

XXXII. OTDK Biológia Szekció

Csíráztatási protokoll kidolgozása herbárium maganyagokra

Készítette:

Tóth Kata Mária

Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar

Biológia BSc III.

Dolgozat lezárásának dátuma: 2015.01.06.

Témavezetők:

Dr. Cserhalmi Dániel
egyetemi adjunktus

Endrédi Anett
biológus

Budapest

2015.

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	2
1.1. A téma jelentősége.....	3
1.2. Célkitűzések, kérdések, hipotézisek	4
2. Irodalmi áttekintés	5
2.1. Az életképességet befolyásoló tényezők.....	5
2.2. Az életképesség tesztelésének módszerei.....	8
2.3. A dormancia feloldása és a csíráztatás.....	10
2.4. A vizsgált fajok biológiája.....	10
3. Anyag és módszer.....	16
3.1. Magok eredete, dokumentációja	16
3.2. Az előkísérlet	16
3.3. Módosított kísérleti elrendezés.....	18
3.4. Statisztikai elemzések.....	20
4. Eredmények	21
4.1. Módszertani eredmények.....	21
4.2. Biológiai eredmények	24
5. Diskusszió	29
6. Összefoglaló	33
7. Summary.....	34

1. Bevezetés

1.1. A téma jelentősége

Napjainkra az emberi tevékenységek miatt a fajok kihalási rátája több, mint százszorosára növekedett (MEA, 2005; RICKETTS et al. 2005; THUILLER, 2007). Emiatt a fennmaradt fajok és élőhelyeik megőrzése még fontosabbá vált, melyhez azonban szükséges az adott fajok természetrajzának és ökológiájának alapos ismerete.

Egy növénytársulás regenerációs képessége az adott terület magbankján alapul, mely az egyes fajokhoz tartozó csírázóképes magok mennyiségével, arányával, csírázási igényeivel és e tulajdonságok megőrzésének idejével jellemezhető (MATUS et al. 2003; VALKÓ et al. 2010). Mivel a hosszan eltartható (ún. ortodox) magok tárolásával és későbbi csíráztatásával elősegíthető az egyes fajok megőrzése (COCHRANE, et al. 2007), számos aktuális kutatás témája a fent említett tulajdonságok vizsgálata. Azonban, e munkák elsősorban gazdaságilag hasznos illetve kiemelkedően veszélyeztetett fajokra fókuszálnak. Épp ezért csak kevés adatunk van a természetes társulásokot alkotó gyakoribb fajokról, holott ezek ismeretében könnyebben megbecsülhető lenne egy-egy növénytársulás regenerációs képessége és válasza az egyes környezeti változásokra.

A csírázóképeség megőrzését általában *in situ* kísérletekkel vagy friss magvak *ex situ*, talajban történő csíráztatásával (TATÁR, 2009; SCHWIENBACHER et al. 2010) vizsgálják. Utóbbi jobban modellezi a természetes folyamatokat, azonban túl sok tényező befolyásolhatja a csírázást, ez pedig megnehezíti az eredmények értékelését. Más esetekben a frissen begyűjtött magokat hosszú ideig raktározzák (NAGEL & BÖRNER, 2010), majd laboratóriumi körülmények között csíráztatják (COCHRANE et al. 2007). Ez kevésbé természetes, de mivel a csírázási környezet nagymértékben befolyásolható, kiszűrhetőek az értékelést zavaró tényezők. A fenti módszerek negatívuma, hogy a magok potenciális élettartamának megállapításához hosszú távú, több éves-évtizedes kutatás szükséges. Erre a problémára megoldást jelenthet a korábban más célra gyűjtött, különböző korú maggyűjtemények és herbáriumi maganyagok felhasználása (TAKÁCS et al. 2013). Előnye ellenére a módszer felhasználhatósága korlátozott a csírázóképeségét befolyásoló nagy számú tényező (forrásterület éghajlata/időjárása, genetikai variabilitás, tárolási körülmények), illetve a sokszor túl kicsi mintaelemszám miatt. Ugyanakkor a módszer alkalmas az egyes fajok magjaira jellemző potenciális életképeség megállapítására, és mivel egyre több kutatás használja (MILBERG, 1994; LEINO & EDQUIST 2010, GODEFROID et al. 2011), idővel elegendő adatot szolgáltathat egy metaelemzéshez, amivel a fenti cél elérhetővé válik.

1.2. Célkitűzések, kérdések, hipotézisek

Jelen kutatásunkban néhány Magyarországon élő növényfaj magjainak élettartamáról és csírázási tulajdonságairól szeretnénk adatokat gyűjteni herbáriumi magok felhasználásával. Emellett, tapasztalatainkat felhasználva, célunk egy, a herbáriumi magok eredményes csíráztatását lehetővé tevő protokoll kidolgozása elsősorban pillangósvirágú fajokra. A kutatáshoz öt pillangós virágú (*Fabaceae* családjába tartozó) fajt (*Astragalus cicer*, *Astragalus contortuplicatus*, *Astragalus glycyphyllos*, *Astragalus exscapus*, *Trifolium arvense*), két rezedá (*Resedaceae* családjába tartozó) fajt (*Reseda lutea*, *Reseda phyteuma*) és egy keresztesvirágú (*Brassicaceae* családjába tartozó) fajt (*Thlaspi arvense*) vizsgáltunk.

Kérdéseink a következők voltak:

1. A vizsgált fajok potenciálisan milyen hosszán őrzik meg csírázási képességüket? (Milyen idős a legidősebb csírázásra képes magtétel?)

A kérdés megválaszolásával információt kapunk az adott faj regenerációs képességéről és a mesterséges magbankokban történő eltárolhatóságáról is.

2. Van-e összefüggés a mag kora és a keménymaghéjúság aránya között?

A pillangósvirágúak családjára általánosan jellemző az akár hosszú távon is fennmaradó keménymaghéjúság (RAJJOU & DEBEAUJON, 2008), mely segítségével későbbre időzíthető a magok csírázása. Ez egyes szerzők szerint idővel külső behatás nélkül is feloldódhat (BASKIN & BASKIN, 1998). Friss, illetve fiatal magok esetében a dormans állapot megléte a *Resedaceae* család egyes fajaira is jellemző (EBRAHIMI et al. 2010). Bár a *Thlaspi arvense* esetén nem bizonyított sem a keménymaghéjúság, sem a hosszabb dormans állapot megléte, a szakirodalom (RBG) mégis hosszán eltárolható magvú fajként jegyzi.

3. Van-e összefüggés a mag tömege és csírázási képessége között?

A magtömeget tekintve korábbi kutatások kimutatták, hogy az egyes fajok kisebb tömegű magjai rövidebb ideig életképesek, azonban a fajok között a kisebb maggal rendelkezők átlagosan hosszabb ideig csíráképesek, mint a nagyobb magvúak (CSONTOS, 2001). Ezt a megfigyelést szeretnénk tesztelni a saját adatainkon.

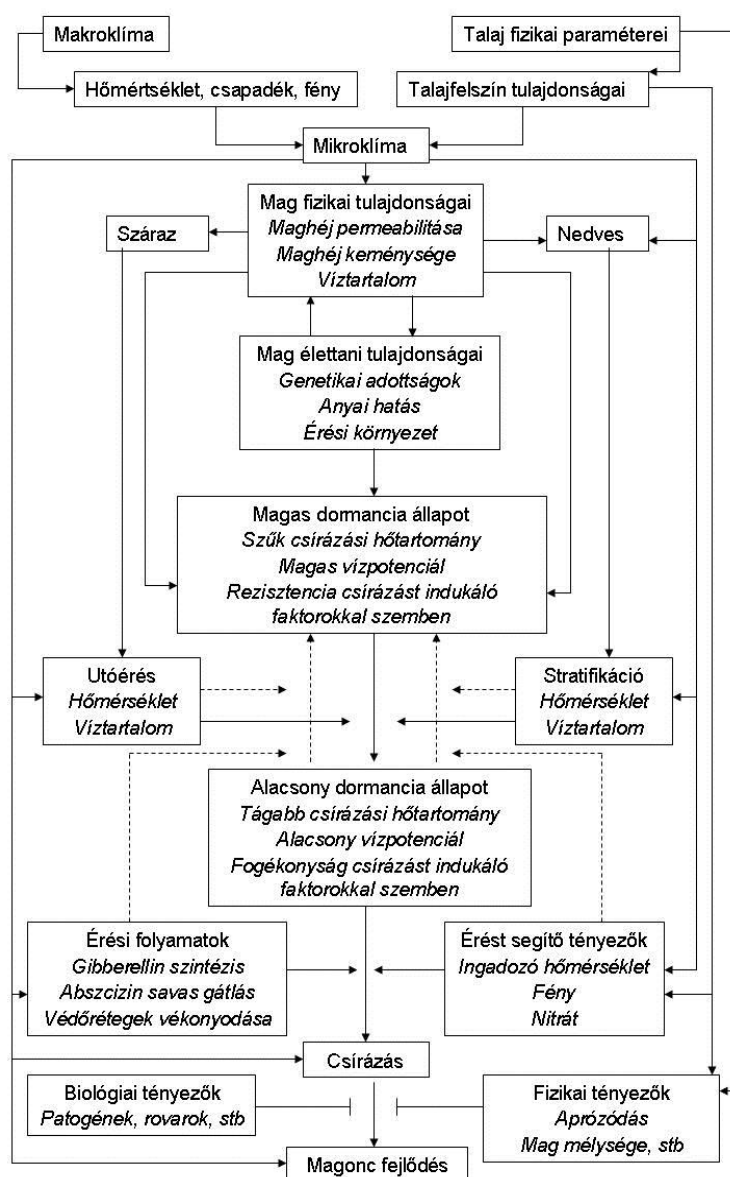
4. Milyen mértékben és hogyan használhatóak a herbáriumokból származó magok életképesség-vizsgálatokra?

A szakirodalom alapján van létjogosultsága a herbáriumokból történő csíráztatásoknak (GODEFROID et al. 2011), de az általunk vizsgált fajokra még nincs kidolgozott protokoll, és a vizsgálat korlátai sem ismertek.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Az életképességet befolyásoló tényezők

A magok életképessége megfeleltethető csírázási képességükkel. Egy faj-, illetve egy magtétel magjaira vonatkoztatva azonban ez a kifejezés több jelentéssel bír: jelentheti a csírázásra képes magok arányát („viability”) és a csírázóképeség megőrzésének idejét („longevity”) is (MURDOCH & ELLIS, 2000). Fontosnak tartjuk a fenti tulajdonságok egyértelmű elkülönítését, így jelen dolgozatban az előbbit „csírázóképeségnek”, az utóbbit „élettartamnak”, a kettőt együttvéve pedig „életképességnek” nevezzük.



1. ábra A magok csírázását befolyásoló környezeti tényezők ALLEN et al. (2007) nyomán. A folytonos nyilak a csírázást elősegítő ideális tényezőket, a szaggatott vonalak a kedvezőtlen körülmények esetén fellépő, másodlagos dormanciához vezető folyamatokat jelzik.

A magok életképessége több genetikai és környezeti tényező kölcsönhatásától is függ (1. ábra). Ezek közül kiemelendő az adott fajra jellemző életmenet-stratégia és dormancia-típus (= magnyugalom-típus; 1. táblázat), a mag tárolásának/elfekvésének körülményei, valamint az érési környezet. Ez utóbbi a magok minőségén keresztül befolyásolja az életképességet. Az alábbiakban ezeket a tényezőket tekintem át röviden.

A dormancia (magnyugalom) a növény vagy valamely szaporító képletének azon állapota, mely során időszakosan gátolt a növekedés és a fejlődés (HILHORST et al. 2007). Ez felelős a magok életben tartásáért csírázásra alkalmatlan vagy kedvezőtlen körülmények között.

A frissen kifejlődő magok érésük utolsó fázisát gyakran

dormans állapotban töltik. Ezt nevezzük elsődleges (primer) dormanciának. Ezzel szemben a másodlagos (szekunder) magnyugalom a már érett magok válasza a kedvezőtlen körülményekre. A nyugalmi állapot elérésére és fenntartására többféle mechanizmus alakult ki a növényvilágban, melyek egy része a külső körülményektől független (endogén), míg mások a környezet által erősen befolyásolt (exogén) nyugalmi állapotot hoznak létre. (1. táblázat). A leggyakoribb stratégiák közé tartozik a maghéj vízáteresztő-képessége által szabályozott **fizikai** dormancia (=keménymaghéjúság), az embrió éretlenségén alapuló **morfológiai** dormancia, illetve bizonyos anyagcsere termékek jelenléte/hiánya által kiváltott **élettani** magnyugalmi állapot. A különböző típusok kombinálódhatnak is (DEGEN, 1923; BASKIN & BASKIN, 2004; HILHORST et al. 2007).

