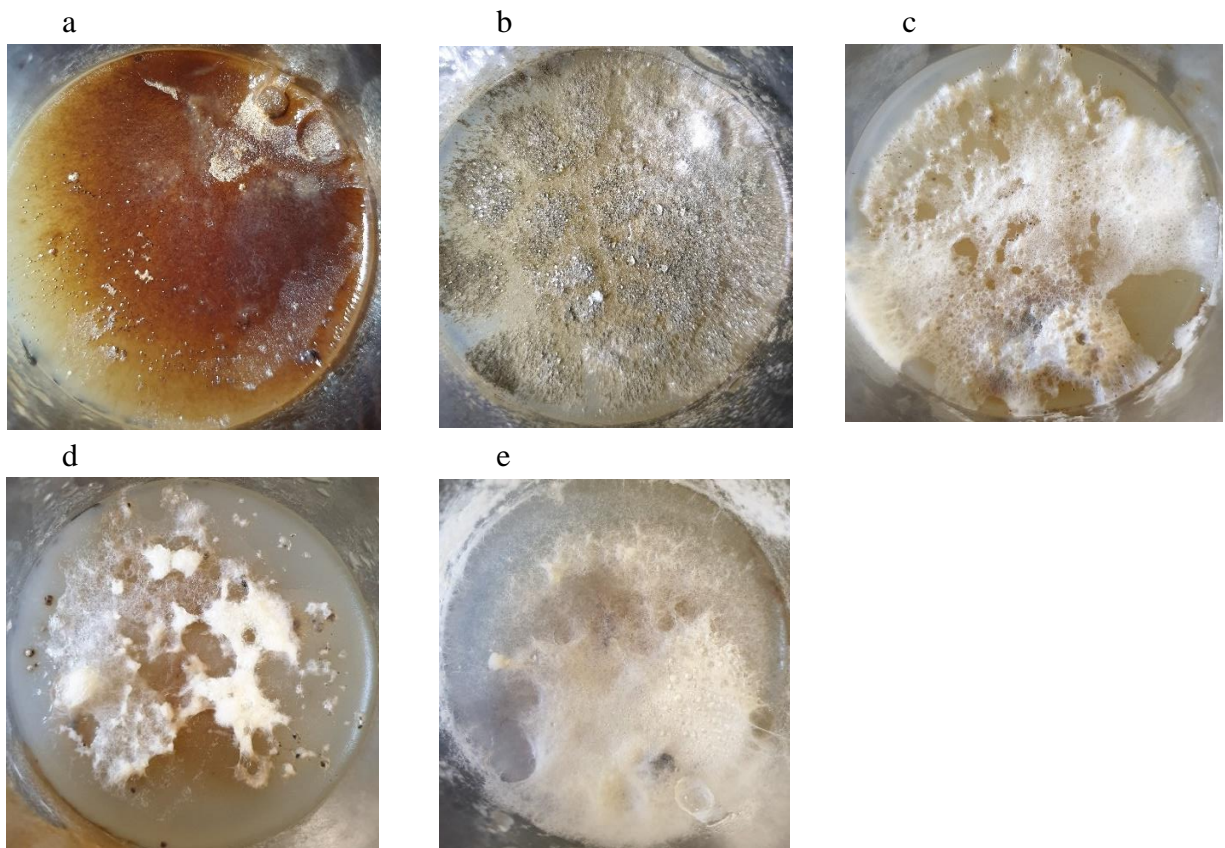
2 hónappal a gombák magok mellé oltása után a gombák tovább növekedtek (54.a-e ábra). A gombafajok a magokkal továbbra sem kerültek interakcióba.

3 hónappal a gombák táptalajra oltása utáni állapotok az 55. ábrán láthatók. Az egyes fajok továbbra sem léptek interakcióba az orchidea magokkal. A magok állapotai az egyes gombák mellett, 3,5 hónappal a magvetés után az 56. ábrán láthatók. Az „E” gombafaj esetében a hifa teljesen beszótt a táptalajt és fölé nőtt a magoknak, így azok a mikroszkópos képen nem láthatók. Interakció ekkor még mindig nem volt észlelhető.

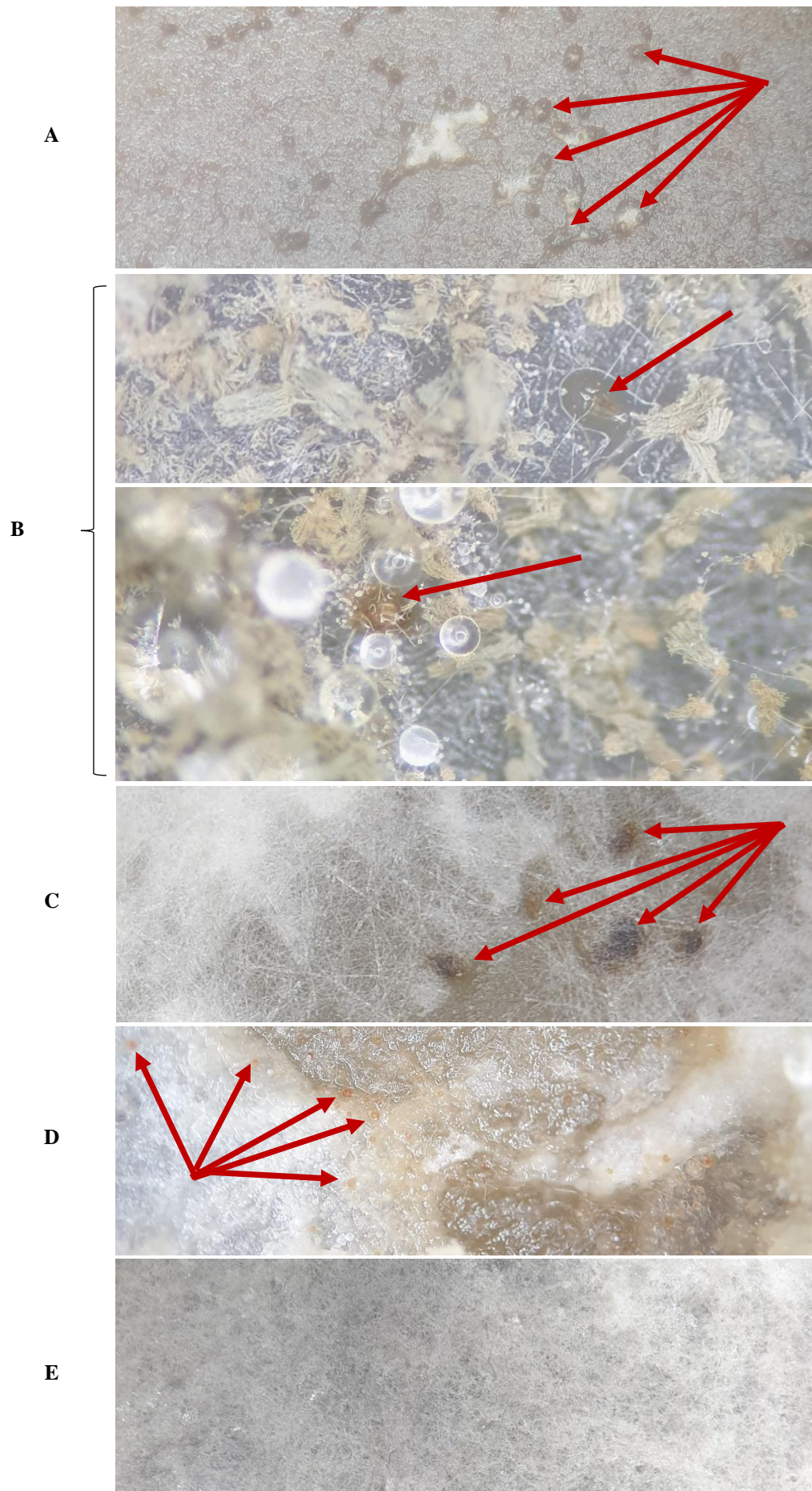
4 hónappal a gombák táptalajra oltása után kijelenthetjük, hogy az ötből egyik kitenyészett gombafaj sem indította be a *H. adriaticum* magok csírázását H1 zabagar táptalajon, tehát ezek a fajok a mi kísérleti körülményeink között biztosan nem lettek szimbionta gombapartneri a fajnak.



54. ábra *A* gombafajok állapota 2 hónappal a *H. adriaticum* magokat tartalmazó H1 zabpelyhes táptalajon.
Interakció még nincs.



55. ábra *A* gombafajok állapota 3 hónappal a *H. adriaticum* magokat tartalmazó H1 zabpelyhes táptalajon.
Interakció még nincs.



56. ábra *H. adriaticum* magok állapota 2,5 hónappal a magvetés után mikroszkóp alatt.
A nyilak a magokra mutatnak.

4.5. 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 (57. ábra), 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 és az értékes eredmény az lesz, hogy a telet átvészelik-e, és ha igen, tavasszal hány leveles hajtás lesz rajtuk megfigyelhető.

