



Pannon Egyetem
Georgikon Kar
Növénytudományi és Biotechnológiai
Tanszék



***A Himantoglossum adriaticum* magjainak
életképesség vizsgálata, *in situ* és *ex situ* csíráztatása**

Készítette: Gilián Lilla Diána, Természetvédelmi mérnök MSc.

Témavezetők:

Dr. Bódis Judit, egyetemi docens, PE-GK Növénytudományi és Biotechnológiai
Tanszék

Dr. R. Eszéki Eszter, orchidealabor-vezető, ELTE Füvészkert

Dr. Illyés Zoltán, botanikus

Tartalomjegyzék

Absztrakt	2
1. Bevezetés.....	3
2. Irodalmi áttekintés.....	4
2.1. Orchideák hazánkban	4
2.2. A vizsgált faj.....	4
2.2.1. Az adriai sallangvirág jelentősége a természetvédelemben	5
2.2.2. Az adriai sallangvirág morfológiai leírása	5
2.2.3. Az adriai sallangvirág elterjedése és hazai élőhelyei.....	5
2.2.4. A kosborfélék megporzási típusai.....	6
2.2.5. Az adriai sallangvirág életciklusa – csírázás és újulatképződés	7
2.2.6. Az adriai sallangvirág magjának felépítése, mérete, tokonkénti átlagos száma	8
2.3. Orchideák csíráztatása	9
2.3.1. Maggyűjtés és tárolás.....	10
2.3.2. A magok vetése során alkalmazott előkezelések	10
2.3.3. A magok életképességének, minőségének ellenőrzése	11
2.3.4. A csíráztató táptalaj.....	12
2.3.5. A csíráztatás során biztosított körülmények	13
3. Célkitűzések	14
4. Anyag és módszer	15
4.1. A magok eredete	15
4.2. A magok életképességének vizsgálata.....	15
4.3. In situ csíráztatás	17
4.4. Ex situ (in vitro) csíráztatás	22
5. Eredmények.....	27
5.1. A magok életképesség vizsgálatainak eredményei.....	27
5.2. In situ csíráztatás eredményei.....	29
5.3. Ex situ (in vitro) csíráztatás eredményei	31
6. Eredmények értékelése.....	33
7. Összefoglalás.....	35
Köszönetnyilvánítás	37
Irodalomjegyzék.....	38

Absztrakt

A *Himantoglossum* nemzetség természetvédelmi szempontból kiemelt fontosságú, mindkét hazai faj fokozottan védett és Natura jelölő. A kosborfajok magjának felépítése és gombakapcsoltságának okán a csírázás rendkívül érzékeny szakasza életmenetüknek. A *Himantoglossum adriaticum* esetében nem rendelkezünk erről információval. Dolgozatomban a *H. adriaticum* magjainak életképesség vizsgálatának, *in situ* és *ex situ* csíráztatásának eredményeit tárgyalom.

A magok életképesség vizsgálata során TTC-vel történő festési vizsgálatot végeztem, melynek előkezeléseként mechanikai rázásos magburok-repesztést alkalmaztam, majd 5 napig zárt, sötét helyen TTC oldatban hagytam állni.

Az *in situ* csíráztatás során diakeretes módszert alkalmaztunk. A Keszthelyi-hegységben és a Sümeg-Tapolcai-háton 6-6 helyre helyeztünk ki 10-10 diakeretet 10-20 cm-re az anyatövek mellé, valamint 3-3 diakeretet az anyatövektől 10 méteres távolságba, kontrollként.

Az *ex situ* csíráztatást az ELTE Füvészkert orchidea laborjában végeztem. Steril boxban, Fast táptalajra vetettem el hat lombiknyi érett tokból származó magot. Az első csírakezdemény megjelenésétől fogva havonta ellenőriztem a lombikokat.

Az életképességi vizsgálat során a magok átlagos csírázóképesége 17,7%.

Az *in situ* csírázóképeség a Keszthelyi-hegységben a magvetéstől számított 8. hónapban 0,094%. Az anyatövek mellett ez az arány 0,1%-ra nő. A kontroll keretek csírázási aránya 0,08%. 11 hónappal a magvetés után a csírázási arány már a 42%-ra nőtt. Ebbe beleszámítottam a 0. stádiumban levő protokormokat is. Az anyatövek mellett 50,3%, a kontroll keretek esetében 19,4% a csírázási arány.

A Sümeg-Tapolcai-háton 8 hónappal a magvetés után a csírázási arány 0,11%. Az anyatövek mellett 0,13%-ra nő ez az arány. A kontroll keretek esetében egyetlen csíranövényt sem találtam a keretekben. 11 hónappal a kihelyezés után a csírázási arány már a 34,7%-ra nőtt. Az anyatövek mellett 39,9%-ra, míg a kontroll keretek esetében 3,5%-ra nőtt a csírázási arány.