1. táblázat: Dormancia (magnyugalmi) típusok BASKIN & BASKIN (1998) alapján

	Elsődleges (primer)		Másodlagos (szekunder)	
	Exogén	Endogén	Kombinált	Endogén
Típusok	fizikai, mechanikai, kémiai	morfológiai, élettani, a kettő kombinációja	Exogén és endogén kombinációja	élettani

A dormancia típusát szintén genetikai tényezők határozzák meg. Filogenetikai vizsgálatok alapján úgy tűnik, a morfológiai dormancia a legősibb a fent említett stratégiák között, míg a másik két alaptípus csak később alakult ki az evolúció során (BASKIN & BASKIN, 2004). Az élettani dormancia bizonyult evolúciósan a leghatékonyabbnak, ennek különböző formái a legelterjedtebbek a növényvilágban. Ezzel szemben a fizikai dormancia csak a növények egy jól elkülönülő csoportjára jellemző.

Mindezek ellenére nem állítható, hogy a magnyugalom típusa és mértéke (vagyis a dormans magok aránya egy magtételben) az adott taxonra minden esetben jellemző, kizárólag genetikai tényezőktől függő tulajdonság. Ez ugyanis eltérhet ugyanazon faj egyes populációi/egyedei között vagy akár egy egyed különböző évekből származó magtétélei között is (GALGÓCZI, 1964; MILBERG, 1997; CSERESNYÉS-BÓZSING, 2010). Ez a nagy variabilitás főleg a dormancia mértékére jellemző (a típusok kevésbé változatosak fajon belül), és a környezeti faktorok okozzák: ugyanazon faj az optimális élőhelyén vagy kedvező időjárás esetén kisebb arányban képez dormans magot, mint a számára kedvezőtlen helyen és időben (CSONTOS et al. 2006).

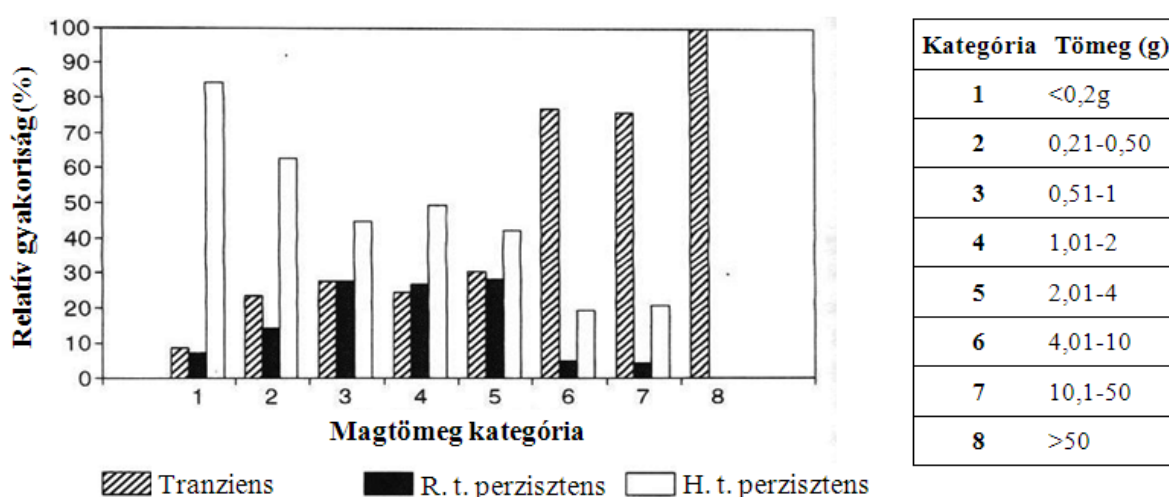
Az átlagos magélettartam tekintetében nagy eltérések lehetnek a növénycsaládok között. Vannak olyan családok (pl. *Cyperaceae*), ahol általában egy éven belül drasztikusan

lecsökken a csírázóképeség (VAN DER VALK et al. 1999), ellenben például a *Fabaceae* családban az általánosnak mondható fizikai dormanciával összefüggésben vannak olyan fajok (*Acacia spp.*), melyek extrém hosszú ideig is képesek megőrizni csírázóképeségüket (LEINO et al. 2010). Ugyanakkor ez a tulajdonság sokkal inkább függ a faj életmenet-stratégiájától, ezért növény családon belül is nagyon különbözhet. Például, az imént említett *Fabaceae* családban megfigyelhető a csírázóképeség gyors csökkenése is (*Pisum sativum*, VAN TREUREN et al. 2012).

A genetikai tulajdonságokon kívül egy mag életképességét nagyban befolyásolják az érése során az anyanövényre, illetve az érés után a magra ható környezeti faktorok is (AKHALKATSI & LÖSCH, 2005).

A csírázóképeséget befolyásoló legfontosabb abiotikus tényezők a csapadék, a hőmérséklet, valamint a tápanyagok mennyisége és eloszlása. Emellett fontosak az anyanövényre ható különböző, stresszt okozó biotikus tényezők, mint például a kompetíció, a zavarás és a parazitizmus mértéke.

A fentiekén kívül érdemes megemlíteni, hogy a magok tömege is összefüggést mutathat mind a csírázóképeséggel, mind az élettartammal. Fajon belül a rossz környezeti viszonyok között kifejlődött magok alacsonyabb tömeggel és kisebb csírázóképeséggel rendelkezhetnek, mint a jobb körülmények között kifejlődött társaik (GÁSPÁR, 1980). Másrésztől eltérést mutathat a kis, illetve nagy tömegű magokkal rendelkező fajok élettartama is (CSONTOS, 2001). A szakirodalom alapján ez az összefüggés fordítottan arányos, vagyis a kisebb magvú fajok gyakran tovább megőrzik életképességüket (2. ábra).



2. ábra: A magtömeg és a magbank-típus összefüggése CSONTOS (2001) nyomán. (Tranziens = egy évnél rövidebb élettartamú magokkal rendelkező fajok; R.t. (rövid távú) perzisztens = 1-5 éves élettartamú magokkal rendelkező fajok; H.t. (hosszú távú) perzisztens = 5 évnél hosszabb élettartamú magokkal rendelkező fajok)

A magok élettartamát egyaránt befolyásolják a fent említett biotikus és abiotikus tényezők is, emiatt kiemelten fontosak az elfekvés, illetve a tárolás körülményei.

A magvak begyűjtés utáni, tárolás előtti tisztítás elengedhetetlen az életképesség fenntartásához. A szennyeződések és a sérült magvak eltávolítása megelőzi a kórokozók és penészgombák elterjedését. A legjobb tisztítási módszer fajtól és terméstípustól függ, az ép magvak sérülését azonban minden esetben kerülni kell (RAO et al. 2006).

Hosszabb ideig csak a teljesen érett, egészséges, jó csírázóképesseggel rendelkező magokat lehet életképes állapotban eltartani. A légzésintenzitás csökkentése elengedhetetlen a hosszú távú tároláshoz, amit elérhetünk a hőmérséklet csökkentésével, szárítással, vagy alacsony oxigénkoncentráció fenntartásával is. A legegyszerűbb módszer a magok és környezetük szárazon tartása. A tárolás során a környezet páratartalmának 30% alatt kell lennie, bár az optimális tárolási körülmények eltérőek lehetnek az egyes fajok esetén. (BARTHODEISZKY, 1980).

2.2. Az életképesség tesztelésének módszerei

A magvak életképességének vizsgálatához elengedhetetlen a csírázási százalék meghatározása (ROBERTS, 1981), mely különböző fizikai, biológiai és kémiai módszerekkel vizsgálható. A legegyszerűbb fizikai módszerek egyike a metszés (SUSZKA et al. 2008), illetve a Zelenchuk-féle „látszólagos életképesség” meghatározása (ZELENCHUK, 1961), azonban a valós csírázási százalék meghatározására egyik módszer sem tökéletes, mivel túlbecsli az életképes magok arányát azáltal, hogy minden, komolyabb hibától mentes magot életképesnek ítél.

A biológiai módszerek közül a legelterjedtebb módszer a csíráztatás (ROBERTS, 1981), amely történhet talajban, Petri-csészében vagy papírlapok között (RAO et al. 2006). A csíráztatás előtt szükséges a várható leghatékonyabb módszer meghatározása, melyet befolyásolhat a mag mérete és a dormancia típusa. A talajban való csíráztatás áll legközelebb a természetes folyamatok modellezéséhez, és az életképes magok nagy eséllyel csírázásra bírhatóak vele, azonban fennáll a veszélye, hogy a kicsírázott egyedek egy része rejtve marad, mert elpusztul, mielőtt felérne a talaj felszínére, ez pedig az életképes magok arányának alulbecsléséhez vezet. Petri-csészében történő csíráztatás során a csírázott egyedek biztonsággal detektálhatóak, viszont a nem optimálisan beállított kísérlet során nem minden életképes mag fog fejlődésnek indulni, ami szintén az életképes magok arányának alulbecsléséhez vezethet. Talajban történő csíráztatás esetén fontos, hogy a csíráztató közeg

mentes legyen toxikus anyagoktól és gombaspórától, elegendő vizet biztosítson a magoknak, valamint a gyökerek és a sziklevek számára áthatolható legyen. A magvakat úgy kell elhelyezni a csíráztató közegben, hogy egymástól minél nagyobb, egyenletes távolságra helyezkedjenek el és semmiképpen ne érintkezzenek. A magvak számára egyenletes mennyiségben kell a nedvességet biztosítani. A csíráztatás optimális hosszának meghatározása elengedhetetlen. Túl rövid ideig tartó folyamat során az esetlegesen életképes magvak nem indulnak növekedésnek, míg a túl hosszán csíráztatott magvak jobban ki vannak téve a penészgombával való fertőzésnek (ELLIS et al. 1985).

A kémiai módszerek közül az egyik legismertebb a 2,3,5-trifeniltetrazolium festés (TTC), melyet a vetőmag kereskedelem nemzetközi vizsgálati szabályai is előírnak. Mivel egyszerű és igen megbízható módszer, a magbank-kutatások során is előszeretettel alkalmazzák (CSONTOS, 2001). A módszer lényege, hogy a magba bejutó szintelen redoxiindikátor, a TTC az élő embrió szövetlégzésének hatására redukálódik és piros színreakció során megfesti a szövetet (GRABE, 1970). Egyaránt alkalmas friss, illetve régi magvak lélegző sejtjeinek megfestésére (ELLIS et al. 1985), és jól használható a ki nem csírázott magvak utóellenőrzésére is. Használatára több protokoll is létezik, azonban csak kevés növényfaj esetén van pontosan kidolgozva. A TTC oldat ajánlott koncentrációja is különböző az egyes taxonok esetén, mely 0,1-1%-os töménység között változhat, amit befolyásolhat a maghéj vastagsága, permeabilitása, illetve előkezelési módja (BITTERCOURT & VIEIRA, 1966). A festés során az életképes sejtek eloszlása alapján egy úgynevezett festődési térkép rajzolódik ki, melyben inkább a festődő sejtek elhelyezkedése mintsem aránya határozza meg, hogy életképes-e a mag. Az életképes mag mintázata fajonként különböző.

A TTC festés mellett gyakran használt módszer még az olcsóbb indigókárminos festés, amely az előző módszerhez nagyon hasonló, azonban ez a festék az elhalt sejteket festi kékre, az élő sejtek szintelenek maradnak (ELLIS et al. 1985; SUSZKA et al. 2008).

A festődéssel járó módszerek mellett úgynevezett gyorseszteket is alkalmaznak. Ilyen többek között az a módszer, melynél a magok átmosását követően a vizeletvizsgálatokhoz használatos tesztsíkkal meghatározzák az visszamaradt vízben található cukor mennyiségét: a magasabb cukorkoncentráció a magok alacsonyabb minőségét jelzi. A GADA-teszt (a glutaminsav-dekarboxiláz aktivitás mérése) esetén a mintához glutaminsavat adnak, s így az élő sejtekben a dekarboxiláz működése során keletkező CO₂ segítségével becsülhető az aktív sejtek aránya. Olcsó és viszonylag gyors módszer, azonban minden növényre külön kalibrálást kell végezni (ELLIS et al. 1985). Hasonlóan gyors eljárás a röntgenfelvétellel

történő vizsgálat. Ennek előnye, hogy a léha, illetve károsodott magoktól az épek könnyen és megbízhatóan elkülöníthetők, valamint az eredmény megbízhatósága csíráztatással felülvizsgálható (ELLIS et al. 1985; SUSZKA et al. 2008).