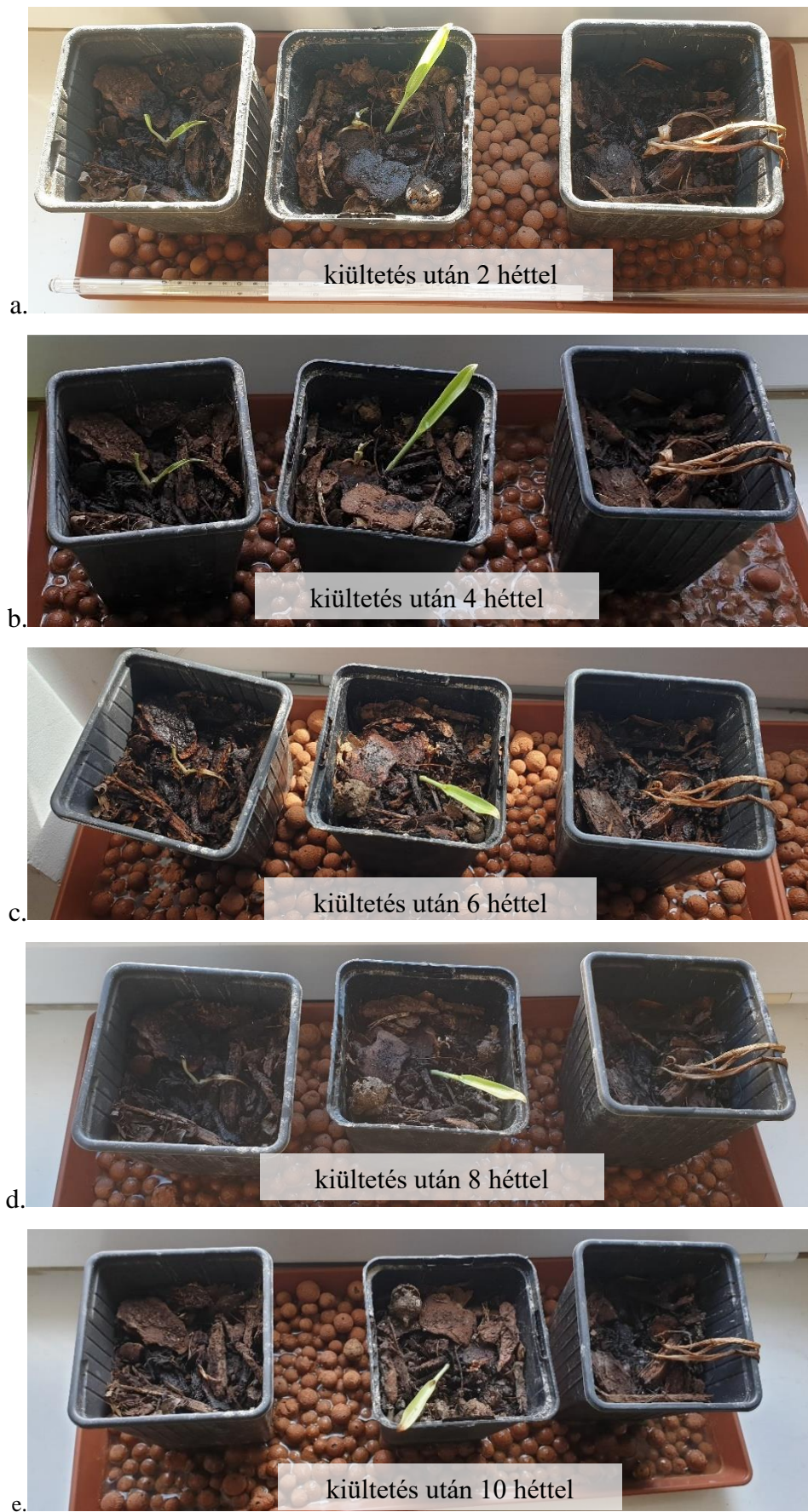


57. ábra A természetes élőhelyről hozott talajba kiültetett *H. adriaticum* egyedek 1,5 hónappal a kiültetés után

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 (58.a-d ábra), míg a folyékony MFA táptalajjal öntözött cserepekben 10 hétig bírták a kiültetett *H. adriaticum* egyedek (59.a-e ábra). 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), amilyeneket az Egyetemen sajnos nem tudtam biztosítani nekik.



58.a-d ábra: A kiültetett, majd Greenman Floraria szerrel öntözött kísérleti egyedek állapota kiültetés után 2, 3, 4 illetve 6 héttel



59.a-e ábra A kiültetett, majd folyékony MFA táptalajjal öntözött kísérleti egyedek állapota kiültetés után 2, 4, 6, 8, illetve 10 héttel

4.6. 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 csírának 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.

5. 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 2.6.3. alfejezetében bemutatott, VAN WAES (1984), VAN WAES és DEBERGH (1986b) 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 40 ml 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) magasabb 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 kitenyésztetni 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 fajával, 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.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Magyarország területéről 67 orchideafajt írtak már le, melyek közül néhány előfordulásáról több, mint 10-50 éve nincs adat, ez alapján ezek a fajok Magyarország területéről eltűntnek, illetve kipusztultnak tekinthetők. A klímaváltozás hatására, valamint az ember környezetformáló tevékenysége miatt világszerte, így hazánkban is rohamosan csökken a veszélyeztetett fajok populációinak nagysága, így minél hamarabb szükség van a védelmük lehetőségeinek kidolgozására és megvalósítására.

A dolgozatom cél faja, a *Himantoglossum adriaticum*, egy fokozottan védett, Natura2000 jelölő, adriato-mediterrán, mérsékelt égövi orchideafaj. Magyarországon mindössze 5 területen: a Keszthelyi-hegységben, a Sümeg-Tapolcai-háton, a Bakonyban, a Kőszegi-hegységben és a Soproni-hegységben ismertek kisebb-nagyobb, viszonylag stabil állományai. Korábbi kutatásaim során sikerült a fajt a módosított Fast táptalaj alap pH-ján (pH 5,5) csíráztatni (1,3% csírázási arány), valamint *in situ* csírázott protokormokból a bazídiumos gombák közül a *Tulasnellaceae* és a *Telephoraceae* családot, mint lehetséges szimbionta gombapartnerként sikerült molekuláris genetikai vizsgálatokkal azonosítani.

Doktori disszertációm célja a *H. adriaticum in vitro* aszimbiotikus csíráztatási lehetőségének és csírázási sikerének meghatározása a pH gradiens mentén, a *H. adriaticum* számára a táptalaj optimális kálium-klorid és ammónium-nitrát mennyiségének meghatározása, illetve a táptalajhoz adott kókuszvíz és ezüst-nitrát hatásainak vizsgálata a csíranövények és magok fejlődésére, továbbá a *H. adriaticum* gombapartnerének izolálása és kitenyésztése gyökérből, majd a faj magjainak szimbiotikus csíráztatási lehetőségeinek megkísérlése, és az *in vitro* nevelt *H. adriaticum* növények életképességének megfigyelése az általunk kevert, illetve a faj élőhelyéről hozott talajba kiültetve.

Kísérleteink során bebizonyosodott, hogy a *Himantoglossum adriaticum* magjainak csírázása számára a módosított Fast táptalaj pH 6,5 és pH 7,5 között a legjobb, ezen csíráznak a leghamarabb, és legmagasabb arányban a magok (6 hónap, 4%).

Megállapítottuk, hogy a *H. adriaticum* magjainak számára a módosított Fast táptalaj optimális KCl mennyisége 280 mg/1200 ml, míg az optimális NH_4NO_3 mennyisége 40 mg/1200 ml optimalizált, 7-es pH mellett. Kísérleteink igazolták, hogy a *Himantoglossum adriaticum* protokormjai számára az optimális táptalajhoz adott 4 mg/1200 ml ezüst-nitrát és 25 ml kókuszvíz együttesen látványosan serkenti a csíranövények növekedését.

Világossá vált, hogy az *in vitro* nevelt növények számára a tartási körülmények megteremtése a legnehezebb feladat, valamint, hogy elég egy nagyon kicsi elváltozás is az optimálistól, az egész *in vitro* nevelt populáció gyors hanyatlásnak indul.

Kísérleteink alapján sem PDA, sem benomilos és bengálrózsás maláta agaron nem sikerült bazídiumos gombát kitenyészteni, így ilyen szempontból az általunk alkalmazott kitenyészteszmód láthatóan nem megfelelő. A molekuláris genetikai vizsgálatok taxonómiaiag nagyon megbízhatatlan eredményeket hoztak, mivel több olyan faj is megjelent a DNS szekvencia egyezésekben, amelyek biztos, hogy nem lehettek jelen a területen és olyanok is, amelyek a szakirodalom szerint elvileg előfordulhatnak a *H. adriaticum* gyökereiben. Ilyen az a három bazídiumos gombafaj – a *Rhizoctonia solani*, a *Tulasnella* sp. és a *Cryptococcus neoformans* is, amelyeket a szekvenálás jelzett. Összevetve a korábbi, protokorból történt izolálási eredményeinkkel, kijelenthető, hogy a *Tulasnella* nemzetség faja az általunk vizsgáltatott mintabeli alacsony abundanciája ellenére jelen lehetett a *Himantoglossum adriaticum* gyökerében. akár szimbiota partnerként is. A szintén nagyon alacsony abundanciával megjelenő *Rhizoctonia solani* illetve a *Cryptococcus neoformans* pedig a szakirodalom alapján szintén valószínűsíthető, hogy jelen lehetett és akár szintén szimbiota gyökérkapcsoltságban állhat az általunk vizsgált növényegyeddel.

Az *in vitro* szimbiotikus csíráztatás annak okán, hogy nem sikerült agaron bazídiumos gombát felszaporítani, sikertelennek bizonyult. A felszaporított aszkuszos gombák egyike sem indította be a zabagaron a *H. adriaticum* magok csírázását. Ez arra utal, hogy valószínűleg ezek a fajok vagy nem mikorrhizálnak a *H. adriaticummal*, de az is lehet, hogy az általunk alkalmazott táptalajon nem tudott kialakulni ez a szimbiotikus kapcsolat.

Az egyénileg összeállított ültetőközegbe kiültetett, *in vitro* nevelt *H. adriaticum* növények a Greenman Floraria koncentrált multimikrobiális készítménnyel öntözve 6 hétig, a folyékony módosított Fast táptalajjal öntözve pedig 10 hétig maradtak életben. A természetes élőhelyről hozott talajba ültetett egyedek jövőjéről remélhetőleg 2020 tavaszától tudunk majd információkkal szolgálni.

Jelenleg további kísérleteink is folynak, a jövőben pedig szeretnénk minél több hazai orchideafajt bevonni a kutatásainkba, és végül egy átfogó tanulmányt írni Magyarország orchideáinak *in vitro* szaporítási lehetőségeiről. Emellett további kísérleteket szeretnénk folytatni a *H. adriaticum* kiültetésével kapcsolatban.

7. SUMMARY

Until now, 67 orchid species have been described in Hungary, although some of them have not been found since more than 10-50 years. Thus, these species can be considered as forbidden or extinct in Hungary. Due to the effects of climate change and human activities in the environment, the populations of endangered species are rapidly decreasing worldwide, therefore it is necessary to develop and elaborate the possibilities of their protection as soon as possible.

The target species of my dissertation, *Himantoglossum adriaticum*, is a highly protected, Natura2000, Adriatic-Mediterranean, temperate, terrestrial orchid species. In Hungary, there are smaller or larger, relatively stable populations known in only five areas namely in the Keszthelyi-Mountains, the Sümeg-Tapolcai Banks, the Bakony-Mountains, the Kőszegi-Mountains and in the Sopron-Mountains. In my previous research, the seeds of this species germinated at the basic pH (pH 5,5) of modified Fast medium (1,3% germination rate), and from *in situ* germinated protocorms, the *Tulasnellaceae* and the *Telephoraceae* families were isolated as possible symbiotic fungal partners by molecular genetic testing.