Az *ex situ* csíráztatás során az első csírakezdemények a magvetéstől számított 9. hónapban jelentek meg. Egy lombikban csíráztak ki a magok kiemelkedően jól. Ennek a csírázóképesége a magvetéstől számított 13. hónapban 1,3%.

Összevetve az *in situ* és *ex situ* csírázásokat, mind a természetben, mind a laboratóriumi körülmények között a *H. adriaticum* magjai a vetéstől számított 9-11.hónapban kezdtek el nagy mennyiségben csírázni, tehát a magok addig nyugalmi állapotban maradnak, de megőrzik a csíráképeségüket.

1. Bevezetés

Manapság az ember környezetformáló tevékenységének köszönhetően a természetes élőhelyek száma és területe világszerte folyamatosan csökken. A szűk tűrőképességű, kis élettérrel rendelkező fajok sokkal inkább ki vannak szolgáltatva a gyorsan változó környezeti feltételeknek, mint a kozmopolita fajok.

A védett növényfajok egyedszámának csökkenése populációik genetikai leromlását is eredményezi. A fajok védelme érdekében elsősorban a megfelelő élőhelyet kell biztosítanunk számukra, de szükséges az egyes fajok szaporodási képességének - szaporítási lehetőségének minél alaposabb megismerése is. Emellett a fajra ható negatív folyamatok (élőhelyi zavarás, genetikai leromlás) lelassításában, megállításában a konzervációs törekvések mellett esetenként elkerülhetetlenné válhat a faj mesterséges (*ex situ*) csíráztatása, felnevelése és kihelyezése a természetes élőhelyére (aktív fajvédelem). Ez a helyzet áll fent számos orchideafaj, így a rendkívül nehezen csíráztatható *Himantoglossum adriaticum*, az adriai sallangvirág esetében is.

A szakirodalomban főleg a trópusi orchideák csíráztatásáról lehet feljegyzéseket találni, hiszen ezek kertészeti jelentőségük miatt a „piacon” igen értékes adatoknak számítanak. A mérsékelt égövi orchideák számunkra természetvédelmi szempontból fontosak, azonban igen csekély az ehhez kapcsolódó szakirodalom, ami pedig van, azokban főleg *Cypripedium* fajokkal foglalkoznak, hiszen ebben a nemzetségben találhatók természetvédelmi szempontból is emblemikus, világ szinten veszélyeztetett fajok.

Az általam vizsgált *Himantoglossum adriaticum* csírázóképeségéről, laboratóriumi és szabadföldi körülmények közötti csíráztathatóságáról, csírázásáról még a külföldi szakirodalomban is alig, hazánkban pedig még egyáltalán nincs publikált adat. A szakirodalomban főleg a *Himantoglossum* nemzetség egyéb tagjairól találhatóak adatok, mint a *H. hircinum*.

Dolgozatomban ennek a fokozottan védett, Natura 2000 jelölő fajnak szeretném bemutatni csírázási jellemzőit, laboratóriumi és terepi körülmények között is. Munkám során meghatároztam a magyarországi lelőhelyekről, valamint a horvátországi Isztriai-félszigetről gyűjtött tokokban beért magok elméleti csírázóképeségét, megbecsültem a természetes élőhelyén történő – *in situ* – csíráztatásával a természetes csírázási arányokat, és laboratóriumi – *ex situ* – csíráztatással azt is becsültem, hogy az esetleges élőhelypusztulás, -átalakulás okozta tőszámcsökkenés során a faj mesterséges felszaporítása – és később a megfelelő élőhelyre kihelyezése – mekkora eséllyel valósítható meg.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Orchideák hazánkban

Az *Orchidaceae* család közismerten rendkívül fajgazdag, hozzávetőleg 750-900 nemzetség és 25000 - 35000 faj alkotja (Nash és mtsai., 2005). Túlnyomó többségük (90%) trópusokon él (Ježek, 2005), ahova a család kevéssé ismert evolúciójának kezdetét is teszik. A legősibb biztos lelet egy 10-15 millió éves orchidea pollencsomó egy ősi méh hátára tapadva, melynek vizsgálatával a növénycsalád 76-84 millió évvel ezelőtti megjelenését feltételezik (Ramírez és mtsai., 2007). Annyi bizonyos, hogy későn kialakult növénycsaládról van szó. Ma is tartó gyors evolúciójukra utal a család sok tagjának nagy genetikai variabilitása, és a nemzetségek közti genetikai határok átjárhatósága, mely révén akár nemzetségek közötti tovább szaporodni képes hibridek jöhetnek, ill. hozhatók létre (Ježek, 2005; Molnár, 2006).