Mivel az egyes módszerek kizárólagos használata nem ad megfelelő megbízhatóságú eredményt, így érdemes kombinálni azokat a lehető legjobb eredmény elérése érdekében. Előnyös kombináció lehet többek között a csíráztatás és a TTC-festés kombinációja, mert így a ki nem csírázott magvak tovább vizsgálhatóak, feltárva a potenciálisan csíráképes magokat is. Még pontosabb eredmény érhető el a röntgenfelvétel alkalmazása utáni csíráztatást követő GADA- vagy TTC-teszttel.

2.3. A dormancia feloldása és a csíráztatás

A csírázás megindulásához, dormancia jelenléte esetén valamilyen kiváltó tényező szükséges, mely megtöri a magnyugalmi állapotot. E hatások lehetnek endogének, mint a hormonok, és exogének, mint a hideg, a magas konstans vagy a változó hőmérséklet, a nedves rétegzés, a fény- vagy éppen sötétítés, ionok, amelyek fajtól függően váltanak ki élettani választ (SZABÓ, 1980; BASKIN & BASKIN, 1998). Az eltérő dormancia típusok mesterséges megtöréséhez különböző módszerek javasoltak (HILHORST et al. 2007). Morfológiai dormancia esetén az embrió éretlensége miatt utóérés szükséges mely megszüntetését hormonok (pl. gibberellinsav-3) indukálhatják. Az élettani magnyugalom feloldását a nedvesség, a fény és a tápanyag (nitrogén) szabályozásával, míg a fizikai dormanciáét a maghéj teljes vagy részleges eltávolításával lehet elérni (RAJJOU & DEBEAUJON, 2008). A keményhéjúság megszüntetése történhet továbbá mesterséges hőhatással, savval való kezeléssel és forrásban lévő vízbe történő beáztatással is (LONG et al. 2012), de a leggyakrabban alkalmazott módszer az ún. szkarifikáció, mely a maghéj mechanikai roncsolását jelenti.

Léteznek különböző protokollok, melyeket a családokra jellemző optimális csírázási módszer meghatározásához érdemes figyelembe venni. Ilyen például a Royal Botanical Garden of Kew által a legtöbb hajtásos növény családra kidolgozott módszerek (RBG) gyűjteménye is.

2.4. A vizsgált fajok biológiája

Kísérleteinkhez öt pillangósvirágú fajt választottunk ki, mivel a családra jellemző fizikai dormancia miatt (RAJJOU & DEBEAUJON, 2008; JAYASURIYA et al. 2013) a legtöbb faj potenciálisan hosszú élettartammal rendelkezik.

A fent említett dormancia mértéke az egyes fajok, területek, populációk és a gyűjtés idejének függvényében eltérő lehet (Lásd 2.1. fejezet). A magok korának növekedésével esetenként felléphet a csírázási képesség csökkenése (GODEFROID et al. 2010), illetve a fizikai dormancia különböző mértékben fel is oldódhat (BASKIN & BASKIN, 1998). Az általunk vizsgált négy faj magjai az RBG adatbázisa alapján hosszú távon megőrzik életképességüket, azaz ún. ortodox típusú maggal rendelkeznek.

A családból négy, eltérő életmenet-stratégiájú hazai csüdfű (*Astragalus*) fajt és egy általánosan elterjedt here (*Trifolium*) fajt választottunk.

Az *Astragalus cicer* L. (hólyagos csüdfű) évelő, Eurázsia egész területén erdőszelek mentén, réteken, kaszálókon megtalálható, áprilistól júniusig virágzó növény. Az *Astragalus glycyphyllos* L. (édeslevelű csüdfű) száraz talajú erdők és rétek, legelők faja, virágzása májustól augusztusig tart. Az *Astragalus contortuplicatus* L. (tekert csüdfű) egyéves, Északkelet-Európában élő, főként Bulgária és Oroszország területén előforduló növény. Időszakosan előntött, mocsaras talajokon él, áprilistól júniusig virágzik. Az *Astragalus exscapus* L. (szártalan csüdfű) évelő, eurázsiai faj, mely elsősorban a hegyvidéki, meszes talajú élőhelyeket kedveli, virágzása májustól júniusig tart (BOJŇANSKY & FARGAŠOVÁ, 2007). A kísérlet során vizsgált négy faj élőhelye eltér egymástól, azonban virágzási idejük hasonlóságokat mutat. Az első két faj hazánkban gyakori, míg az *Astragalus exscapus* és az *Astragalus contortuplicatus* ritka és védett fajok. Utóbbiról kevés adattal rendelkezünk, a Tisza mentén találhatóak meg kisebb, elszórt állományai, melyek határozatlan időközönként bukkannak fel a vízállástól függően (LESKU & MOLNÁR, 2007).

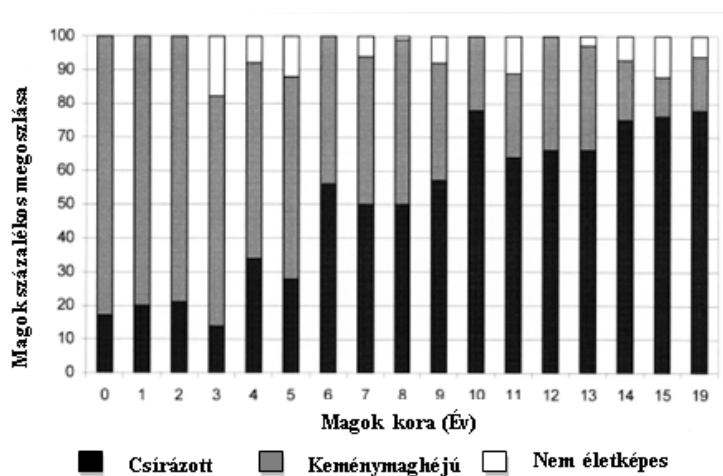
Az *Astragalus* nemzetségben a legnagyobb hatásfokú csírázás akkor érhető el, ha a maghéjat fizikailag megsértjük. Ezt bizonyítják LONG és munkatársai (2012), valamint PATANE & GRESTA (2006) kísérletei is, ahol a szkarifikált, friss *Astragalus arpilobus* és *Astragalus hamosus* magvak nagyobb csírázási százalékat mutattak, mint a kezeletlenek.

Az *Astragalus glycyphyllos* friss magvainál általában csak szkarifikáció után indul meg a csírázás (DENO, 1993), akkor viszont akár 90-100%-os csírázási arány is elérhető (RBG). A magok élettartamára vonatkozóan ellentmondásosak a szakirodalmi adatok. Egy belga kutatás során (GODEFROID et al. 2010) a 21 évnél fiatalabb, szkarifikált magoknál 74-84%-os csírázást tapasztaltak, míg egy másik vizsgálatban 30 év laboratóriumi tárolás után már csak 25%-os csírázást tudtak csak elérni (HARRINGTON, 1972). Ez ugyanakkor még mindig magasabb, mint amit a hazai kutatók tapasztaltak (CSONTOS et al. 2006), ahol a 36 éves magok már egyáltalán nem, míg a 33 éves magok is csak 3,3-4,1%-ban csíráztak. A 16 éves magok egyáltalán nem csíráztak, ami rámutat arra, hogy a csírázási képesség nem csak a

magok korától függ. A fenti kísérletek alapján elmondható, hogy a faj 30 évig életképes maradhat, azonban mivel minden kísérletben szkarifikált magokat használtak, így arra nincs adat, hogy a keménymaghéjúság milyen mértékben oldódik fel.

Az *Astragalus cicer* friss szkarifikált és nem szkarifikált magjai egyaránt 95% körüli csírázást mutatnak (RBG). Egy hazai kutatócsoport (CSONTOS et al. 2006) erre a fajra vonatkozó kísérletében a 36 éves magok szkarifikálást követően 68%-ban kicsíráztak, de már kezelés nélkül is 10,5%-os csírázást mutattak, ami a keménymaghéjúság bizonyos fokú feloldódására utal. Ebből a kísérletből is kiderül, hogy a gyűjtés helye és klimatikus adottságai nagyban befolyásolhatják az eredményeket: a 17 éves magok kezelés nélkül egyáltalán nem, szkarifikálva 20,4%-ban csíráztak, míg az egy évvel idősebb, de más helyszínről származók kezelés nélkül 7,4%-ban, szkarifikálva pedig több mint 50%-ban csíráztak. Ez a különbség nem magyarázható pusztán a magok korának eltéréseivel.

Kanadai kutatók (ACHARYA et al. 1993) vizsgálatában a kézzel gyűjtött friss magok 95%-ánál, míg a géppel aratottak esetében 85%-nál tapasztaltak keménymaghéjúságot. Ebből következik, hogy jelentős fizikai dormanciával rendelkezhetnek a faj magjai, azonban ez



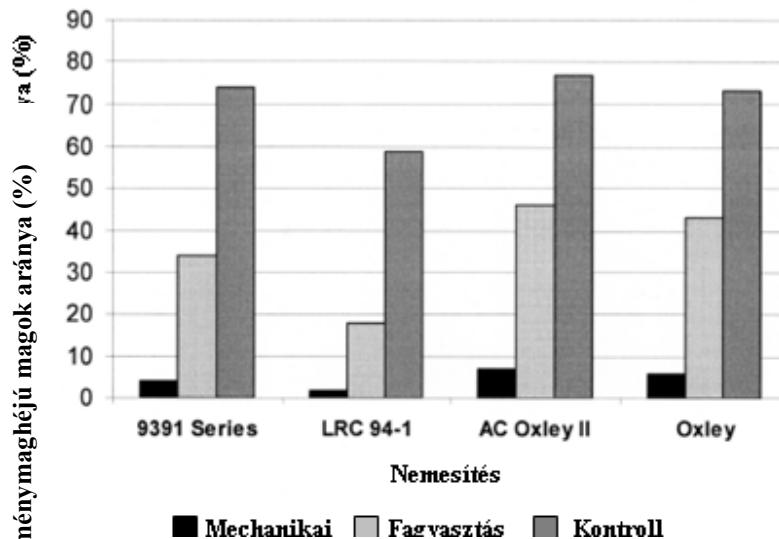
3. ábra: *Astragalus cicer* 0-19 éves magjainak kezelés nélküli csírázása. Kezelés nélkül csírázott (csírázott), szkarifikáció után csírázott (keménymaghéjú) és nem csírázott (nem életképes). ACHARYA et al. (2006) nyomán

éves tárolása után ez 67%-ra nőtt.

Egy későbbi vizsgálat során (ACHARYA et al. 2006) a dormancia feloldására több módszert is teszteltek (mechanikai roncsolás, fagyasztás folyékony nitrogénnel), melyek közül a legeredményesebbnek a szkarifikáció bizonyult (4. ábra).

CSERESNYÉS-BÓZSING (2010) kísérletében üde és száraz élőhelyről gyűjtött

mechanikai károsítás következtében többé-kevésbé feloldható. A géppel szedett friss magok 14%-a csírázott kezelés nélkül és ez 10 év tárolás után 79%-ra nőtt. Mindez azt mutatja, hogy a keménymaghéjúság idővel természetes módon is feloldódik a fajnál (3. ábra). Ezt támasztja alá CARLETON et al. (1971) korábbi vizsgálatai is, ahol a kézzel gyűjtött magok 11%-a csírázott kezelés nélkül, de a magtétel 14



4. ábra: Különböző kezelések (mechanikailag roncsolás illetve fagyasztás) hatása a fizikai dormanciára az *Astragalus cicer* nemesített változatainak magtétteleiben. (ACHARYA et al. 2006)

A. cicer magokat egy szárazabb és egy nedvesebb évben. Azt tapasztalta, hogy a szárazabb évben nem volt eltérés a két élőhelyen gyűjtött magok tömegét tekintve, azonban a csapadékosabb évben a szárazabb élőhelyen nagyobb tömegű magokat mért. A szárazabb évben élőhelytől függetlenül közel 50%-os volt a dormans magok aránya, viszont a szárazabb élőhelyen kétszer annyi életképtelen mag termett, mint az üde élőhelyen. Ugyanakkor csapadékosabb évben az életképtelen magok aránya nem változott, de a dormans magok aránya erősen lecsökkent.