The aims of my doctoral dissertation were to determine the possibility of an *in vitro asymbiotic* germination and the germination success of *Himantoglossum adriaticum* along the pH gradient, to determine the optimal potassium-chloride and ammonium-nitrate content of the modified Fast medium for *H. adriaticum* seeds, and to determine the effects of coconut water and silver nitrate on the growth of *H. adriaticum* seedlings and seeds. Furthermore, my aim was to isolate and cultivate the fungal partners of *H. adriaticum* from a root sample, and to try the symbiotic germination of *H. adriaticum* seeds with these cultivated fungi. Lastly to monitor the viability of *H. adriaticum* seedlings and plants grown in the flasks, and the viability of the plants after planting them out either into an individually prepared mixture of planting medium or into the soil of the natural habitat of the species.

Our experiments have shown that the optimum pH of modified Fast medium for germination of *Himantoglossum adriaticum* seeds is between 6,5 and 7,5. The germination of seeds are the fastest and highest between these two pHs (6 months, 4%).

Our results showed that the optimal KCl amount of modified Fast medium for *Himantoglossum adriaticum* seeds was 280 mg/1200 ml and the optimal NH₄NO₃ amount was 40 mg/1200 ml on pH 7. Our experiments proved that 4 mg/1200 ml silver nitrate and 25 ml/1200 ml of coconut water added together to the optimal modified Fast medium of *Himantoglossum adriaticum*, stimulated the growth of the seedlings spectacularly. It became clear that maintaining the best conditions for the plants in the flasks is one of the most difficult task, and we proved, that even a very small change from the optimum conditions can be enough for the entire flask-grown population to begin to decline rapidly.

According to our experiments, we could not cultivate basidiomycetes neither on PDA nor on malt agar with benomil and malt agar with bengal rose, so from this point of view this cultivation method does not seem appropriate.

Molecular genetic testing have given taxonomically very unreliable results, as several species DNA sequencing matches have appeared that definitely can not be present in the area, and those as well, which, according to the literature, may be found in *H. adriaticum* roots. Such as the three basidiomycete species, *Tulasnella* sp., *Rhizoctonia solani* and *Cryptococcus neoformans*, which have appeared as a result of sequencing. Compared to our previous isolation results from the protocorms, it can be stated that the *Tulasnella* genus was present in the root of the *Himantoglossum adriaticum* too, and despite the low abundance of the sample we may consider it as a symbiotic partner. *Rhizoctonia solani* and *Cryptococcus neoformans*, also appeared with very low abundance, but they are also likely to be present according to literature, and they can possibly be in a symbiotic association with *H. adriaticum*.

In vitro symbiotic germination, due to failure of cultivating basidiomycetes on the agar we used; was unsuccessful. None of the cultivated ascomycetes induced germination of *H. adriaticum* seeds on H1 oat medium symbiotically. This indicates that these species probably do not have mycorrhizal relationship with *H. adriaticum*, but it is also a possibility, that this symbiotic relationship could not be established with the medium we used.

H. adriaticum plants grown in flasks and planted individually in the prepared planting medium survived for 6 weeks with Greenman Floraria concentrated multimicrobial preparation and 10 weeks when they were watered with Fast liquid medium. Hopefully we will be able to provide information about the viability of the species planted in the soil of their natural habitat in spring 2020.

We are currently conducting further experiments as well. In the future we would like to include more orchid species found in Hungary in our research and finally write a comprehensive study on the *in vitro* propagation possibilities of Hungarian orchids. In addition, we would like to conduct further experiments on the transplantation of *H. adriaticum*.

8. MELLÉKLETEK

1.sz. melléklet:

IRODALOMJEGYZÉK

- ACKERMANN, J.D. (1989): Limitations of sexual reproduction in *Encyclia krugii* (Orchidaceae). *Systematic Botany*. 14: 101-109. p.
- AIZEN, M.A., ASHWORTH, L., GALETTO, L. (2002): Reproductive success in fragmented habitats: do compatibility systems and pollination specialization matter? *Journal of Vegetation Science*. 13: 885-92. p.
- ALEXANDER, C., HADLEY, G. (1983): Variation in symbiotic activity of *Rhizoctonia* isolates from *Goodyera repens* mycorrhizas. *Transactions of the British Mycological Society*. 80: 99-106. p.
- ARDITTI J (1967): Factors affecting the germination of orchid seed. *The Botanical Review* 33: 1-97. p.
- ARDITTI, J. (1982): Orchid seed germination and seedling culture - a manual. In: J. Arditti (szerk.): *Orchid Biology: reviews and perspectives, III*. Cornell University Press, Ithaca. 243-370. p.
- ARDITTI, J., ERNST, R. (1984): Physiology of germinating orchid seeds. In: Arditti, J. (szerk.): *Orchid Biology: reviews and perspectives, III*. Cornell University Press, Ithaca. 177-222. p.
- ATWOOD, J. T. (1986): The size of the *Orchidaceae* and the systematic distribution of epiphytic orchids. *Selbyana*. 9(1) 171-186. p.
- BAQUE MD.A., SHIN, Y.K., ELSHMARI, T., LEE, E.J., PAEK, K.Y. (2011): Effect of light quality, sucrose and coconut water concentration on the microporpagation of *Calanthe* hybrids ('Bukduseong' × 'Hyesung' and 'Chunkwang' × 'Hyesung'). *Australian Journal of Crop Sciences*. 5(10): 1247-1254 p.
- BARMAN, D., DEVADAS, R. (2013): Climate change on orchid population and conservation strategies: a review. – *Journal of Crop and Weed*. 9: 1-12. p.
- BATTY. A.L., KINGSLEY DIXON, W., BRUNDRETT, M.C., SIVASITHAMPARAM, K. (2002): Orchid conservation and mycorrhizal associations. In: Sivasithamparam K., Dixon K. W., Barrett R. L. (szerk.) *Microorganisms in Plant Conservation and Biodiversity*. *Kluwer Academic Publishers*. 195–226. p.
- BENGTSSON-PALME, J., RYBERG, M., HARTMANN, M., BRANCO,S., WANG, Z., GODHE, A., DE WIT, P., SÁNCHEZ-GARCÍA, M., EBERSBERGER, I., DE SOUSA, F., AMEND, A., JUMPPONEN, A., UNTERSEHER, M., KRISTIANSOON, E., ABARENKOV, K., BERTRAND, Y.J.K., SANLI, K., ERIKSSON, K.M., VIK, U., VELDRE, V., NILSSON, R.H. (2013): Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data. *Methods in Ecology and Evolution*. 4(10): 914-919. p. DOI: <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12073>
- BERNARD, N (1899): Sur la germination du *Neottia nidus-avis*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris*. 128: 1253-1255. p.
- BERNARD, N. (1909). L'evolution dans la symbiose. Les orchidees et leur champignons commenseux. *Annales des Sciences Naturelles. Botanique*. 9: 1-196. p.
- BEYER, M.A. (1976): A potent inhibitor of ethylene action in plants. *Plant Physiol*. 58(3): 268-271. p.

- BEYRLER, H., PENNINGSFIELD, F., HOCK, B. (1991): The role of nitrogen concentration in determining the outcome of the interaction between *Dactylorhiza incarnata* (L.) SOÓ and *Rhizoctonia* sp. *New Phytol.* 117: 665-672. p.
- BEYRLER, H.F., SMITH, S.E., FRANCO, C.M.M., PETERSON, R.L. (1995): Colonization of *Orchis morio* protocorms by a mycorrhizal fungus: Effects of nitrogen nutrition and glyphosate in modifying the responses. *Canadian Journal of Botany.* 73(8): 1128–1140. p. <https://doi.org/10.1139/b95-123>
- BIDARTONDO, M.I., BIRGHARDT, B., GEBAUER, G., BRUNS, T. D., READ, D. J. (2004): Changing pattern in the dark; isotopic and molecular evidence of ectomycorrhizal liaisons between forest orchids and trees. *Proc R Soc Lond B.*, 271: 1799–1806. p.
- BIRÓ, É., BÓDIS, J., NAGY, T., TÖKÖLYI, T., MOLNÁR V., A. (2014): Honeybee (*Apis mellifera*) mediated increased reproductive success of a rare deceptive orchid. *Applied Ecology and Environmental Research.* 13(1): 181-192. p.
- BLAKEMAN, J.P., MOKAHEL, M.A., HADLEY, G. (1976): Effect of mycorrhizal infection on respiration and activity of some oxidase enzymes of orchid protocorms. *New Phytologist.* 77(3): 697–704. p. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1976.tb04663.x>
- 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.
- BÓDIS, J., SRAMKÓ, G., ÓVÁRI, M., MOLNÁR V., A (2011): Adriaai 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.
- BROWN, D.C.W., LEUNG, D.W.M., THORPE, T.A. (1979): Osmotic requirement for shoot formation in *Tobacco callus.* *Physiol. Plant.* 46: 36-41. p.
- BURGEFF, H (1909): Die Wurzelpilze der Orchideen, ihre Kultur und ihre Leben in der Pflanze, G. Fischer Verlag, Jena, 202. p.
- BURGEFF, H. (1936): Samenkeimung der Orchideen. Gustav Fischer Verlag, Jena, 312. p.
- CANADELL, J., NOBLE, I. (2001): Challenges of a changing earth. *Trends in Ecology and Evolution.* 16: 664-666. 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.
- CHAVERRI, P., SALGADO, C., HIROOKA, Y., ROSSMAN, A.Y., SAMUELS, G.J. (2011): Delimitation of *Neonectria* and *Cylindrocarpon* (*Nectriaceae*, Hypocreales, Ascomycota) and related genera with *Cylindrocarpon*-like anamorphs. *Stud. Mycol.* 68: 57–78. p.