Életmódjukat tekintve *epifita*, azaz más növényeken, főleg fákön élő; *litofita*, vagyis sziklafelszíneken élő és *terresztris*, talajlakó fajaik is megtalálhatók. A mérsékelt égövön kizárólag *terresztris* fajok fordulnak elő. Hazánkban jelenleg hatvannál több kosborfaj él. A fajsza az *Epipactis* nemzetség szakirodalomban nem közölt, de az orchidea rajongók közt terjedő hírek alapján hazánkban megtalált fajai miatt bizonytalan (Király, 2009; Molnár és mtsai., 2011).

Természetközeli fás és fátlan, száraz és nedves élőhelytípusaink mindegyikén előfordulhatnak orchidea fajok. Széles élőhelyspektrummal rendelkező, társulásközömbös fajok és élőhelyspecialisták egyaránt találhatók köztük (Molnár, 2003).

Hazánkban az *Orchidaceae* - orchideaféléket kosborféléknek nevezzük, a család minden faja védett.

2.2. A vizsgált faj

Hazánkban minden sallangvirág faj előfordulást úgy értékelték, hogy az *Himantoglossum hircinum* (L.) SPRENGEL egészen addig, amíg Baumann 1973-ban fel nem figyelt arra, hogy az Isztriai-félszigeten élő sallangvirágok a *H. hircinum*tól eltérő jellegzetességeket mutatnak. Ezeknél hiányzik az erős bakszag, keskenyebbek a tőlevelek, lazább, kevesebb virágú a virágzat, kisebb és zárt a sisak, rövidebbek a sarkantyúk, vörösesbarna a virágszín, kevéssé csavarodott az ajak és mélyebb a bemetszése. Baumann 1978-ban közölte eredményeit: új fajt írt le *Himantoglossum adriaticum* BAUMANN néven. Véleménye szerint Magyarországon nem is él a *H. hircinum*, az ország nyugati részéről (Sopron, Kőszeg, Keszthelyi-hegység, Nyugat-Bakony) származó herbáriumi lapok *H. adriaticum* BAUMANN, az ország egyéb

részéről származók pedig *H. caprinum* (M.-BIEB.) SPRENGEL példányok. Magyarországon a kilencvenes évekre teljesen elfogadottá vált Baumann véleménye. A sallangvirág-fajok szétválása napjainkban zajló fajkeletkezés, amely szorosan összefügg az őket megporzó vadméhfajok evolúciójával (Baumann, 1978).

A nemzetség evolúciós viszonyainak feltárása során a *H. adriaticum* faji önállóságát igazolták, ám más, kis elterjedésű, endemikus fajként nyilvántartott taxonok (*H. calcaratum*, '*robustissimum*', ×*samariense* és *montis-auri*) faji szintű elkülönítéséhez további bizonyítékokra van szükség (Sramkó és mtsai., 2014).

2.2.1. Az adriai sallangvirág jelentősége a természetvédelemben

A *H. adriaticum* - adriai sallangvirág fokozottan védett, közösségi jelentőségű (Natura 2000) növényfajunk. Eszmei értéke 250 000 Ft. Szerepel a hazai Vörös Listában, aktuálisan veszélyeztetett, illetve veszélyeztetett taxonként (Király és mtsai., 2007).

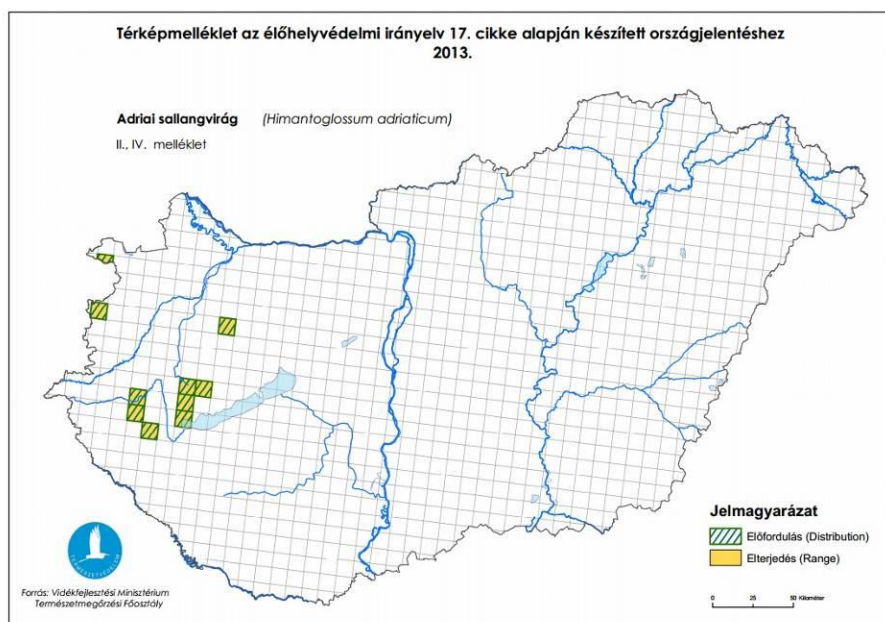
2.2.2. Az adriai sallangvirág morfológiai leírása