Az *Astragalus exscapus* esetében a tárolásra vonatkozó adatok hiányosak, s mindössze azért sorolják az ortodox magvú fajok közé, mert ez általánosan jellemző az egész nemzetségre (RGB). A faj friss magvai természetes körülmények között is csak nagyon alacsony mértékben csíráznak (BECKER, 2010; NOVÁK & PRACH, 2010). A szakirodalomban nem találtunk adatot régebbi magok csírákéességéről, de feltételezhető, hogy a friss magokhoz hasonlóan ez is rendkívül alacsony lehet.

A *Trifolium arvense* akár 2300 méter tengerszint feletti magasságon is megtalálható egy, esetenként két éves pillangósvirágú növény. Elterjedési területe Közép-Európától Szibériáig tart, száraz talajú réteken, parlagokon virágzik májustól szeptemberig (BOJŇANSKY & FARGAŠOVÁ, 2007). Magjai szintén ortodox típusúak (RBG). Csírázásáról meglehetősen kevés információ áll rendelkezésünkre. Egy korábbi vizsgálat során 20%-os csírázást mutattak a faj 68 éves magjai (BEQUEREL, 1934). Recens vizsgálatokban a 16 éves magvak akár 97%-ban is csírázhatnak, mely során a mechanikai szkarifikáció magasabb csírázási százalékot eredményezett, mint a kémiai (RGB).

Későbbi protokoll kidolgozás céljából, valamint a herbáriumi magok életképességének szélesebb körű tesztelése okán a *Resedaceae* családba tartozó *Reseda lutea*-t és *Reseda phyteuma*-t, valamint a *Brassicaceae* családba tartozó *Thlaspi arvense*-t is csíráztattuk. Mindhárom faj magjai az ortodox kategóriába sorolhatóak (RBG), így várhatóan hosszabb ideig csíráképesek maradnak, azonban a szakirodalmi adatok ellentmondásosak, a dormancia típusával kapcsolatban sem egyértelműek, ezért ez fenntartásokkal kezelendő.

A *Reseda lutea* L. (vad rezeda) a mediterráneumban, Közép-Európában, Ázsiában, Nyugat-Afrikában és Észak-Amerika egyes területein őshonos kétéves, vagy évelő lágyszárú faj, mely gyomtársulásokban gyakori. Virágzása májustól szeptemberig folyamatos, toktermésében sok, apró mag található.

A *Reseda phyteuma* L. (terpedt rezeda) egyéves, ritkábban évelő, 10-50 cm magasságú lágyszárú. A mediterráneumban és Kelet-Európában honos. A száraz, bolygatott gyepeket kedveli, néha utak mentén is megtalálható. Június és augusztus között virágzik.

A *Thlaspi arvense* egy- vagy kétéves, 10-50 cm magasra növő lágyszárú növény. Euráziában őshonos, gyepekben és utak mentén, zavart élőhelyeken gyakori (BOJŇANSKY & FARGAŠOVÁ, 2007).

A *Reseda lutea*-val kapcsolatos magbiológiai kutatások igen hiányosak a szakirodalomban, ugyanakkor bizonyított, hogy a faj magjai érésük után igen mély dormans állapotba kerülnek (EBRAHIMI et al. 2010). Kísérleteik alapján úgy tűnik, ez egyfajta fizikai dormancia, és a szerzők ennek megtörésére a legalkalmasabb módszerként a magok 30 másodperces kénsavas áztatását javasolják (EBRAHIMI et al. 2013).

A friss magok konstans hőmérsékleten (~25°C), napfényben kifejezetten alacsony, míg sötétben nagyobb (közel kétszer akkora) csírázási hajlandóságot mutatnak (DOGAN et al. 2002). Ezt TORMA (1998), valamint TORMA & HÓDI (2000) kutatásai is megerősítik. A Royal Botanical Garden vizsgálatai alapján közel 100%-os csírázás is elérhető hosszabb sötétperiódus mellett a 12 évnél fiatalabb magok esetén. Ugyanebben a kísérletben egyes tételeknél alkalmaztak szkarifikációt is (kontroll adat nincs), és bár a csírázás 80-100% között változott, arra vonatkozóan nincs adat, hogy a csírázás mértékét befolyásolta-e a mag kora. 250 mg/l gibberellin-sav hozzáadásával a nem szkarifikált magok közel 80%-os eredménnyel csíráztak, mely szkarifikációval kombinálva növelte a csírázási erélyt, ugyanakkor itt sincs pontos adat a magok korára nézve (RBG).

A *Reseda phyteuma* csírázásáról és a magok életképességéről nem találtunk adatokat a szakirodalomban. A *Thlaspi arvense* csírázási biológiája is csak részben feltárt, s a vizsgálatok többségében friss magtégeket használtak. Míg egyes irodalmak a fényben való csíráztatást

tartják hatékonynak (BEST & MCINTYRE, 1975), addig más vizsgálatokban (ANDERSSON & MILBERG, 1998; RGB) nem mutatható ki különbség az eltérő fényviszonyok mellett. A fotoperiódus változtatásán kívül a csírázás KNO_3 hozzáadásával (SANINI et al. 1987), vernalizációval (hideghatás) (BASKIN & BASKIN, 2004) és szkarifikációval (WAGENVOORT & VAN OPSTAL, 1979) is javítható. Mindezen források azonban friss magtétélek vizsgálatára épültek, így az idősebb magok csírázásáról egyáltalán nincs adat.

A vizsgált fajok magbiológiájának áttekintése alapján úgy tűnik, hogy még mindig sok a megválaszolatlan kérdés, ezért vizsgálataimmal ezek részleges megválaszolására teszek kísérletet.

3. Anyag és módszer

3.1. Magok eredete, dokumentációja

Az előkísérlet során felhasznált maganyag döntő hányada a Magyar Királyi Állatorvosi Főiskola növénygyűjteményének herbáriumából származott. A herbáriumban 280 taxon példányai találhatóak meg, melyek nevezéktani revideálását a Növénytani tanszéken végeztük el. Erre azért volt szükség, mert sok taxont még az 1900-as évek elején gyűjtöttek be és a tudományos név azóta többször megváltozhatott. A munkát elsődlegesen KIRÁLY (2009) munkája alapján végeztük. Amennyiben egy régebben használatos név ez alapján már nem volt visszakövethető, a theplantlist.org webes adatbázist használtuk.

Az előkísérletek után a vizsgált fajok archív maganyagát kiegészítettük újabb időpontokból származó tételekkel, valamint új fajokat is bevontunk a vizsgálatba. A bővített maganyag elsősorban a Szent István Egyetem Növénytani és Ökofiziológiai Intézetéből (Gödöllő), a Debreceni Egyetem „Soó Rezső Herbáriumából” (TAKÁCS et al. 2014), és az egri Eszterházy Károly Főiskola herbáriumából (PÉNZESNÉ et al. 2013) származott. Ezt egészítettük ki friss gyűjtések anyagaival is, melyek egy része külföldi botanikus kertekkel történt magcseréből származtak.

A herbáriumi lapokon lévő növényekről eltávolítottuk a termések egy részét, majd szike és borotvapenge segítségével kinyertük és megtisztítottuk a magvakat. A megszámlált magtégeket felhasználásig papírzacskóban, száraz, szobahőmérsékletű helyen tároltuk.

3.2. Az előkísérlet

Az előkísérlethez kizárólag pillangósvirágú fajokat választottunk ki (1. melléklet), törekedve az életmenet-stratégiák sokféleségére (lásd 2.1 fejezet). A vizsgált fajok minden egyes magtételéből 35-35 db mag tömegét egyesével lemértük Mettler Toledo AT261 Delta Range analitikai mérlegen. A tömeg meghatározása milligrammban történt, két tizedes jegy pontossággal, majd ezek alapján becsültük az egyes tételek átlagos magtömegét. A két tizedesjegy pontosság szükségességének oka egyes magok rendkívül apró mérete volt, ami miatt már egy tizedesjegy elhagyása is jelentős információvesztést okozott volna. A tömegmérések egy részét nem minden esetben ugyanaz a személy végezte, így később statisztikai módszerekkel ellenőriztük, hogy van-e különbség a mérést végző személyek eredménye között. Ehhez minden személy ugyanazt a 16 magot mérte le. Ezt a mérleg nagy érzékenysége tette szükségessé, mivel a folyamatosan mozgó tömegértékek miatt nehéz volt eldönteni adott mag valós tömegét. Akkor tekintettük valós tömegértéknek az adott számot,

ha a mérleg 5 másodpercig ugyanazt az értéket mutatta változatlanul. Mivel ebben az értékben különbségek lehettek az egyes személyek mérése során, így szükség volt azok megegyezésének vizsgálatára.

A csíráztatási elrendezést irodalmi adatok figyelembe vételével (RBG; JAYASURIJA et al. 2013) dolgoztunk ki a lehető legnagyobb mértékű csírázási hatékonyság elérése érdekében, a legminimálisabb kezelés mellett. Magtételenként 2 x 30 darabos mintát vettünk, melyből az első csoportot kezeltük a fizikai dormancia megtörésének érdekében, míg a másik 30-at kontrollként, kezelés nélkül csíráztattuk. Bizonyos esetekben nem volt elérhető a 60 darab mag, ekkor vagy csak kontrollként csíráztattunk, vagy 30 helyett valamivel kevesebb magot használtunk mind a kezelt, mind a kezeletlen csoportokban. A kezelt és a kezeletlen csoportok mintaelemszáma minden esetben megegyezett.

A dormancia megtörésére elsősorban a legelterjedtebb módszert, a szkarifikációt (maghéj fizikai megsértését) használtuk. Ez a magok méretétől függően borotvapengével vagy szikével, egyesével történt. Mivel szkarifikált magnak csak azt tekintettük, melyen szabad szemmel is jól látható vágást sikerült ejteni, így minden kezelt mag bizonyosan megsérült. Ezeket a magokat két napra, a különböző magtételleket elkülönítve, csapvízbe áztattuk. Két nap után feliratozott Petri-csészébe helyeztük a mintákat.

Emellett egy tétel esetén (*1. melléklet*) teszteltük a szakirodalomban szintén használt forrázásos módszert is. Ennek során a mintát szűrőbe tettük és forrásban lévő (100 °C) csapvizet engedtünk rá néhány másodpercig.

A Petri-csészéken feltüntettük a taxont, a gyűjtési helyet és időt, a benne elhelyezett magok számát és a kezelés típusát (szkarifikált-SZK, kontroll-K, forrázott-F) is. A Petri-csészéket többrétegű itatóspapírral béleltük ki, melynek vége túllógott a csésze szélén, így a vízutánpótláshoz nem volt szükség az üvegtető felemelésére, elkerülve ezzel az esetleges kórokozók kívülről való bekerülését. A tálcákat egy kizárólag természetes fény által megvilágított, részben üvegfalú, szobahőmérsékletnél valamivel alacsonyabb átlaghőmérsékletű szobában helyeztük el. A tálcákat időnként elforgattuk, hogy kizárjuk az eltérő megvilágítás okozta különbségeket.

A magokat naponta ellenőriztük, feljegyezve az időpontot, a pontos hőmérsékletet és a magok állapotát. A hőmérsékletet direkt napsugárzástól védett helyen elhelyezett higanyos hőmérővel mértük. Az egyes magoknál négy állapotot különítettünk el: duzzadt (D), csírázó (Cs) és változást nem mutató (Ø). Csírázásnak a sziklevek fejlődésének megindulását tekintettük. Az esetlegesen megpenészedett magokat eltávolítottuk a Petri-csészékből. A

kezeletlen csoportokban a csírázást és vízfelvételt nem mutató magokat kiszárítottuk majd szkarifikáltuk, és újracsíráztattuk.

3.3. Módosított kísérleti elrendezés

Az előkísérlet tapasztalataira alapozva egy második kísérlet-sorozatot is végeztünk, bővített magállománnyal (3.1. fejezet), módosított kísérleti elrendezéssel. Mivel sokszor csak kevés mag állt rendelkezésre (2. táblázat), csak a kereszttel jelölt tételeknél csíráztattunk kontroll és kezelt csoportokat is, a többi esetben csak szkarifikált csoportot használtunk.

A csíráztatást megelőzően az előkísérlethez hasonlóan minden mag tömegét egyesével lemértük.