- CHEN, I.C., HILL, J.K., OHLEMULLER, R., ROY, D.B., THOMAS, C.D. (2011): Rapid range shifts of species associated with high levels of climate warming. *Science*. 333: 1024-26. p. DOI: 10.1126/science.1206432.
- CHEN, J., GOODALE, U.M., FAN, X.-L., GAO, J.-Y. (2015): Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Paphiopedilum spicerianum*: An orchid with an extremely small population in China. *Global Ecology and Conservation*, 3: 367-378. p. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2015.01.002>
- CHI, G.L., PUA, E.C. (1989): Ethylene inhibitors enhanced de novo shoot regeneration from cotyledons of *Brassica campestris* ssp. *chinensis* (Chinese cabbage) *in vitro*. *Plant Sci*. 64(2): 243-250. p. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(89\)90030-7](https://doi.org/10.1016/0168-9452(89)90030-7)
- CHOMICKI, G., BIDEL, L.P.R., MING, F., COIRO, M., ZHANG, X., WANG, Y., BAISSAC, Y., JAY-ALLEMAND, C., RENNER, S.S. (2014): The velamen protects photosynthetic orchid roots against UV-B damage, and a large dated phylogeny implies multiple gains and losses of this function during the Cenozoic. *New Phytol*. 205: 1330-1340. p. doi: 10.1111/nph.13106
- 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. (1988): Orchid mycorrhizal associations. *Lindleyana* 3: 73-86. 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.
- COATES, D.J., DIXON, K.W. (2007): Current perspectives in plant conservation biology. *Australian Journal of Botany*. 55: 187-193. p.
- COCHRANE, A., YATES, C.J., HOYLE, G.L., NICOTRA, A.B. (2014): Will among-population variation in seed traits improve the chance of species persistence under climate change? *Glob. Ecol. Biogeogr*. 24: 12-24. 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.
- COUMOU, D., RAHMSTORF, S. (2012): A decade of weather extremes. *Nature Climate Change*. 2: 491-96. p.
- CRIBB, P.J., KELL, S.P., DIXON, K.W., BARRETT, R.L. (2003): Orchid Conservation: A Global Perspective. In: Dixon, K.W., Kell, S.P., Barrett, R.L., Cribb, P.J. (szerk.) Orchid Conservation. Natural History Publications, Kota Kinabalu.
- CURRAH, R.S., ZELMER, C.D., HAMBLETON, S., RICHARDSON, K.A. (1997): Fungi from orchid mycorrhizas. In: Arditti, J., Pridgeon, A.M. (szerk.) Orchid Biology: Reviews and Perspectives, VII. 117-127. Kluwer academic Publishers: Dordrecht
- DE PAUW, M.A., REMPHREY, W.R. (1993): *In vitro* germination of three *Cypripedium* species in relation to time of seed collection, media, and cold treatment. *Canadian Journal of Botany*, 71(6): 879-885. p. <https://doi.org/10.1139/b93-100>
- DEARNALEY, J.D.W. (2007): Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza* 17: 475-486. p.

- DEARNALEY, J.D.W., MARTOS, F., SELOSSE, M.-A. (2012): Orchid mycorrhizas: molecular ecology, physiology, evolution and conservation aspects. In: Hock, B. (szerk) *Fungal Associations. The Mycota (A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research)*, vol 9. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30826-0_12
- DELFORGE, P. (2006): *Himantoglossum adriaticum*. In: *Orchids of Europe, North Africa and Middle East*. A&C Black, London. 356. p.
- DENISON, R.F., KIERS, E.T. (2011): Life histories of symbiotic Rhizobia and mycorrhizal fungi. *Current Biology*. 21: 775–785. p. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.06.018>
- DHINGRA, O.D., SINCLAIR, J.B. (1986): *Basic Plant Pathology methods*. CRC Press. 308. p.
- DIXON, K.W. (1989): Seed Propagation of Ground Orchids. – In: Dixon, K.W., Buirchell, B.J., Collins, M.J. (szerk.) *Orchids of Western Australia*. 2nd edn. Native Orchid Study and Conservation Group Inc, Victoria Park.
- DOSTALOVA, A., MONTAGNANI, C., HODÁLOVÁ, I., JOGAN, N., KIRÁLY, G., FERAKOVA, V., BERNHARDT, K.G. (2011): *Himantoglossum adriaticum*. – The IUCN Red List of Threatened Species 2011: e.T162219A5559772.
- DOWNIE, D.G. (1941): Notes on the germination of some British orchids. *Transactions of the Botanical Society of Edinburgh*. 33: 94-103. p.
- DOWNIE, D.G. (1949a): The germinations of *Goodyera repens* (L.) R.Br. in fungal extract. *Transactions of the Botanical Society of Edinburgh*. 35: 120-125. p.
- DOWNIE, D.G. (1949b): The germinations of *Listera ovata* (L.) R.Br. *Transactions of the Botanical Society of Edinburgh*. 33: 94-103. 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
- DRESSLER, R.L. (1981): *The orchids: natural history and classification*. Harvard Univ. Press, Cambridge. 332. p.
- EIBERG, H. (1970): Asymbiotik frospiring og kulturforsog hos nogle europaeiske jordorkideer. (Európai orchideák csírázási vizsgálatai aszimbiotikus táptalajon – dán nyelven). MSc thesis. University of Copenhagen: Plant Physiological Laboratory.
- ENGLER, R., RANDIN, C.F., THUILLER, W., DULLINGER, S., ZIMMERMANN, N.E., ARAÚJO, M.B., ... , GUISAN, A. (2011): 21st century climate change threatens mountain flora unequally across Europe. *Glob. Change Biol.* 17: 2330-2341. p.
- FAST, G. (1985): Zur Ökologie einiger mitteleuropäischer Waldorchideen unter besonderer Berücksichtigung der Bodenverhältnisse in Bayern. *Die Orchidee*. 36: 148-152. p.
- FAST, G., (1980): Vermehrung und Anzucht, In: Fast G. (szerk.) *Orchideenkultur, Botanische Grundlagen, Kulturverfahren, Pflanzenbeschreibungen*. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart
- FITTER, A.H., FITTER, R.S.R. (2002): Rapid changes in flowering time in British plants. *Science*. 296: 1689-1691. p.
- FORREST, J., THOMSON, J. (2011): An examination of synchrony between insect emergence and flowering in Rocky Mountain meadows. *Ecological Monographs*. 81: 469-491. p.

- FRANCO-DUARTE, R., ČERNÁKOVÁ, L., KADAM, S., KAUSHIK, K.S., SALEHI, B., BEVILACQUA, A., CORBO, M.R., ANTOLAK, H., DYBKA-STĘPIEŃ, K., LESZCZEWICZ, M., TINTINO, S.R., DE SOUZA, V.C.A., SHARIFI-RAD, J., COUTINHO, H.D.M., MARTINS, N., RODRIGUES, C.F. (2019): Advances in Chemical and Biological Methods to Identify Microorganisms—From Past to Present. *Microorganisms*. 7(5): 130. DOI: 10.3390/microorganisms7050130
- GARAY, L. (1960): On the origin of the *Orchidaceae*. *Bot. Mus. Leaflet*. 19: 57-96. p.
- GARIBYAN, L., AVASHIA, N. (2013): Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*. 133(3): 1-4. p. DOI: <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>
- GEORGE, E.F., SCHERRINGTON, P.D. (1984): Plant propagation by tissue culture. Handbook and directory for commercial laboratories. Exegetics LTD, Eversley, England.
- GILIÁN, L.D. (2012): A Dinnyési-fertő növényállományának felmérése az elzamajori kiszáradó lápréten. Szakdolgozat, Keszthely.
- GILIÁN, L.D. (2015): A *Himantoglossum adriaticum* magjainak életképesség vizsgálata, *in situ* és *ex situ* csíráztatása, valamint szimbionta gombapartnereinek molekuláris meghatározása. Diplomadolgozat, Keszthely.
- 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
- GIRIDHAR, P., OBUL REDDY, B., RAVISHANKAR, G.A. (2001): Silver nitrate influences *in vitro* shoot multiplication and root formation in *Vanilla planifolia* Andr. *Current Science*.81(9): 1166-1170. p.
- GIRLANDA, M., SELOSSE, M.A., CAFASSO, D., BRILLI, F., DELFINE, S., FABBIAN, R., GHIGNONE, S., PINELLI, P., SEGRETO, R., LORETO, F., COZZOLINO, S., PEROTTO, S. (2006): Inefficient photosynthesis in the Mediterranean orchid *Limodorum abortivum* is mirrored by specific association to ectomycorrhizal *Russulaceae*. *Molecular Ecology*.15: 491-504. p.
- GUSTAFSSON, A.L.S., VEROLA, C.F., ANTONELLI, A. (2010): Reassessing the temporal evolution of orchids with new fossils and a Bayesian relaxed clock, with implications for the diversification of the rare South American genus *Hoffmannseggella* (Orchidaceae: Epidendroideae). *BMC Evol. Biol.* 10: 177. p. doi:10.1185/1471-2148-10-177.
- HADLEY, G. (1970): Non-specificity of symbiotic infection in orchid mycorrhiza. *New Phytologist*. 69(4): 1015–1023. p. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1970.tb02481.x>
- HADLEY, G. (1982): Orchid mycorrhiza. in: Arditti J. (szerk.) *Orchid Biology, reviews and perspectives II*. Cornell University Press, Ithaca.
- HADLEY, G. (1984): Uptake of ¹⁴C glucose by asymbiotic and micorrhizal orchid protocorms. *New Phytol.* 96: 263-273.

- HADLEY, G., ONG, S.H. (1978): Nutritional requirements of orchid endophytes. *New Phytol.* 81: 561-569. p.
- HARVAIS, G. (1973): Growth requirements and development of *Cypripedium reginae* in axenic culture. *Canadian Journal of Botany.* 51: 327-332. p.
- HARVAIS, G. (1974): Notes on the biology of some native orchids of Thunder Bay, their endophytes and symbionts. *Canadian Journal of Botany.* 52: 451-460. p.
- HARVAIS, G. (1982): An improved culture medium for growing the orchid *Cypripedium reginae* axenically. *Canadian Journal of Botany.* 60: 2547-2555. p.
- HARVAIS, G., HADLEY, G. (1967): The development of *Orchis purpurella* in asymbiotic and inoculated cultures. *New Phytologist.* 66(2), 217–230. p. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1967.tb06000.x>
- HAYES, A.B. (1969): Observations on orchid seed mycorrhizae. *Mycopathologia et mycologia applicata.* 38(1-2). 139–144. p.
- 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
- HYNSON, N.A., SCHIEBOLD, J.M.-I., GEBAUER, G. (2016): Plant family identity distinguishes patterns of carbon and nitrogen isotope abundance and nitrogen concentration in mycoheterotrophic plants associated with ectomycorrhizal fungi. *Annals of Botany.* 118(3): 467–479. p.
- ILLYÉS, Z. (2011): Hazai lápi kosborfajok aktív védelmét megalapozó élőhelyi és laboratóriumi vizsgálatok, különös tekintettel a hagymaburok (*Liparis loeselii*) és a tőzegorchidea (*Hammarbya paludosa*) fajokra. Doktori értekezés. Eötvös Loránd Tudományegyetem, Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszék, Budapest
- ILLYÉS, Z., OUANPHANIVANH, N., RUDNÓY, SZ., BRATEK, Z. (2012): Orchids in the Carpathian Basin and their Mycorrhizal Associations. 15th European Orchid Congress, Budapest.
- IUCN. (1995): IUCN Red List Categories. Prepared by the IUCN Species Survival Commission. IUCN, Gland, Switzerland. ISBN: 2-8317-0277-1
- IUCN. (2001): IUCN Red List Categories and Criteria: Version 3.1. IUCN Species Survival Commission. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. ISBN: 2-8317-0633-5
- JACKSON, G., WEBB III, T., GRIMM, E.C., RUDDIMAN, W.F., WRIGHT JR, H. F. (1987): North America and adjacent oceans during the last deglaciation. *Geological Soc. Amer.* 3: 277-88. p.
- JANSSEN, T., BREMER, K. (2004): The age of major monocot groups inferred from 800+ rbcL sequences. *Bot. J. Linnean Soc.* 146: 385-398. p.
- JEŽEK, Z. 2005: Orchideák enciklopédiája. Ventus Libro Kiadó, Budapest.
- JOHNSTON, K M., SCHMITZ, O.J. (1997): Wildlife and climate change: assessing the sensitivity of selected species to simulated doubling of atmospheric CO₂. *Glob. Change Biol.* 3: 531-44. p.
- KELLER, G., SOÓ, R. (1930): Kritische Monographie. In: Keller R., Schlechter: Monographie und Iconographie der Orchideen Europas und des Mittelmeergebietes. Fedde, Berlin-Dahlem II: 472 p. (Újrakiadás, Königstein, 1972).
- KHAMCHATRA, N.-M, DIXON, K, CHAYAMARIT, K, APISITWANICH, S, TANTIWIWAT, S (2016): Using *in situ* seed baiting technique to isolate and identify endophytic and mycorrhizal

- fungi from seeds of a threatened epiphytic orchid, *Dendrobium friedericksianum* rchb.f. (*Orchidaceae*), *Agriculture and Natural Resources*. 50(1): 8-13. p. doi:10.1016/j.anres.2016.01.002.
- KINOSHITA, A., OGIURA-TSUJITA, Y., UMATA, H., SATO, H., HASHIMOTO, T., YUKAWA, T. (2016): How do fungal partners affect the evolution and habitat preferences of mycoheterotrophic plants? A case study in *Gastrodia*. *American Journal of Botany*.103(2): 207–220. p. <https://doi.org/10.3732/ajb.1500082>
- KIRÁLY G. (szerk.) (2009): Új magyar fűvészkönyv. Magyarország hajtásos növényei. Határozókulcsok. – Aggteleki Nemzeti Park Igazgatóság, Jósvalő
- KISHI, F., TAKAGI, K. (1997): Analysis of medium components used for orchid tissue culture. *Lindleyana* 12 (3): 158-161. p.
- KNUDSON, L (1922): Nonsymbiotic germination of orchid seed. *Botanical Gazette* 73, 1-25. p.
- KNUDSON, L (1946): A new nutrient solution for the germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin*. 15, 214-217. p.
- KOPOWITZ, H., LAVARACK, P.S., DIXON, K.W. (2003): The Nature of Threats to Orchid Conservation. In: Dixon, K.W., Kell, S.P., Barrett, R.L, Cribb, P.J. (szerk.) *Orchid Conservation*. Natural History Publications, Kota Kinabalu.
- KOTTKE, I., SUÁREZ, J.P., HERRERA, P., CRUZ, D., BAUER, R., HAUG, I., GARNICA, S. (2010): Atractiellomycetes belong to the ‘rust’ lineage (*Pucciniomycotina*) form mycorrhizae with terrestrial and epiphytic neotropical orchids. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 277: 1289–1298. p. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.1884>
- KÖRMENDY-RÁCZ, J. (2017): Passzív és aktív természetvédelem - hazai orchideák megporzása. *Méhészet* 2017/06
- KRESS, W.J. (1986): The systematic distribution of vascular epiphytes: an update. *Selbyana* 9: 2-22. p.
- LEAKE, J.R. (1994): The biology of myco-heterotrophic (‘saprophytic’) plants. *New Phytologist*. 127(2): 171–216. p. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1994.tb04272.x>
- LEE, Y.I. (2007): The asymbiotic seed germination of six *Paphiopedilum* species in relation to the time of seed collection and seed pretreatment. *Acta Horticulturae*, 755: 381–386. p. doi:10.17660/actahortic.2007.755.50
- LEE, Y.I., LEE, N., YEUNG, E.C., CHUNG, M.C. (2005): Embryo development of *Cypripedium formosanum* in relation to seed germination *in vitro*. *Journal of American Society Hort. Sci.* 130(5), 747-753. p.
- LEE, Y.I., YANG, C.K., GEBAUER, G. (2015): The importance of associations with saprotrophic non-*Rhizoctonia* fungi among fully mycoheterotrophic orchids is currently underestimated: novel evidence from subtropical Asia. *Annals of Botany*. 116(3): 423–435. p. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv085>
- LENOIR, J., GRÉGOUT, J.C., MARQUET, P.A., DE RUFFRAY, P., BRISSE, H. (2008): A significant upward shift in plant species optimum elevation during the 20th century. *Science*. 320(5884): 1768-1771. p.

- LIGHT, M.H.S. (1989): Germination in the *Cypripedium/Paphiopedilum* alliance; *Canadian Orchid Journal*, 5: 11-19. p.
- LUCKE, F. (1976): Erste Ergebnisse zur asymbiotischen Samenkeimung von *Himantoglossum hircinum*. *Die Orchidee*. (Hamburg) 27: 60-61. p.
- MA, M., TAN, T.K., WONG, S.M. (2003): Identification and molecular phylogeny of *Epulorhiza* isolates from tropical orchids. *Mycological Research* 107: 1041-1049. p.
- MADISON, M. (1977): Vascular epiphytes: their systematic occurrence and salient features. *Selbyana* 2: 1-13. p.
- MALINOVÁ, T. (2009): Germination ecology on orchids. Master thesis, University of South Bohemia Faculty of Science, České Budejovice, 38. p.
- MARTOS, F., DULORMNE, M., PAILLER, T., BONFANTE, P., FACCIO, A., FOURNEL, J., DUBOIS, M.-P., SELOSSE, M.-A. (2009): Independent recruitment of saprotrophic fungi as mycorrhizal partners by tropical achlorophyllous orchids. *New Phytologist*. 184(3): 668–681. p. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02987.x>
- MATHEW, B., BURTON, J.A. (1994): CITES Guide To Plants In Trade. published by Department of the Environment.
- MCCORMICK, M.K.; WHIGHAM, D.F.; CANCHANI-VIRUET A. (2018): Mycorrhizal fungi affect orchid distribution and population dynamics. *New Phytologist* 219(4): 1207-1215. p. <https://doi.org/10.1111/nph.15223>
- MENZEL, A., HEMPEL, S., KLOTZ, S.W., MOORA, M., PYŠEK, P., RILLIG, M.C., ZOBEL, M., KÜHN, I. (2017): Mycorrhizal status helps explain invasion success of alien plant species. *Ecology*. 98: 92–102. p. <https://doi.org/10.1002/ecy.1621>
- MINTON, M.M., BARBER, N.A., LINDSEY, L. (2016): Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on herbivory defense in two *Solanum* (*Solanaceae*) species. *Plant Ecology and Evolution*. 149(2): 157–164. p. <https://doi.org/10.5091/plecevo.2016.1176>
- MIYOSHI, K., MII, M. (1988): Ultrasonic treatment for enhancing seed germination of terrestrial orchid, *Calanthe discolor*, in asymbiotic culture. *Scientia Horticulturae*, 35: 127-130. p.
- MOLNÁR V. A., SRAMKÓ G. (2011): Az orchideák virágai és megporzói. in: *Magyarország orchideáinak atlasza*. szerk.: Molnár V., A. Kossuth Kiadó, Budapest, 46-59.
- MOLNÁR V., A., ÓVÁRI, M., SRAMKÓ, G. (2011b): A Magyarországon előforduló orchideák osztályozása es nevezéktana. in: *Magyarország orchideáinak atlasza*. szerk.: Molnár V., A. Kossuth Kiadó, Budapest. 42-45. p.
- MOLNÁR V., A. (2011): Piros madársisak. in: *Magyarország orchideáinak atlasza*. szerk.: Molnár V., A. Kossuth Kiadó, Budapest. 194. p.
- MOLNÁR, A., LÖKI, V., TAKÁCS, A., SCHMIDT, J., TÖKÖLYI, J., BÓDIS, J., SRAMKÓ, G. (2015): The reproductive success of Hungarian orchids has not changed in the last century. *Applied Ecology and Environmental Research* 13(4): 1097-1108. p.
- MOLNÁR, A., TAKÁCS A. (2016): Megporzási válság - A pollináció mint természeti szolgáltatás. *Természettudományi Közlöny*. 147. évf. 7. füzet.
- MOLNÁR, V. A., MÁTÉ, A., SRAMKÓ, G. (2011a): An unexpected new record of the Mediterranean orchid, *Ophrys bertolonii* (Orchidaceae) in Central Europe. – *Biologia* 66(5): 778-82.

- MOLNÁR, Z., VIRÁG, E., ÖRDÖG, V. (2011): Natural substances in tissue culture media of higher plants. *Acta Biologica Szegediensis*. 55(1): 123-127 p.
- MORELLATO, L.P.C., ALBERTON, B., ALVARADO, S.T., BORGES, B., BUISSON, E., CAMARGO, M.G.G., ... PERES, C.A. (2016): Linking plant phenology to conservation biology. *Biol. Conserv.* 195: 60-72. p.
- MUIR, H.J. (1989): Germination and mycorrhizal fungus compatibility in European orchids. In: Pritchard H. W. (szerk.) *Modern methods in orchid conservation: The role of physiology ecology and management*. Cambridge University Press: Cambridge. 39–56. p.
- NASH, N., LA CROIX, I. (consultants), BANKS, D. (writer) (2005): *Flora's Orchids*. Timber Press, Portland, 368. p.
- NICHOLSON, C.C., BALES, J.W., PALMER-FORTUNE, J.E., NICHOLSON, R.G. (2008): Darwin's bee-trap: The kinetics of *Catasetum*, a new world orchid. *Plant Signal Behavior* 3(1): 19-23. p.
- NIEUWDORP, P.J. (1972): Some observations with light and electron microscope on the endotrophicmycorrhiza of orchids. *Acta Botanica Neerlandica*. 21(2): 128-144. p.
- NILSSON, L.A. (1992): Orchid pollination biology. *Trends in Ecology and Evolution* (UK) 7(8) 255-259. p.
- OGURA-TSUJITA, Y., YUKAWA, T. (2008): High mycorrhizal specificity in a widespread mycoheterotrophic plant, *Eulophia zollingeri* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*. 95(1): 93–97. p. <https://doi.org/10.3732/ajb.95.1.93>
- OUANPHANIVANH, N., MERÉNYI, ZS., ORCZÁN, Á.K., BRATEK, Z., SZIGETI, Z., ILLYÉS, Z. (2008): Could orchids indicate truffle habitats? Mycorrhizal association between orchids and truffles. *Acta Biologica Szegediensis*. 52(1):229-232. p.
- PANKE-BUISSÉ, K., POOLE, A.C., GOODRICH, J.K., LEY, R.E., KAO-KNIFFIN, J. (2015): Selection on soil microbiomes reveals reproducible impacts on plant function. *ISME* 9:980–989. p.
- PARISA, S., MOHSEN, K., SHIRIN, D.D., MASOUD, M. (2014): Coconut Water and Peptone Improve Seed Germination and Protocorm Like Body Formation of Hybrid Phalaenopsis. *Agricultural Science Developments*. 3:(10): 317-322 p.
- PARMESAN, C., HANLEY, M.E. (2015): Plants and climate change: complexities and surprises. *Annals of Botany*. 116(6): 849-864. p. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mcv169>.
- PARMESAN, C., YOHE, G. (2003): A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature*. 421(6918): 37-42. p.
- PECORARO, L., GIRLANDA, M., KULL, T., PERINI, C., PEROTTO, S. (2013): Fungi from the roots of the terrestrial photosynthetic orchid *Himantoglossum adriaticum*. *Plant Ecology and Evolution*. 146(2): 145-152. p.
- PETERSON, R.L., CURRAH, R.S. (1990): Synthesis of mycorrhizae between protocorms of *Goodyera repens* (Orchidaceae) and *Ceratobasidium cereale*. *Canadian Journal of Botany*. 68(5): 1117–1125. p. <https://doi.org/10.1139/b90-141>
- PILLON, Y., CHASE, M. (2007): Taxonomic exaggeration and its effects on orchid conservation. *Conserv. Biol.* 21(1): 263-265. p.