A csíráztatáshoz a jobb, egyedi nyomon követhetőség érdekében a laborokban használatos ELISA-plate-et használtuk Petri-csészék helyett, így a magok tömegének és csírázókéességének potenciális összefüggése közvetlenül kimutatható. Az egyes lemezeket sorszámoztuk, illetve feltüntettük a kezelés típusát (kontroll/szkarifikált) is. A magok egyedi kódot kaptak, amely magába foglalta a magot tartalmazó plate sorszámát, a kezelés módját, illetve a mag elhelyezkedését a lemezen. (5. ábra).

A csíráztatás az előkísérlettel megegyező környezeti paraméterek mellett történt, az ELISA plate rekeszeit teljesen feltöltve csapvízzel, de a csíráztatás menetén módosítottunk. Az első kísérletek során minden vizsgált magot

2. táblázat: A módosított elrendezésben használt *Astragalus* magtétel szarmazási helye és gyűjtési ideje (n = magok száma kezelésenként)

Fajnév	Gyűjtés helye	Gyűjtés ideje	n
<i>A. cicer</i>	Farkasvölgy	1877.09.	21
<i>A. cicer</i>	Kelenföld	1905.08.	23
<i>A. cicer</i>	Tarcal	1921.07.	16
<i>A. cicer</i>	Tápiógyöngye	1924.07.	35
<i>A. cicer</i>	Szentendre	1925.08.	36
<i>A. cicer</i>	Újkenéz	1933.08.	12
<i>A. cicer</i>	Gyöngyös	1935.07.	21
<i>A. cicer</i>	Sárfolyósziget	1940.08.	11
<i>A. cicer</i>	Fonyód	1949.07.	16
<i>A. cicer</i>	Strasbourg	1992.06.	36+
<i>A. cicer</i>	Leghia	2012.	19
<i>A. cicer</i>	Seregélyes”A”	2013.07.	36+
<i>A. cicer</i>	Seregélyes”B”	2013.07.	24+
<i>A. glycyphyllos</i>	Eger	1867.06.	28
<i>A. glycyphyllos</i>	Debrecen	1900.08.	30
<i>A. glycyphyllos</i>	NA	1908.07.	24
<i>A. glycyphyllos</i>	Debrecen	1949.10.	30
<i>A. glycyphyllos</i>	NA	1992.06.	30
<i>A. glycyphyllos</i>	Románia	2004.	30
<i>A. exscapus</i>	Németország	1922.06.	4
<i>A. exscapus</i>	Eisenstad	1925.06.	16
<i>A. exscapus</i>	NA	1949.05.	33
<i>A. exscapus</i>	Pest	1950.08.	16
<i>A. exscapus</i>	Ságliget	1950.08.	6



5. ábra: ELISA-plate. A piros pont kódja: 007KC1

szkarifikáltunk, majd átlagosan 10 nap csíráztatás után a ki nem csírázott magokon TTC tesztet végeztünk.

A második kísérletsorozatban a magokat először kizárólag kezelés nélkül csíráztattuk. A változásokat két hétig követtük nyomon, a kicsírázottakat további vizsgálatok céljából kineveltük, a megduzzadtakat a csírázási idő letelte után TTC-tesztnek vetettük alá. A változást nem mutató magokat pedig szkarifikáltuk és további két hétig csíráztattuk, majd a ki nem csírázott magokon szintén TTC-tesztet végeztünk.

A TTC-teszthez használt 1%-os, 7-es pH-jú TTC-oldat elkészítése ELLIS et al. (1985) alapján történt. Először 0,3631 g KH_2PO_4 -et és 0,7126 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ -t oldottunk fel 40, illetve 60 ml desztillált vízben, majd a két oldatot összeöntöttük. Ezek után 10 g 2,3,5-trifenil tetrazolium-kloridot adtunk hozzá a keverékhez és feloldottuk benne. A festésre kiválasztott magokat 24 órán át áztattuk az oldatban, majd kiemeltük és kettévágtuk őket. A festődés mértékét és mintázatát fénymikroszkóppal értékeltük. A csírázási képesség meglétét a festődési mintázat jobban meghatározza, mint a színeződött sejtek aránya, azonban az általunk vizsgált fajokra csak családszintű festődési térkép van kidolgozva, ezért a csírázókéesség megállapítása a mintázat alapján bizonytalan. Emiatt a későbbi pontosítás érdekében a festődési mintázatról fényképeket készítettünk (6. ábra).



6. ábra: Festődési mintázatok. A 004SZKD2 és a 004SZKE2 festődött, de csak a másodikonál jól elkülöníthető a mintázat. A 001SZKA3 nem festődött.

A herbárium magok életképességének szélesebb körű teszteléséhez további kísérleteket végeztünk a *Resedaceae* családba tartozó *Reseda lutea* és *Reseda phyteuma* valamint a *Brassicaceae* családba tartozó *Thlaspi arvense* magjaival is (3. táblázat). A *Reseda* fajok esetén a kontroll a természetes megvilágítást kapott, míg a kezelt egy sötétben csíráztatott csoport volt a szakirodalomban ajánlottaknak megfelelően (DOGAN et al., 2002). Változó mintaelemszámú csoportokkal dolgoztunk, azonban az egy tételhez tartozó kezelt és kezeletlen csoportokban megegyezett a magok száma. A *Thlaspi arvense* esetében a rendelkezésre álló tételek alacsony mintaelemszáma miatt csak kezelés nélküli csoportokat hoztunk létre.

A csíráztatás ezekben az esetekben is az előkísérletekben beállítottakkal megegyező környezeti paraméterek mellett történtek, Petri-csészékben. Ez alól csak a sötét-kezelésű *Reseda*-csoportok tekinthetők kivételnek, ahol a Petri-csészéket alufóliával lefedtük és fiókokba zárva tartottuk. A *Reseda* magok nagymértékű penészedése miatt fertőtlenítést is alkalmaztunk. Ehhez 1 g/l töménységű H₂O₂-oldatban 30 másodpercig áztattuk a magokat egyesével, majd a fentiek szerint újracsíráztattuk őket.

3. táblázat: *Reseda* és *Thlaspi* fajok magtételleinek származási helye és gyűjtési időpontja (n = magok száma kezelésenként)

Fajnév	Gyűjtés helye	Gyűjtés ideje	n
<i>Reseda phyteuma</i>	Pilis	1905	30
<i>Reseda phyteuma</i>	Gödöllő	1959	34
<i>Reseda phyteuma</i>	Gödöllő	1976	29
<i>Reseda lutea</i>	Budapest	1897	30
<i>Reseda lutea</i>	Románia	1908	30
<i>Reseda lutea</i>	Strassberg	1914	30
<i>Reseda lutea</i>	Dunaharaszti	1924	30
<i>Thlaspi arvense</i>	Dorozsma	1926	27
<i>Thlaspi arvense</i>	Sopronbátfalva	1934	25
<i>Thlaspi arvense</i>	Kerepes	1911	29
<i>Thlaspi arvense</i>	Predeal	1906	30

3.4. Statisztikai elemzések

A statisztikai elemzések során az R statisztikai programot használtam (R Development Core Team, 2012). Az egyes személyek által mért értékek eltéréseit ismételhetőséggel teszteltem (ICC=Intraclass Correlation Coefficient).

Ezen kívül kiszámítottuk az egyes Petri-csészékhez tartozó csírázási százalékokat, a szkarifikált és kontroll csoportokat külön-külön tekintve. A csírázási százalékok összehasonlításánál Khi-négyzet tesztet homogenitás vizsgálatára, illetve Fisher-féle egzakt tesztet használtam, attól függően, hogy a várt értékek nagyobbak voltak-e, mint 5.

4. Eredmények

4.1. Módszertani eredmények

Figyelembe véve a szakirodalmat és az előkísérletek tapasztalatait, a herbáriumokból származó magok csíráztatása kapcsán a következő megállapításokat tehetjük.

Javasoljuk a csíráztatás előtt a magok egyedi lemerését, mely egyrészt lehetővé teszi a gyenge minőségű, erősen sérült vagy láthatóan léha magok kisselektálását, másrészt adatot szolgáltat a magtömeg-csírázási képesség összefüggésének vizsgálatához.

Fontos, hogy hasonló herbáriumi vizsgálatok esetén sokszor nem áll rendelkezésre olyan nagyságú mintaelemszám, melyet az általános magvizsgálati protokollok elvárnak, azonban törekedni kell egy minimum 30 magból álló mintára, és fokozottan figyelni kell, hogy a legjobb csíráztatási módszert alkalmazzuk, hogy maximalizáljuk a csíráztatás hatékonyságát. Ezzel együtt is tisztában kell lenni a módszer korlátaival, és hogy kis mintaelemszám esetén mindez csak arra lehet alkalmas, hogy a potenciális élettartamot becsüljük, komolyabb összehasonlításokra alkalmatlan.

A Petri csészés csíráztatás számos hátránnyal járt. Az egyik legnagyobb probléma volt a magok egyedi nyomon követhetőségének hiánya. Emellett a penésszel történő átfertőződés veszélye igen nagy volt, a fertőzött magok eltávolítása után is gyakran tovább fertőződtek az egészséges magok. A teljesen lezárt, kilógó itatóspapírral ellátott Petri-csészék használata javasolható, ugyanakkor a bevitt magokat is fertőtleníteni kell a fajnak megfelelő fertőtlenítőszer optimális ideig történő használatával. Ugyan a *Reseda phyteuma* egyes tételei esetén használtunk hidrogén-peroxidos fertőtlenítést, azonban ez sem szüntette meg a penészedést. Épp ezért a fertőtlenítés módjának meghatározása külön kutatások alapját képezheti.

A fentiek miatt javasoljuk az ELISA-plate-en történő csíráztatást. Ebben az esetben minden mag egyedi kódszámot kap, így minden további vizsgálatban a beazonosítás lehetővé válik. Mivel minden mag egy különálló rekeszben van, penészedés esetén a gombahifa nem jut át a szomszédos cellákba. A penészes mag könnyen eltávolítható, és kisebb az átfertőződés esélye.

A különböző időpontokból származó megtételek esetében különböző mértékű maghéjkeménységet feltételeztünk. Azonban ha egy tételből származó magok különböző kezelést kapnak (kontroll és szkarifikált), az adott tételből már nem tudjuk megállapítani a keménymaghéjúság mértékét, ugyanis a csírázás elmaradása a kezelés nélküli csoportban nem

vezethető vissza egyértelműen a maghéj keménységére, ezáltal a két minta nem vethető össze e tekintetben. Épp ezért minden tételt először kizárólag kezelés nélkül csíráztattunk.

Ez alapján a magok állapotának leírására három kategóriát alkalmazhatunk.

1. Változást nem mutató magvak: ebben az esetben a keménymaghéjúság még jelen van, emiatt a mag nem képes felvenni vizet.
2. Duzzadt magvak: a kemény maghéj feloldódásával a vízfelvétel lehetővé válik, ami biztosítja a mag potenciális csírázását.
3. Csírázott magvak: a keményhéjúság feloldódott és a sziklevel megjelenésével az embrió bizonyítottan életképes, kinevelésre alkalmas.

A megpenészedett magokat is feljegyeztük, ami szintén információt adhat a maghéjkeménységről.

A csírázás elmaradása a duzzadt magok esetén nem jelenti a mag életképtelenségét. A csíráztatásos módszer egyik hátránya, hogy a potenciálisan csíráképes magokat alulbecsli (lásd 2.2. fejezet). Épp ezért szükséges a protokollba beépíteni az életképesség tesztelésére szolgáló egyéb módszert is.

A megduzzadt, nem penészes és ki nem csírázott magokon ezután kémiai életképesség-vizsgálat javasolt (TTC-teszt). Ennek segítségével elválaszthatóak az anyagcserével rendelkező magok az élettelenektől. A teszt során figyelembe kell venni a fajra jellemző festődési mintázatot. Annak hiányában az eredményeket a rokon fajokra, esetleg a nemzetségre (családra) jellemző festődéssel kell összevetni. Mivel a *Fabaceae* család magjainál a keményhéjúság általánosan jelen van, magasabb (1%-os) oldatkonzentrációt javasolunk.

A változást nem mutató magokat ezután szkarifikálni kell, majd megismételni a csíráztatást. A szakirodalom többféle módszert javasol a fizikai dormancia megtörésére. Az előkísérletek során használtunk forrázásos eljárást is, azonban ennek hatékonysága jóval elmaradt a pengével történő maghéjroncsoláshoz képest (2. melléklet). Így a *Fabaceae* család fajai esetén kizárólag az utóbbi módszert javasoljuk.

A csíráztatás második lépése során szintén három kategóriát különíthetünk el, azonban ezek más jelentéssel bírnak a magok állapotára nézve.