- PURVES, S., HADLEY, G. (1975): Movement of carbon compounds between partners in orchid mycorrhizae. In: Sanders F. E., Mosse B., Tinker P. B. (szerk.) *Mycorrhizas. Academic Press*, London and New York
- PYATI, A.N., MURTHY, H.N., HAHN, E.J., PAEK, K.Y. (2002): *In vitro* propagation of *Dendrobium macrostachyum* Lindl.- A threatened orchid. *Indian J Exp Biol.* 40: 620-623 p.
- R. ESZÉKI, E. (1996): Trópusi orchideák aszimbiotikus mikroszaporítása az ELTE Botanikus Kert laboratóriumában. *Orchidea* 1996 (1): 24-27. p.
- R. ESZÉKI, E. (2005): Néhány hazai orchideafaj magoncainak fejlődése módosított Fast táptalajon. Lippay J. - Ormos I. - Vas K. Tud. Ülészak (Dísznöv. és Dendr. Szekció) Budapest, 86-87. p.
- R. ESZÉKI, E. (2012): Orchideafajok génmegőrzési és szaporítási lehetőségei. Doktori értekezés, Budapest.
- 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.
- RAHMSTORF, S., COUMOU, D. (2011): Increase of extreme events in a warming world. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 17905-09. p.
- RAMÍREZ, S.R., GRAVENDEEL, B., SINGER, R.B., MARSHALL, C.R., PIERCE, N.E. (2007): Dating the origin of the *Orchidaceae* from a fossil orchid with its pollinator. *Nature* 448: 1042–1045. p.
- RAMSAY, R. R., SIVASITHAMPARAM, K., DIXON, K.W. (1986): Patterns of infection and endophytes associated with Western Australian orchids. *Lindleyana* 1: 203-214. p.
- RAMSAY, R.R., SIVASITHAMPARAM, K., DIXON, K.W. (1987) Anastomosis groups among *Rhizoctonia*-like endophytic fungi in southwestern Australia *Pterostylis* species (*Orchidaceae*). *Lindleyana* 2, 161–166. p.
- RASMUSSEN, H.N. (1995): Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plant. Cambridge University Press.
- RASMUSSEN, H.N. (2002): Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant and Soil.* 244: 149-163. p.
- 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.
- RASMUSSEN, H.N., RASMUSSEN, F.N. (2009): Orchid mycorrhiza: Implications of a mycophagous life style. *Oikos.* 118(3) 334–345. p. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2008.17116.x>
- RASMUSSEN, H.N., WHIGHAM, D.F. (2002): Phenology of roots and mycorrhiza in five orchid species differing in phototropic strategy. *New Phytol.*, 154: 797–807. p.
- RICHARDSON, K.A., PETERSON, R.L., CURRAH, R.S. (1992): Seed reserves and early symbiotic protocorm development of *Platanthera hyperborea* (*Orchidaceae*). *Canadian Journal of Botany.* 70(2): 291–300. p. <https://doi.org/10.1139/b92-040>
- RICHTER, W. (1982): Orchideen: Pflegen, Vermehren, Züchten. Neumann, Radebeul.

- ROBERTS, D.L. (2003): Pollination biology: the role of sexual reproduction in orchid conservation. – In: Dixon, K. W., Kell, S. P., Barrett, R. L., Cribb, P. J. (szerk.) *Orchid conservation*. Natural History Publications, Kota Kinabalu.
- RODICS, K. (1995): Gyilkos üzlet. A KTM természetvédelmi Hivatalának tanulmánykötetei 5., Budapest.
- ROGER, A., GÉTAZ, M., RASMANN, S., SANDERS, I.R. (2013): Identity and combinations of arbuscular mycorrhizal fungal isolates influence plant resistance and insect preference. *Ecological Entomology*. 38(4): 330–338. p. <https://doi.org/10.1111/een.12022>
- ROOT, T.L., PRICE, J.L., HALL, K.R., SCHNEIDER, S.H., ROSENZWEIG, C., POUNDS, J.A. (2003): Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *Nature*. 421: 57-60. p.
- ROY, M., GONNEAU, C., ROCHETEAU, A., BERVEILLER, D., THOMAS, J.-C., DAMESIN, C., SELOSSE, M.-A. (2013): Why do mixotrophic plants stay green? A comparison between green and achlorophyllous orchid individuals *in situ*. *Ecological Monographs*. 83(1): 95–117. p. <https://doi.org/10.1890/11-2120.1>
- ROY, M., YAGAME, T., YAMATO, M., IWASE, K., HEINZ, C., FACCIO, A., BONFANTE, P., SELOSSE, M.A. (2009): Ectomycorrhizal *Inocybe* species associate with the mycoheterotrophic orchid *Epipogium aphyllum* but not with its asexual propagules. *Annals of Botany*. 104: 595-610. p.
- RÖTH, J. 1982: Orchideen. VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag, Berlin.
- SEATON, P.T., HU, H., PERNER, H., PRITCHARD, H.W. (2010): *Ex situ* conservation of orchids in a warming world. *The Botanical Review*. 76: 193-203. p.
- SELBY, M.J. (1976): Slope erosion due to extreme rainfall: a case study from New Zealand. *Geografiska Annaler. Series A, Physical Geography*. 58: 131-38. p.
- SELOSSE, M.A., FACCIO, A., SCAPPATICCI, G., BONFANTE, P. (2004): Chlorophyllous and achlorophyllous specimens of *Epipactis microphylla* (*Neottieae*, *Orchidaceae*) are associated with ectomycorrhizal septomycetes, including truffles. *Microbial Ecology* 47: 416-426. p.
- SELOSSE, M.-A., MARTOS, F. (2014): Do chlorophyllous orchids heterotrophically use mycorrhizal fungal carbon? *Trends in Plant Science* 19(11): 683–685. p. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.09.005>
- SEN, R., HIETALA, A.M., ZELMER, C.D. (1999): Common anastomosis and internal transcribed spacer RFLP groupings in binucleate *Rhizoctonia* isolates representing root endophytes of *Pinus sylvestris*, *Ceratophora* spp. from orchid mycorrhizas and a phytopathogenic anastomosis group. *New Phytologist* 144, 331–341. p.
- SHIROKOV, A.I., SYROVA, V.V., KRYUKOV, L.A., SHTARKMAN, N.N., SHESTAKOVA, A.A. (2016): Reintroduction of *Dactylorhiza incarnata* into the natural habitats of the European Russia. *Applied Ecology and Environmental Research* 15(1): 445-455. 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.
- SMITH, S.E., READ, D.J. (2008): 5 - Mineral nutrition, toxic element accumulation and water relations of arbuscular mycorrhizal plants. *Mycorrhizal symbiosis* (Third edition). 145-187. p. <https://doi.org/10.1016/B978-012370526-6.50007-6>