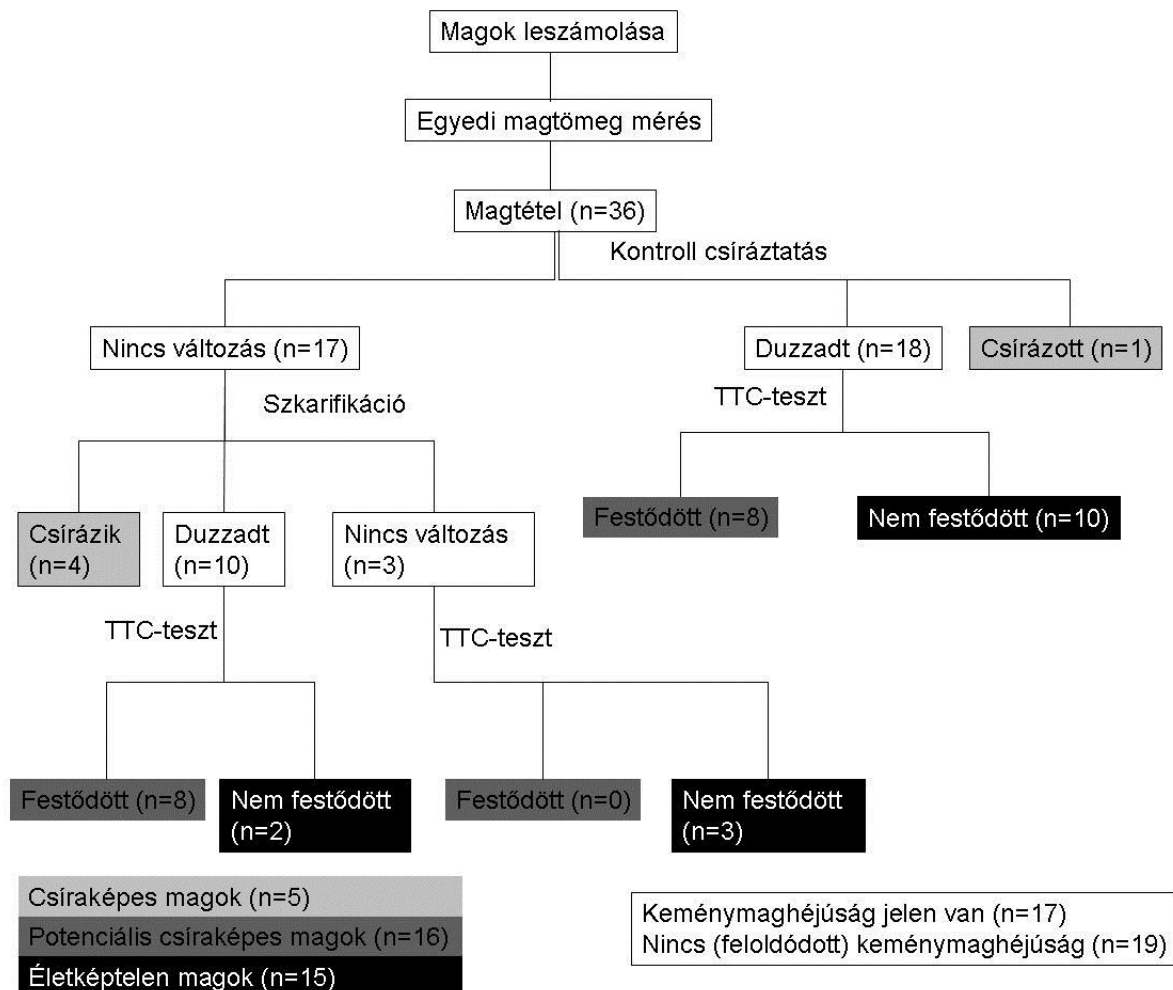
1. Változást nem mutató magvak: a keménymaghéjúság feloldása ellenére a mag életképtelen
2. Duzzadt magvak: a keménymaghéjúság jelent volt, ezt a szkarifikációval megszüntettük, azonban a magok csak potenciálisan életképesek

3. Csírázott magok: a keménység jelen volt, de a szkarifikáció ezt megszüntette, így a mag fejlődésnek indulhatott, és a sziklevele megjelenésével az embrió bizonyítottan életképes, kinevelésre alkalmas.

A nem csírázott magok esetén itt is javasolt a TTC-teszt a potenciális életképesség meghatározásához. Minden olyan mag, amely a csíráztatás bármely stádiumában megpenészedett, életképtelennek tekinthető függetlenül a keménymaghéjúságnak mértékétől.

Ez alapján egy tételből pontosabban meghatározható a bizonyítottan életképtelen, a potenciálisan életképes és a ténylegesen csíráképes magok aránya. Ezek segítségével a különböző tételek összehasonlíthatóak lesznek a felsorolt kategóriák alapján. E mellett megállapítható a keménymaghéjúság aránya is a vizsgált tétel esetében.

Mindezeket figyelembe véve a 7. ábrán szemléltetjük az általunk javasolt csíráztatási protokollt, valamint az eredmények könnyebb értelmezést segítő egy hipotetikus példát is.



7. ábra Javasolt csíráztatási protokoll herbáriumi pillangósvirágú fajok esetében

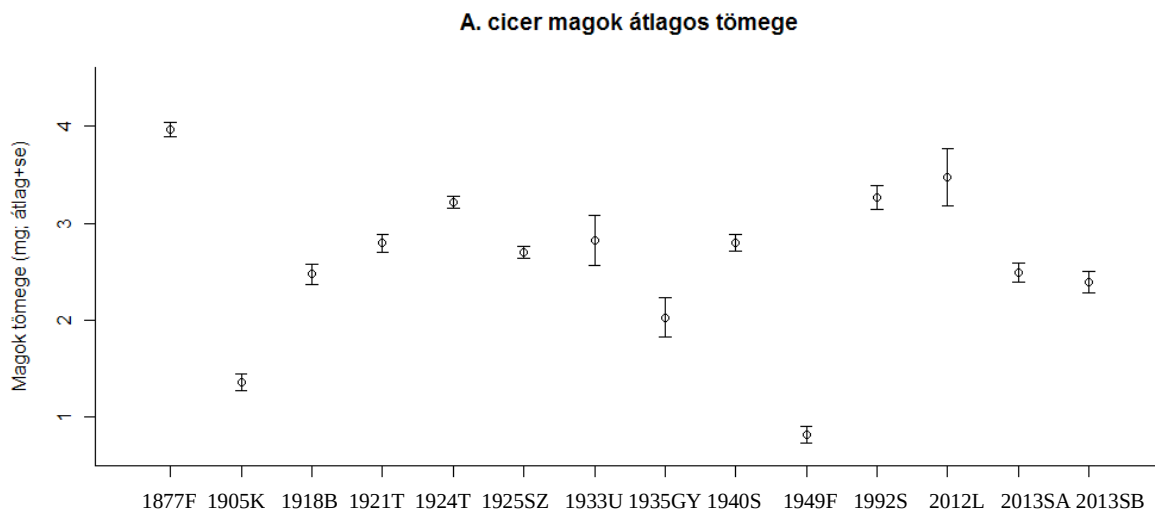
4.2. *Biológiai eredmények*

A teljes kísérletsorozat alatt (beleértve az előkísérletet is), 2276 magot csíráztattunk. Az *Astragalus contortuplicatus* magjait kizárólag az előkísérlet során csíráztattuk, így ennek eredményeit (2. melléklet) csak vázlatosan ismertetem. A szkarifikált csoportból 1914/15-ös tételből 4 csírázott ki (12,90%), az 1918-as magok közül egy sem, a friss (2011) tételből viszont mindegyik (100%). A kontroll csoportokban a legidősebb magok egyáltalán nem csíráztak, de 15 db magnál itt is vízfelvételt tapasztaltunk, azaz a keménymaghéjúság 51,61%-os. Az 1918-as magok esetében egy csíra jelent meg (3,33%), emellett további 13 mag megduzzadt, amelyből 2 összeesett, tehát 16 mag esetén (53,33%) maradt fenn a keménymaghéjúság, 2 mag pedig biztosan nem volt életképes a vízfelvétel ellenére. A friss magok közül 5 mag csírázott ki (15,15%), a többi magnál duzzadást nem tapasztaltunk, így a keménymaghéjúság 84,85%-ban volt jelen.

Összehasonlítva a csírázási eredményeket, azt tapasztaltuk, hogy a két régebbi magtétel esetén nincs szignifikáns eltérés a kontroll és a szkarifikált csoportok csírázása között (Fisher-féle egzakt próba; $p > 0,1$), de a 2011-es magtételnél a kezelés szignifikánsan megnövelte a csírázási arányt (Khi-négyzet teszt; $p < 0,001$). Ez alapján úgy tűnik, hogy 90 év után már erősen lecsökken a keménymaghéjúság. Ezt bizonyítja a 2. mellékletben bemutatott ábra is. Mivel az előkísérlet során nem volt lehetőség egyedi nyomon követésre, a csírázás/duzzadás magtömeggel való összefüggését nem vizsgáltuk.

Az *Astragalus cicer*-nél összesen 503 mag került csíráztatásra. Az előkísérletet ismét csak röviden ismertetjük. Az 1918-ból származó (1. melléklet) tételnél csak kontroll csoportot hoztunk létre a kevés rendelkezésre álló mag miatt. A 23 magból 18 mag megduzzadt, ezek közül 2 megpenészedett, így a keménymaghéjúság csak 21,74%, 2 mag pedig biztosan életképtelen volt. Az 1925-ös szkarifikált magok közül 3 csírázott (11,11%), míg a kontroll esetében csírázás nem történt, de 18 mag megduzzadt, ami 33,33%-os keménymaghéjúságot feltételez. Az 1940-ből származó kezelt magoknál szintén nem történt csírázás, míg a kontroll esetében 12%-os keménymaghéjúságot tapasztaltunk. Az egyedi azonosítás hiányában a tömeggel való összefüggés vizsgálata ebben az esetben sem volt elvégezhető.

A módosított kísérletben mért adatokkal összevonva, az átlagos magtömeg (8. ábra) látszólag nem mutat összefüggést a magok korával. Ugyanakkor a magok tömege sok esetben nem normális eloszlású az egyes csoportokban (például a 9. ábrán bemutatott csoportnál), így az egyes magtételek átlagos tömege csak az adatok transzformálása után hasonlítható össze statisztikai próbákkal, amit a kutatás későbbi szakaszában tervezünk elvégezni.



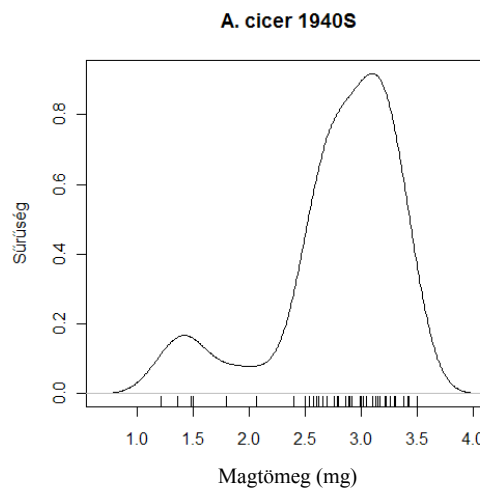
8. ábra *Astragalus cicer* tételek magtömeg adatai (átlag, szórás)

A módosított protokoll szerinti csíráztatás eredményeit a 10. ábra szemlélteti, melyhez felhasználtuk az előkísérletből származó adatokat is. Az 1992 előtti magtétételek egyikénél sem tapasztaltunk csírázást (kivéve az előkísérlet során). Az 1992-ben, Strasbourgban gyűjtött magok közül 7 szkarifikált kicsírázott, így 19,44%-ban biztosan életképesek voltak a magok.