- SNEH, B., BURPEE, L., OGOSHI, A. (1991): Identification of *Rhizoctonia* species. *The American Phytopathological Society*. Minnesota, USA. 87-89. p.
- SOSA, V., PLATAS, T. (1998): Extinction and persistence of rare orchids in Veracruz, Mexico. *Conservation Biology*. 12: 451-455. 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.
- STEINITZ, B., BARR, N., TABIB, Y., VAKNIN, Y., BERNSTEIN, N. (2010): Control of *in vitro* rooting and plant development in *Corymbia maculata* by silver nitrate, silver thiosulfate and thiosulfate ion. *Plant Cell Rep.* 29(11): 1315-1323. p.
- STOUTAMIRE, W.P. (1983): Wasp-pollinated species of *Caladenia* (*Orchidaceae*) in south-western Australia. *Australian Journal of Botany*. 31: 383-394. p.
- STÖCKEL, M., TĚŠITELOVÁ, T., JERSÁKOVÁ, J., BIDARTONDO, M.I., GEBAUER, G. (2014): Carbon and nitrogen gain during the growth of orchid seedlings in nature. *New Phytologist*. 202(2): 606–615. p. <https://doi.org/10.1111/nph.12688>
- 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
- SWARTS, N.D., DIXON, K.W. (2009): Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. *Annals of Botany*. 104: 543-556. p.
- THOM, C., CHURCH, M.B. (1926): *The aspergilli*. Williams & Wilkins Co., Baltimore, MD.
- THOMAS, C.D., CAMERON, A., GREEN, R.E., BAKKENE, M.B., BEAUMONT, L.J., COLLINGHAM, Y.C., ERASMUS, B.F., DE SIQUEIRA, M.F., GRINGER, A., HANNAH, L., HUGES, L., HUNTLEY, B., VAN JARRVELD, A.S., MIDGLEY, G.F., MILES, L., ORTEGA-HUETA, M.L., PETERSEN, A.T., PHILLIPS, O.L., WILLIAMS, S.E. (2004): Extinction risk from climate change. *Nature*. 427: 145-48. p.
- THOMPSON, D.B. (1990): Different spatial scales of adaptation in the climbing behavior of *Peromyscus maniculatus*: geographic variation, natural selection, and gene flow. *Evolution* 44: 952–65. p. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1990.tb03817.x>
- THOMPSON, P.A. (1977): *Orchids from seed*. Royal Botanic Gardens, Kew, England.
- THUILLER, W., LAVOREL, S., ARAÚJO, M.B., SYKES, M.T., PRENTICE, I.C. (2005): Climate change threats to plant diversity in Europe. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102: 8245-50. p.
- TILLYNÉ MÁNDY, A. (2005): Mikroszaporítás a kertészeti ágazatokban: Orchideák in: Kertészeti növények mikroszaporítása. szerk: Jámborné-Benczúr, E, Dobránszki, J. Mezőgazda Kiadó, 214-222. p.
- TREMBLAY, R.L., ACKERMAN, J.D., ZIMMERMAN, J.K., CALVO, R.N. (2005): Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. *Biological Journal of the Linnean Society* 84: 1-54. p. DOI: 10.1111/j.1095-8312.2004.00400.x.
- 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. (1986a): Adaptation of the tetrazolium method for testing the seed viability, and scanning electron microscopy study of some Western European orchids. *Physiologia Plantarum*. 66: 435-442. p.
- VAN WAES, J.M., DEBERGH, P.C. (1986b): *In vitro* germination of some Western European orchids. *Physiologia Plantarum*. 67: 253-261. p.
- VASUDEVAN, R., VAN STADEN, J. (2010): Fruit harvesting time and corresponding morphological changes of seed integuments influence *in vitro* seed germination of *Dendrobium nobile* Lindl. *Plant Growth Regulation*. 60(3), 237–246. p.
- VERMELEUEN, P. (1947). *Studies on Dactylorchids*. Utrecht: Schotanus & Jens.
- VUJANOVIC, V., ST-ARNAUD, M., BARABÉ, D., THIBEAULT, G. (2000): Viability Testing of Orchid Seed and the Promotion of Colouration and Germination. *Annals of Botany*. 86: 79-86. p. doi:10.1006/anbo.2000.1162
- WAGNER, J., HANSEL, A. (1994): *In vitro* seed-germination of *Cypripedium calceolus* at various embryogenic stages. *Angewandte Botanik*. 68(1-2): 5-9. p.
- WAGNER, M.R., LUNDBERG, D.S., COLEMAN-DERR, D., TRINGE, S.G., DANGL, J.L., MITCHELL-OLDS, T. (2014): Natural soil microbes alter flowering phenology and the intensity of selection on flowering time in a wild *Arabidopsis* relative. *Ecology Letters*. 17(6): 717–726. p. <https://doi.org/10.1111/ele.12276>
- WARCUP, J.H. (1971): Specificity of mycorrhizal association in some Australian terrestrial orchids. *New Phytologist*. 70: 41-46. p.
- WARCUP, J.H. (1973): Symbiotic germination of some Australian terrestrial orchids. *New Phytologist*. 72: 387-392. p.
- WARCUP, J.H. (1981): The mycorrhizal relationships of Australian orchids. *New Phytologist*. 87, 371–381. p.
- WARCUP, J.H. (1985): Pathogenic *Rhizoctonia* and orchids. In: Parker C. A., Moore K. W., Wong P. T. W., Rovira A. D., Kollmorgen J. K. (szerk.) *Ecology and management of soil-borne plant pathogens*. American Phytopathological Society: St. Paul. 69–70. p.
- WARCUP, J.H., TALBOT, P.H.B. (1967): Perfect states of *Rhizoctonias* associated with orchids. *New Phytologist*. 66: 631-641. p.
- WARCUP, J.H., TALBOT, P.H.B. (1971): Perfect states of *Rhizoctonias* associated with orchids. II. *New Phytologist* 70: 35-40. p.
- WARCUP, J.H., TALBOT, P.H.B. (1980): Perfect states of *Rhizoctonias* associated with orchids. III. *New Phytologist* 86: 267-272. p.
- WHIGHAM, D.F., MCCORMICK, M.K., O'NEILL, J.P. (2008): Specialized seedling strategies II: orchids, bromeliads, carnivorous plants, and parasites. In: Leck M. A., Parker V. T., Simpson R. L. (szerk.) *Seedling ecology and evolution*. New York, NY, USA: Cambridge University Press, 79–100. p. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511815133.006>
- 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.

- WILLIAMS, P.G. (1985): Orchidaceous rhizoctonias in pot cultures of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Canadian Journal of Botany* 63, 1329–1333. p.
- WILLIAMSON, B., HADLEY, G. (1970): Penetration and infection of orchid protocorms by *Thanatephorus cucumeris* and other *Rhizoctonia* isolates. *Phytopathology*. 60: 1092–1096. p. DOI: 10.1094/Phyto-60-1092.
- WILLIS, J.C. 1973. A dictionary of the flowering plants and ferns, 8th ed. Revised by H. K. Airy Shaw. Cambridge Univ. Press, London.
- WITHNER, C.L. (szerk) (1959): The Orchids: A Scientific Survey. *The Ronald Press Company*, New York
- WMO, WORLD METEOROLOGICAL ORGANIZATION (2011): Weather Extremes in a Changing Climate: Hindsight on Foresight. – WMO, Geneva.
- WOODWARD, F.I., LOMAS, M.R., BETTS, R.A. (1998): Vegetation-climate feedback in a greenhouse world. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 353: 29-39. p.
- WOOLCOCK, C.E., WOOLCOCK, D.T. (1984): Australian terrestrial orchids. Melbourne: Thomas Nelson.
- ZELMER, C.D., CUTHBERTSON, L., CURRAH, R.S. (1996): Fungi associated with terrestrial orchid mycorrhizas, seeds and protocorms. *Mycoscience* 37: 439–448. p.
- ZIMMER, K., MEYER, C., GEBAUER, G. (2008): The ectomycorrhizal specialist orchid *Corallorhiza trifida* is a partial myco-heterotroph. *New Phytologist*. 178: 395-400. p.

Internetes hivatkozások:

- BAILLIE, J.E.M. (Szerk.) (2004): 2004 IUCN Red List of Threatened Species. A Global Species Assessment, The IUCN Species Survival Commission. Glad, Switzerland, and Cambridge, UK. (http://www.iucn.org/themes/ssc/red_list_2004/GSA_book/Red_List_2004_book.pdf)
Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: IUCN Red List 2004. Lekérdezés időpontja: 2020.01.17.
- CITES (1973): <https://www.cites.org/eng/disc/text.php> Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: cites. Lekérdezés időpontja: 2020.01.17.
- INTERNET-1: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/> Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: mobot. Lekérdezés időpontja: 2019.11.28.
- INTERNET-2: 2003. évi XXXII. törvény (2003): www.cites.hu/docs/2003_32_Tv_Washingtoni_Egyezmeny.pdf Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: 2003. évi XXXII. törvény. Lekérdezés időpontja: 2019.11.28.
- INTERNET-3: (1992): BA TANÁCS 92/43/EGK IRÁNYELVE (1992. május 21.) - EUR-Lex (<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/PDF/?uri=CELEX:01992L0043-20070101&from=EN>) Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: a vadon élő állatok és növények védelméről. Lekérdezés időpontja: 2019.11.28.
- INTERNET-4: 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-5: LoopSeq™ 18S - ITS Mycobiome Kit User Manual, Version 1.1:
https://drive.google.com/file/d/1J9iw4uPhQsBTP2_eaNeD4n_ZcaSZq4Sl/view Lekérdezés
időpontja: 2020.01.17

INTERNET-6: 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

INTERNET-7: UNITE adatbázis: <https://unite.ut.ee/analysis.php>. Keresőprogram: Google.
Kulcsszavak: unite database. Lekérdezés időpontja: 2019.12.06.

INTERNET-8: SILVA adatbázis: <https://www.arb-silva.de/> Keresőprogram: Google. Kulcsszavak:
silva database. Lekérdezés időpontja: 2019.12.06.

R CORE TEAM (2017): R: A Language and Environment for Statistical Computing. – R Foundation
for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.

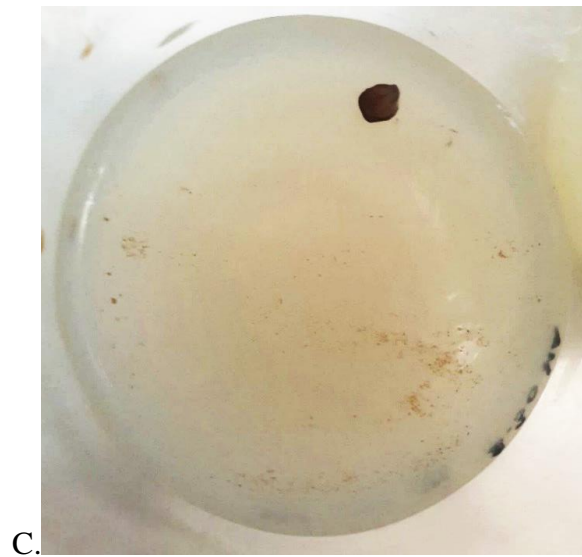
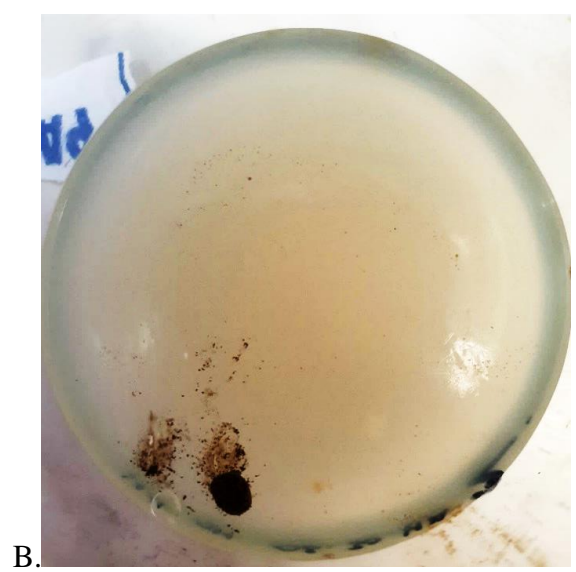
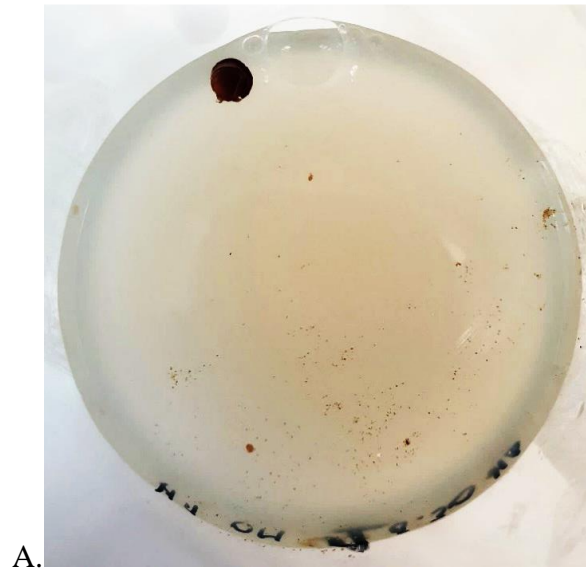
További mellékletek

2.sz. melléklet: NucleoSpin Microbial DNA Isolation Kit protokoll

(Macherey-Nagel; 740235.50)

1. 100 mg gyökérszövetet steril körülmények között feldaraboltunk
2. A szövetdarabokat egy G-típusú feltáró csőbe helyeztük (Macherey-Nagel; NucleoSpin Bead Tubes Type G).
3. Adjunk hozzá 40 µl MG puffert.
4. Adjunk hozzá 10 µl folyékony Proteináz K-t (2-8°C).
5. Helyezzük a csőtartó adaptert a Vortex Genie 2 készülékre és helyezzük be a lízis csöveket.
6. Feltárás 2600 rpm-en (50Hz) 20 perc
7. Fugáljuk 11.000g 30 másodpercig
8. Adjunk hozzá 600 µl MG puffert, vortexeljük alaposan, majd fugáljuk 11.000g-n 30 másodpercig
9. Mérjük át a felülúszót (500-600 µl) a mellékelt oszlopokra, majd fugáljuk 11.000g-n 30 másodpercig.
10. Öntsük el a szűrletet.
11. Mérjük az oszlopra 500 µl BW puffert majd fugáljuk 11.000g-n 30 másodpercig.
12. Öntsük el a szűrletet.
13. Mérjük az oszlopra 500 µl B5 puffert majd fugáljuk 11.000g-n 30 másodpercig.
14. Öntsük el a szűrletet.
15. Szárítsuk az oszlopot 2 perc fugálással 11.000g-n.
16. Az oszlopokat tegyük át új, feliratozott 1,5 mL-es Eppendorf csövekbe, majd mérjük az oszlopra 100 µl BE puffert.
17. Inkubáljuk szobahőn 2 percig.
18. Eluáljuk a DNS-t 2 perc fugálással 11.000g-n.
19. Távolítsuk el az oszlopokat és zárjuk le a csöveket.
20. Tárolás 2-8°C vagy -20°C-on.

3. sz. melléklet: A *H. adriaticum* magok mellé helyezett gombaminták. Bal fentről jobb lefelé: A, B, C, D, E gombaminták



4.sz. melléklet: t-eloszlás táblázat

v = n - 2 degrees of freedom	P(R ≤ r)			
	0.95	0.975	0.99	0.995
	r _{0.05} (v)	r _{0.025} (v)	r _{0.01} (v)	r _{0.005} (v)
1	0.9877	0.9969	0.9995	0.9999
2	0.9000	0.9500	0.9800	0.9900
3	0.8053	0.8783	0.9343	0.9587
4	0.7292	0.8113	0.8822	0.9172
5	0.6694	0.7544	0.8329	0.8745
6	0.6215	0.7067	0.7887	0.8343
7	0.5822	0.6664	0.7497	0.7977
8	0.5493	0.6319	0.7154	0.7646
9	0.5214	0.6020	0.6850	0.7348
10	0.4972	0.5759	0.6581	0.7079
11	0.4761	0.5529	0.6338	0.6835
<u>12</u>	<u>0.4575</u>	0.5323	0.6120	0.6613
13	0.4408	0.5139	0.5922	0.6411
14	0.4258	0.4973	0.5742	0.6226
15	0.4123	0.4821	0.5577	0.6054
16	0.4000	0.4683	0.5425	0.5897
17	0.3887	0.4555	0.5285	0.5750
18	0.3783	0.4437	0.5154	0.5614
19	0.3687	0.4328	0.5033	0.5487
20	0.3597	0.4226	0.4920	0.5367
25	0.3232	0.3808	0.4450	0.4869
30	0.2959	0.3494	0.4092	0.4487
35	0.2746	0.3246	0.3809	0.4182
40	0.2572	0.3044	0.3578	0.3931
45	0.2428	0.2875	0.3383	0.3721
50	0.2306	0.2732	0.3218	0.3541
60	0.2108	0.2500	0.2948	0.3248
70	0.1954	0.2318	0.2736	0.3017
80	0.1829	0.2172	0.2565	0.2829
90	0.1725	0.2049	0.2422	0.2673
100	0.1638	0.1946	0.2300	0.2540

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom elsősorban szüleimnek, hogy eljuthattam idáig az életemben. Mindig érdekes belegondolnom, hogy 19 évesen csak maximum egy BSc-t terveztem, és most, 10 évvel később a doktori disszertációmát írtam meg. Nélkületek jelenleg nem lennék itt. Köszönöm Anyukámnak, hogy mindig tartja bennem a lelket, még a legnehezebb időkben is, és azt is, hogy arra tanított, mindig legyenek szorgalmas, kitartó és erős nő. Tőled tanultam, hogy ha valami nem sikerül, akkor se adjam fel soha, sőt, próbáljam még jobban. Köszönöm Apukámnak, hogy a tudományos pályafutásom során a kérdéseimmel bármikor fordulhattam hozzá, hogy ötleteket adott a kísérleteim megvalósítására, valamint, hogy az életemet mindig maximálisan támogatta, így folyamatosan tudtam a kutatásomra koncentrálni, konferenciákra járni, publikálni, és mindeközben sosem kellett nélkülözni.

Köszönöm bátyámnak, aki szintén mindig támogatót, és sok, tudományos élettal kapcsolatos tanáccsal látott el az évek során.

Köszönöm konzulensemnek, Dr. habil. Nagy János Györgynek, aki már az első pillanattól fogva támogatót mindenben. Sosem felejttem el, hogy már az első találkozásunkkor, amikor még csak érdeklődtem az általad kiírt doktori témák iránt, csupa pozitivitással, mosolyogva beszéltél velem, és már akkor, ismeretlenül is úgy álltál hozzám, hogy szeptembertől a melletted levő asztal lesz az enyém, és már a közös munkát, oktatást tervezted. Hálával tartozom neked, amiért mindig próbáltál jó tanáccsal ellátni, akár tudományos-, társadalmi- vagy magánéleti problémával fordultam hozzád. Köszönöm az irodai és terepi jó hangulatot, a folyamatos biztatást, és az évek során adott hasznos ötleteket, segítséget és támogatást.

Köszönöm Dr. R. Eszéki Eszternek, aki felkeltette az érdeklődésemet és elindította a tudományos utamat az orchidea szaporítás irányába, akitől megtanulhattam mindent, amit ma tudok az orchideák táptalajra vetéséről és *in vitro* tartásáról. Köszönöm, hogy mindig segítettél és ott voltál nekem.

Köszönöm Dr. Kiss Erzsébet Professor Emeritus tanárnőnek, hogy lehetőséget adott, hogy a Szent István Egyetem Genetikai, Mikrobiológiai és Biotechnológiai Intézet laborjában végezhessem az *in vitro* kísérleteimet.

Köszönöm Dr. Veres Anikónak, Dr. Szőke Antalnak, Dr. Tóth-Lencsés Kittinek, Kovács Zsófiának és Bedő Jankának, akik a Genetikai, Mikrobiológiai és Biotechnológiai Intézet laborjában mindig segítségemre voltak, ha kérdésem volt.

Köszönöm Dr. Túróczi György tanár úrnak, aki lehetőséget és helyet biztosított nekem a Szent István Egyetem Növényvédelmi Intézetének laborjában a gombatenyésztéses kísérleteimhez, segítséget nyújtott a kitenyésztett fajok meghatározásában, illetve bármikor fordulhattam hozzá a gombákkal kapcsolatos kérdéseimmel.

Köszönöm Dr. Sipos Ritának és Mohr Anitának, a BIOMI Biotechnológiai Szolgáltató Kft. munkatársainak, hogy az izolálást és a szekvenálást az orchidea gyökérből számunkra elkészítették.

Köszönöm Dr. Józsa Ritának, a Greenmann Kft tudományos vezetőjének, aki a kiültetési kísérletemhez használt Greenmann Floraria terméket ingyen ajánlotta fel, és küldte el számomra.

Köszönöm szépen a házi védésem opponenseinek, Tillyné Dr. Mátyás Andreának és Dr. Szőke Antalnak a rengeteg befektetett időt és munkát. Köszönet a magas színvonalú bírálatukért, az irányt mutató kritikai megjegyzéseikért, hasznos észrevételeikért, amelyekre nagyban támaszkodhatom majd további pályafutásom során is.

Köszönöm a magyar barátaimnak, akik doktorandusz pályafutásom során végig lelkesítettek, támogattak, sosem kérdezték meg, miért vagyok kialvatlan és miért nem reagálok az üzeneteikre. Köszönöm a türelmeteket.

Süle Gabriellának köszönöm a segítséget, támogatást és az összes mémet is, ami nevetésre bírt a dolgozat megírása során.

Kiemelném és szeretnék köszönetet mondani Kadosa Gábornak, aki a terepi felméréseim során többször elkísért és szórakoztatott a többszáz kilométernyi vezetés és a terepi munkáim során, valamint végighallgatta a 4 év során az összes problémámat, és mindig segített nekem, amiben csak tudott.

Horváth Enikőt is szeretném kiemelni, aki nem csak nagyon jó szobatárs és hallgató az óráimon, de emellett nagyon figyelmes és megértő barátnő is. Köszönök minden könnyes nevetéssel töltött percet, még a legstresszesebb időszakokban is, és amennyire izgulni fogsz értem a védésem, annyira fogok én is izgulni érted majd a te államvizsgádon.

I would like to say thank to a really special person in my life, to my boyfriend, Pratik Doshi. You motivated me the most to go ahead with all my researches, and you were the one, who helped me the most during my experiments, especially with the fungi. When it was about to work in the lab, without a doubt, you were there for me. Thank you for always supporting and encouraging me in everything. Thank you for the many constructive suggestions you gave me, thank you for helping me in the statistics and thank you for taking the time to proofread the english parts of my dissertation as well. Thank you for calming me down in the stressful times, and thank you for your love. It is a hard time for both of us, but you can be sure, that I will always be there for you as well.

Last but not least I would like to say thank you to all my international friends, who are happy for me, who supported me all the time, and asked if I am okay or I need anything while I was writing my dissertation.