A 2012-es, Leghia-ból származó szkarifikált magokból 3 csírázott ki, ezáltal 17,67%-ban életképesnek tekinthetőek, de a kizárólagos szkarifikáció miatt a keménymaghéjúság mértékéről nincs adatunk. Seregélyesről 2013-ból két különböző helyszínen gyűjtött magtétellel rendelkezünk, melyeket „A” és „B” jelöléssel különböztettünk meg. Az „A” helyről származó szkarifikált magokból 12 db (34,28%), míg a „B” helyről származó csoportból 9 (25,00%) csírázott ki,

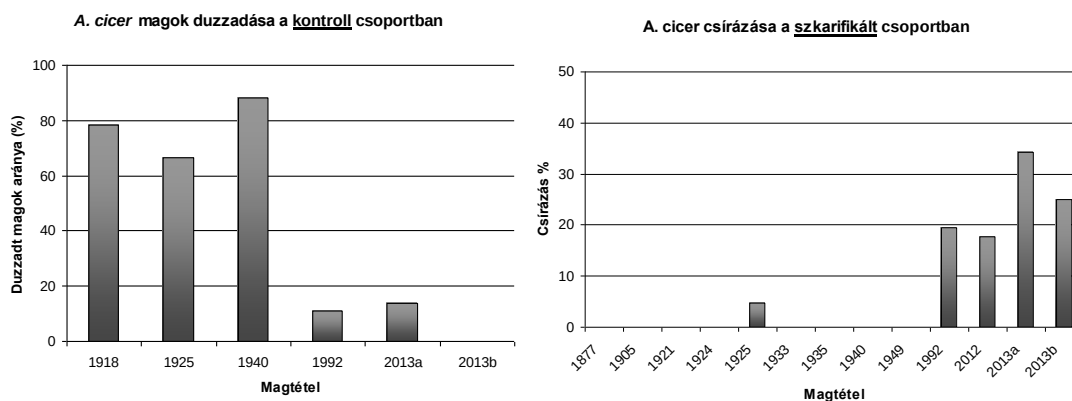
Összehasonlítva a csírázási arányokat, azt tapasztaltuk, hogy a csírázás mértéke eltérő az 1992 előtti és utáni szkarifikált csoportok esetében. Az 1992 utáni minták egymástól nem tértek el (Fisher-féle egzakt teszt; $p=0,4749$), de az 1925-ös tételtől viszont igen (Fisher-féle egzakt teszt; $p=0,0021$). A szkarifikált és kontroll csoportok csírázása között csak az 1992 utáni tétételek esetén szignifikáns a különbség ($p<0,01$).

A kontroll csoportoknál nem tapasztaltunk csírázást, de a vízfelvétel mértéke, tehát a keménymaghéjúság aránya eltérő volt az egyes csoportokban, így a keménymaghéjúság 11% és 100% között változott. Ha az 1992-es évet választóvonalnak tekintjük, akkor azt



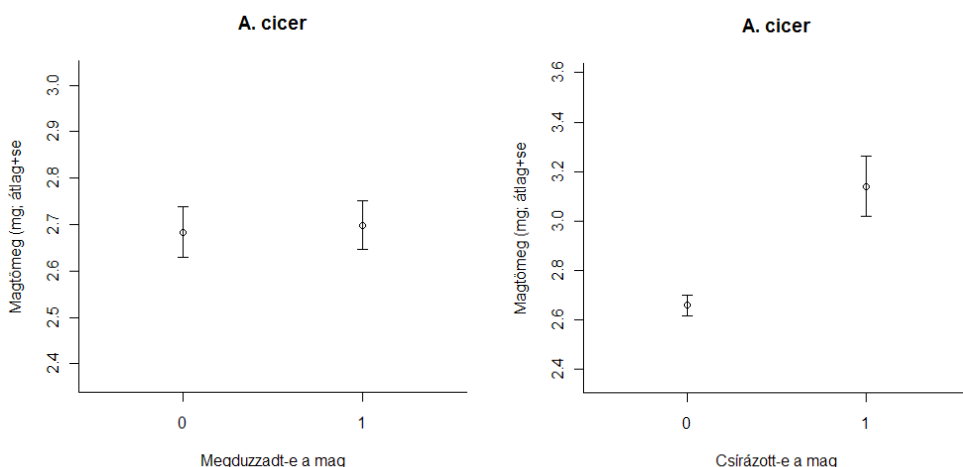
9. ábra Magtömegek kétszcúcsú eloszlása

tapasztaljuk, hogy a duzzadt/nem duzzadt magok aránya az első három időpontban nem különbözik egymástól (Khi-négyzet teszt; $p=0,1839$), mint ahogy a második három időpontból származó magtételnél sem (Fisher-féle egzakt teszt; $p=0,1642$), ellenben a két csoportban lévő arányok már különböznek egymástól (Khi-négyzet teszt; $p<0,001$).



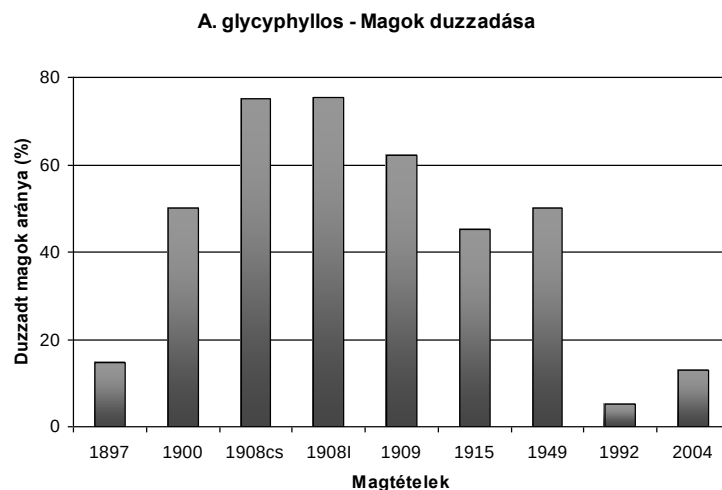
10. ábra A. cicer magok duzzadása és csírázása a magok korának függvényében

Ha összevetjük a mag tömegét a bekövetkezett duzzadással és csírázással, akkor azt tapasztaljuk, hogy a kezdeti (csíráztatás előtti) magtömeg nem befolyásolta, hogy az adott mag a csíráztatás során megduzzad-e avagy sem, azonban az eredetileg nagyobb tömegű magok magasabb arányban csíráztak (11. ábra).



11. ábra Magtömegek és csírázás összefüggése A. cicer esetében (0=nincs változás, 1=duzzadás/csírázás)

Az *Astragalus glycyphyllos* esetén összesen 376 magot csíráztattunk. A magtömegeket tekintve az *A. cicer*hez hasonló eredményeket kaptunk, tehát nem figyelhető meg időbeli trend, és az egyes tételek magtömeg-értékei nem normális eloszlásúak.

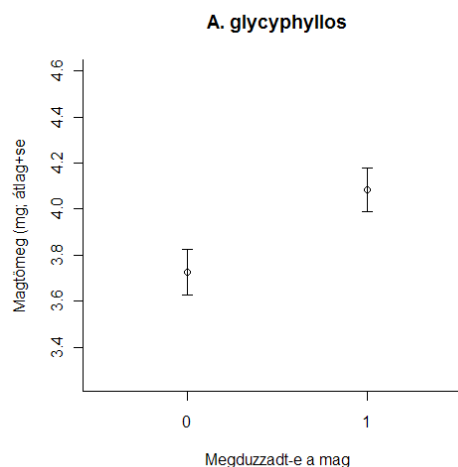


12. ábra *A. glycyphyllos* magok duzzadása a magok korának függvényében

Sem az előkísérletben használt (1. melléklet), sem a módosított kísérlet során nem tapasztaltunk csírázást még a kezelés ellenére sem, de a vízfelvétel, illetve a keménymaghéjúság mértéke eltérő volt a kontroll csoportokban (12. ábra).

Az 1897-es kezeletlen magokból 4 megduzzadt, ami 85,19%-os keménymaghéjúságot feltételez. Az 1900-as évektől 1992-ig a keménymaghéjúság 25-50% közötti, míg 1992 után 10,00-26,66% közötti értékre csökken. Emellett megállapítható, hogy a duzzadás szempontjából egymáshoz hasonló az 1897-es, 1992-es és 2004-es tétel (Khi-négyzet teszt ; $p=1425$), illetve az 1900 és 1949 közötti tételek (Khi-négyzet teszt; $p=1792$), de a két csoport különbözik egymástól (Khi-négyzet teszt; $p<0,05$).

A duzzadás és a tömeg közötti összefüggést vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a megduzzadt magok áztatás előtti tömege jóval magasabb, mint azok, melyek később nem vettek fel vizet (13. ábra).



13. ábra Magtömegek és duzzadás összefüggése *A. glycyphyllos* esetében (0=nincs változás, 1=duzzadás)

Az előkísérlet során a *Trifolium arvense* (1. melléklet) esetében csak a friss magok esetében tapasztaltunk csírázást. A nem szkarifikált csoportokban a duzzadt magok aránya eltérő volt. Az 1897-es magok esetében a keménymaghéjúság aránya 13,33%, de az 1900-as magoknál ez már 33,33%. Az 1910 és 1929 között gyűjtök magtégeleknél 70-73,33%, majd 1943 után 90% fölötti a 2012-es Bordeauxból származó magok esetében már 97%!

Az *Astragalus excapus* magjai kezeléstől függetlenül nem vettek fel vizet és nem csíráztak. A magtömegek szórása nagyon nagy mind az évek között, mind egy tételen belül (3. melléklet). A *Reseda lutea*, *Reseda phyteuma* és *Thlaspi arvense* magjai az előbb említett fajéhoz hasonlóan nem csíráztak és duzzadást sem tapasztaltunk.

A protokoll alapján szeretnénk volna megvizsgálni, hogy a ki nem csírázott magok esetében vannak-e lélegző sejtek a magban, melyek a csírázást lehetővé tették volna (potenciális életképesség). Ugyanakkor a festődött magoknál egyértelmű minta nem volt meghatározható. A magok apikális része az esetek nagy részében valamilyen mértékben megfestődött, emellett a maghéj alatt közvetlenül volt még megfigyelhető a gyakori színeződés. Mivel a szakirodalomban nem áll rendelkezésre pontos festődési mintázat, saját eredményeink ezen része jelen vizsgálathoz még nem alkalmazhatóak.

5. Diszkusszió

Az általunk javasolt csíráztatási protokoll bár hasonló elveket és lépéseket követ, mint a magokra általánosan leírt magbanki protokoll (RAO et al., 2006), néhány helyen a kutatás céljához mérten igényelte a változtatást.

Az egyik ilyen a biológiai és kémiai módszerek kombinálása, mely a friss magok esetében nem szükségszerű, de a csírázókéesség megőrzésének vizsgálatakor sokkal inkább indokolt, mivel segítségével a potenciális életképességről is képet kapunk. A másik fontos elem az első lépésként kizárólag kontrollként való csíráztatás és azt ezt követő szkarifikálás, így ugyanis megállapítható a keménymaghéjúság mértéke. Ennek szintén az életképesség-vizsgálatokban van fontos szerepe, friss magok esetében nincs jelentősége. A protokoll kidolgozása során ugyanakkor a minél nagyobb csírázási hatékonyság elérése volt a célunk. A magok egyedi lemérése a látszólag egészséges, azonban üres magok eltávolítását lehetővé teszi, és a 9. ábra alapján erre mindenképp szükség van, hogy egy homogén magállomány képezhesse a vizsgálat alapját.

Bár a Petri-csészés csíráztatás általánosan elterjedt, az ELISA-plate-en történő csíráztatás az egyedi azonosítás segítségével pontosabb összefüggések kimutatását teszi lehetővé, ezen felül a penészedés során történő átfertőződést is megnehezíti. Ugyanakkor további megválaszolatlan kérdés, a magra rétegzett víz mennyisége, ugyanis túl magas vízszint esetén ez a magok befülledéséhez is vezethet.

A protokoll egyik hátránya a munka- és időigényesség. A másik, ennél fontosabb probléma a változást nem mutató kontroll magok kérdése. Nem tudjuk ugyanis, hogy a magban milyen változások mennek végbe egy-két hetes csíráztatás során. Elképzelhető, hogy a magok kontrollként történő csíráztatása, majd a szkarifikáció előtti szárítás olyan változásokat indukál a magban, mely eleve kizárja a további csírázást.

A TTC-vel történő festődés nagymértékben elősegíti az esetlegesen csíráképes magok kiválogatását, azonban (ahogy arra már többször utaltam), jelenleg nem áll rendelkezésünkre elegendő fajra festődési térkép, így az eredmények kiértékelése csak az anyagcserét folytató sejtek meglétének vizsgálatára korlátozódhat. Emellett a magok mérete nagymértékben befolyásolja a festődés vizsgálatának sikerességét, mivel a túl kicsi magok kettévágása nehézkes.

Egy másik, fontos módszertani kérdés a magok eredete. Sajnos nem tudjuk, hogy az egyes gyűjtemények mikor, milyen időközönként, és milyen anyaggal lettek kezelve, melyek befolyásolhatják az egyes magok csírázást.

Az *Astragalus contortuplicatus* esetében kimutattuk, hogy a magok potenciálisan akár 99 évvel a magszórás után is csírázóképesek lehetnek. Ugyanakkor az alacsony mintaelemszám miatt az eredmény további, ugyanezen időszakból származó magtétélekkel szükséges kiegészíteni a jövőbeni vizsgálatok során. A csírázást befolyásolhatja a magok kora, mert a kísérletek során a kontroll csoportoknál a kor előre haladtával folyamatosan csökkent a csírázási százalék, ehhez azonban szintén növelni kell a mintaelemszámot. A szakirodalom említi, hogy hosszú tárolás után feloldódhat a keményhégység (BASKIN & BASKIN, 1998), mely saját vizsgálataink alátámasztanak.

Valószínűsíthető, hogy a fizikai dormancia mellett más tényező is közre játszik a mag csírázásának megakadályozásában, s ez a faj életmódjával lehet kapcsolatban (LESKU & MOLNÁR 2007). Mivel folyó menti élőhelyein, általában elöntés utáni, friss iszapfelszíneken szokott megjelenni, gyaníthatóan igényli a nagy mennyiségű vizet és tápanyagot, viszont nehezen bírja a versengést. Friss kiöntések azonban rendszertelenül, gyakran csak hosszú idő elteltével következnek be, így a hosszú életképességű magvak létrehozása elengedhetetlen a faj fennmaradásához melyek a kisebb, csírázásra nem alkalmas kiöntések esetén nem csíráznak ki.

Az *Astragalus cicer* magjai 1992-ig, tehát közel 20 évig jó hatásfokkal csíráznak, mely drasztikusan lecsökken ez után. E mellett a magok nagyobb arányban duzzadnak meg, ami jelzi a keménymaghégység mértékének csökkenését is. Eredményeinket alátámasztja CARLETON et al. (1971) valamint CSONTOS et al. (2006) munkái is, akik hasonló eredményeket értek el a faj csíráztatásával.

A csírázás elmaradása ugyanakkor nem magyarázható kizárólag a tömeggel, hiszen abban nem találtunk trendet. Jelentős különbségek lehetnek azonban az egyes gyűjtési évek között, hiszen szárazabb évben előfordulhat az életképtelen magok arányának növekedése (CSERESNYÉS-BÓZSING 2010), míg jobb körülmények között nagyobb magvak képződnek (GÁSPÁR 1980). Mivel a vizsgálatok alapján úgy tűnik, hogy a nagyobb tömegű magok jobban is csíráznak (11. ábra), ezért az esetleges klimatikus adatok, valamint további minták bevonása segíthetnek feltárni az 1992 előtti tételek csíráképtelenségének okait.

Az *Astragalus glycyphyllos* esetében a szakirodalom alapján (HARRINGTON, 1972; CSONTOS et al. 2006) a magok életképessége hamar lecsökken, így feltételezzük, hogy mivel a mintáink többsége több mint 60 évesek voltak a magok már elvesztették a csíráképességüket. A fiatalabb magtétéleknél elmaradó csírázás magyarázható a fent említett klimatikus okokkal. A keménymaghégyságra nézve igen eltérő adatokat kaptunk. A legidősebb és legfiatalabb minták esetén a kis vízfelvételnek két oka lehet. Fiatal tételeknél a

kemény maghéj, az időseknél pedig valószínűbb, hogy a magok már annyira összeszáradtak, hogy képtelenek voltak vízfelvételre.

A *Trifolium arvense* magjainál mind a szkarifikált, mind a kontrollcsoportok esetében csak a friss magok csíráztak, de mivel a második legfiatalabb magtétel is idősebb volt 70 évnél, így elképzelhető, hogy ennyi idő alatt szintén elvesztették a csírázókéességüket, ahogy arra az irodalom is utal (BEQUEREL, 1934). A keményhéjúság mértékének csökkenése az eredmények alapján kimutatható, ennek ellenére a magok mégsem csíráztak. Ezt magyarázhatja a faj általános elterjedése és gyom jellege, azaz (ellentétbe az *A. contortuplicatus* fajjal) nincs érdekében hosszú távon életképes magokat termelni.

Az *Astragalus excapus* esetében sem vízfelvételt, sem csírázást nem tapasztaltunk. A csírázás elmaradását okozhatja, hogy a legfiatalabb mag ebben az esetben is 60 éves volt, és a *Trifolium*hoz hasonlóan már elvesztette csírázókéességét. A faj stabilabb gyepes élőhelyeken és, így feltehetően nem feltétlenül érdeke a hosszabb ideig életképes mag.

A *Reseda* és *Thlaspi* fajok esetében a minták itt is meglehetősen régiiek voltak, ami az életképeség elvesztéséhez vezethet. Ugyanakkor gyom-jellegű fajoknál a hosszú életképeség nem is lenne indokolt. Mivel nem tapasztaltunk keménymaghéjúságot, épp ezért az ortodox (hosszan eltartható) magkategória kérdésesnek tűnik.

Mindezek alapján a dolgozatban megfogalmazott kérdésekre az alábbi válaszokat adhatjuk.

1. A vizsgált fajok potenciálisan milyen hosszan őrzik meg a csírázási képességüket?

Az *A. contoruplicatus* és *A. cicer* esetén több mint 90 évvel a begyűjtés után életképesek maradhatnak a magok, azonban az alacsony mintaelemszám miatt ez további vizsgálatokat igényel.

2. Van-e összefüggés a mag kora és a keménymaghéjúság aránya között?

Több faj esetén sikerült kimutatni a keménymaghéjúság csökkenését.

3. Van-e összefüggés a mag tömege és csírázási képessége között?

Az *A. cicer* esetében egyértelműen a nagyobb magok jobban csíráznak, a többi faj esetén nem találtunk ilyen összefüggést.

4. Alkalmasak-e a herbáriumokból származó magok életképeség-vizsgálatok elvégzésére?

Két faj esetén is sikerült életképes egyedeket nevelnünk herbáriumi magok alapján, így hasonló vizsgálatokhoz a herbáriumi anyag felhasználható, de figyelembe kell venni a módszer korábban ismertetett korlátait.

Kutatásunk egy, a herbáriumi növényanyag új típusú felhasználására mutat példát, melynek alkalmazása a nemzetközi gyakorlatban még csak épp hogy elkezdődött (GODEFROID et al., 2011). Az eredmények jól hasznosíthatók a konzerváció biológiai kutatások, valamint a gyakorlat terén. A magok életképességére vonatkozó adatok fontosak a magbanki tárolás kapcsán, ugyanakkor az így elraktározott, de csíráképes magok alapját képezhetik a faj sikeres visszatelepítésének, vagy akár az élőhely rekonstrukciójának. A fent említett belga kutatás során az országból kipusztult fajok csíráztatását végezték el. Ilyen módon lehetőség nyílik egykori, hazai populációk magjából újraterelni egy fajt. Munkánk ezáltal a természetvédelmi gyakorlatban is jól használható a jövőben.

6. Összefoglaló

Napjainkra az emberi tevékenységek miatt a fajok kihalási rátája több, mint százszorosára növekedett. Emiatt a fennmaradt fajok és élőhelyeik megőrzése még fontosabbá vált, melyhez azonban szükséges az adott fajok természetrajzának és ökológiájának alapos ismerete. Egy növénytársulás regenerációs képessége az adott terület magbankján alapul, mely az egyes fajokhoz tartozó csírázóképes magok mennyiségével, arányával, csírázási igényeivel és e tulajdonságok megőrzésének idejével jellemezhető. A hosszan eltartható magok tárolásával és későbbi csíráztatásával elősegíthető az egyes fajok megőrzése. Amennyiben ismerjük a természetes társulásokat alkotó gyakoribb fajok csírázásbiológiáját, ennek segítségével könnyebben megbecsülhető lenne egy-egy növénytársulás regenerációs képessége és válasza az egyes környezeti változásokra. Ehhez hosszú távú adatsort nyújthat a herbáriumokban tárolt maganyag.

Kutatásunk fő kérdései, hogy a hazai pillangósvirágú fajok magjai mennyi ideig őrzik meg potenciális csírázókéességüket, hogyan függ ez a képesség a magok tömegétől, hosszú távon milyen mértékben veszítik el a családra jellemző keménymaghéjúságot, illetve, hogy milyen mértékben használhatóak herbáriumi gyűjtések a konzervációbiológiai kutatásokban. A korábban bemutatott előkísérletek valamint a jelen dolgozatban bemutatott vizsgálatok célja az is volt, hogy a fenti kérdések megválaszolására alkalmas, hatékony, és lehetőleg a család szintjén univerzális csíráztatási protokollt állítsunk fel, figyelembe véve a szakirodalomban már tesztelt módszereket. Ehhez öt, a *Fabaceae* családba tartozó és három egyéb családba (*Resedaceae*, *Brassicaceae*) faj herbáriumi (forrás: SZIE ÁOTK, SZIE NÖFI, DE, EKF), illetve friss magjainak életképességét vizsgáltuk csíráztatásos módszerrel és szkarifikációval. A kísérletek alapján kidolgoztuk a csíráztatási protokoll első változatát, mely a gyakorlatban elterjedt különböző biológia és kémiai módszereket kombinálja. A protokoll segítségével elkülöníthetőek az 1. halott, 2. azonnali csírázásra képes, 3. potenciálisan életképes magok, valamint megállapítható a keménymaghéjúság aránya. Kimutattuk, hogy több faj esetében (*A. contortuplicatus*, *A. cicer*, *T. arvense*), hogy a keménymaghéjúság feloldódhat, azonban ez nem jelenti azt, hogy egy mag életképessé válik. Ugyanakkor a mag tömege befolyásolhatja mind a vízfelvételt, mind a csírázást is. Vizsgálataink alapján a herbáriumi magok alkalmasak életképesség vizsgálatokra is, ugyanakkor még számos módszertani kérdés további finomítást igényel. Eredményeink jól használhatók a konzervációbiológiában akár magbankok létesítéséhez, akár fajok visszatelepítése esetében, vagy élőhelyek komplex regenerálásában.

7. Summary

According to the human impact, the extinction rate of the species was increased hundred times more recently. For such reason the protection of remained species and habitats came to focus but for such work the knowledge of biology and ecology of the species seems to be essential. The regeneration of a plant community is based on the natural seedbank which can be described with the germination conditions, germination capacity and the seed longevity. The germination of seed with high longevity can help the conservation of the species. If the germination biology of frequent and natural species have been revealed the regeneration capacity of a habitat can be more predictable such as their response to environmental effects. Herbarium sheets can store seeds for long-term researches as well.

The main aim of the research to determine the potential seed longevity of hungarian fabaceous plants and to describe the correlation between longevity and seed weight. The breakdown of hardseedness was also tested. As a further goal the research helps to test the availability of herbarium sheets in conservation biological researches. Another aim of the preliminary and current measurements was to develop an efficient and universal germination protocol for *Fabaceae* family which consider the methods which already used and tested in the bibliography and may helps us to answer our scientific questions as well. Germination test with scarification was used for five species of the *Fabaceae* family and three from other families ((*Resedaceae*, *Brassicaceae*). Seeds were collected from herbarium sheets of hungarian universities (SZIU Veterinarian Faculty, SZIU Institute of Botany and Ecophysiology, Eszterházy Károly College, University of Debrecen) and fresh samples. Based on the germination tests the first version of the germination protocol was designed which combine commonly used biological and chemical methods. With our protocol 1. dead, 2. germinating, 3. potentially viable seeds can be separated and the rate of hardseedness can be measured. The research demonstrated the natural degradation of the hard seed coat for some species (*A. contortuplicatus*, *A. cicer*, *T. arvense*), however it not always leads to germination. However the seed weight can correlate with germination and water uptake as well. The research also shown that the seeds of herbarium sheets can be used in longevity tests, but some more methodological questions need to be answered. Our results can be used in conservation biology such for seedbank or complex regeneration of habitats.

3. számú melléklet

Tételes szerzői hozzájárulás

Alulírott TÓTH KATA KATA a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a:

- herbáriumi lapok revideálását
- magok kinyerését
- magok tételenkénti zacskóba gyűjtését és felcímkézését
- magtömegek mérését
- magok leszámolását
- magok szkarifikációját
- csíráztatott magok állapotának feljegyzését
- TTC-oldat elkészítését
- TTC-festést
- TTC-festődés kiértékelését
- kifejlődött növények elültetését
- adatok értelmezését és táblázatba rendezését

végeztem el.

Budapest, 2015.01.06.


.....

aláírás