A *H. adriaticum* – adriai sallangvirág a sziklagyepek, pusztafüves lejtők, bokorerdők, száraz tölgyesek faja. 30-75 (-95) cm magas évelő. A levelei hosszúkás-lándzsásak, 9-16 cm hosszúak, 1.5-3 cm szélesek, a felső, szárlevelek felfelé kisebbednek. Virágzata laza, megnyúlt fürt. A virágok elállnak a virágzati tengelytől, száma 10-45. A lepellevelek sisakká borulnak össze, mely kívül fehéres színű, zöld erekkel, ritkán kissé vörösesen futtatott. A mézajak mélyen háromhasábú, rendszerint halvány vörösbarna esetleg zöldesbarna, alapjánál vörösesbarna foltokkal tarkított. A középső mézajakhasáb 3.5 -6 cm hosszú, csavarodott, a csúcán 5-18 mm hosszan bevágott. A mézajak két oldalkaréja (5-) 10 - 25 mm hosszú. A sarkantyúja 2.5-3.5 mm hosszú, lefelé irányul. Május-júniusban virágzik (Bódis és mtsai., 2011).

2.2.3. Az adriai sallangvirág elterjedése és hazai élőhelyei

A *H. adriaticum* – adriai sallangvirág adriato-mediterrán elterjedésű faj. Közép- és Észak-Olaszországban, Szlovéniában, Ausztriában, Horvátországban, Csehországban, Szlovákiában, Magyarországon és Dél-Albániában fordul elő. A tengerszinttől 1600 méteres magasságig található meg. Hazánkban kollin-szubmontán faj, herbáriumi példányai alacsonyabb hegyvidéki övezetből (52%) és dombvidéki régióból (48%) származnak (Bódis és mtsai., 2011).

Hazánkban jelenleg mindössze öt helyen: a Keszthelyi-hegységben, a Sümeg-Tapolcai-háton, a Bakonyban, a Kőszegi-hegységben és a Soproni-hegységben ismertek kisebb-nagyobb állományai (1. ábra). Ezeken a területeken a populációk stabilak, de nem nagyok.



1. ábra A *Himantoglossum adriaticum* magyarországi állományai.
Forrás: Vidékfejlesztési Minisztérium Természetmegőrzési Főosztály

2.2.4. A kosborfélék megporzási típusai

Bár eredendően az ősi orchideák között általános lehetett, a rovarmegporzás a ma élő orchideák körében korántsem jelent mindkét fél számára kölcsönösen előnyös (mutualisztikus) kapcsolatot. Az európai és a hazánkban előforduló fajok legfeljebb negyedének virágai termelnek nektárt. Úgy tűnik, legalább három újabb evolúciós irány van kibontakozóban, amelyek a nektártermelés elmaradásával járnak, és egymástól függetlenül, különböző mechanizmusok révén, több rokonsági körben kialakultak. Az Európában előforduló orchideák körében a következő fontosabb és bizonyított mechanizmusok ismertek a megporzó rovarok vonzására:

1. a megporzók nektárral történő csalogatása
2. önmegporzás
3. a megporzók megtévesztéssel, ellenszolgáltatás nélkül történő csalogatása.
 - 3.a. Táplálék ígéretével történő megtévesztés
 - i. pollentermelő virág utánzása
 - ii. nektártermelő virág utánzása
 - iii. zsákmány utánzása
 - 3.b. Tartálycsapda alkalmazása
 - 3.c. Szexuális megtévesztés
4. a virágok átalakulása bűvó- és alvóhelyekké rovarok számára.

A különböző megporzástípusok evolúciós szempontból eltérő előnyöket nyújtanak, és más-más hátránnyal járnak. Az önmegporzás előnyei közé tartozik például, hogy ezek a fajok jórészt függetlenedni tudtak a rovarmegporzóktól és azok időjárási tényezőkkel összefüggő aktivitásának változásától, ennek eredményeként virágaik nagyon jelentős arányban megtermékenyülnek; hátránya viszont az utódok csekély genetikai változatossága (Molnár – Bódis, 2011).

2.2.5. Az adriai sallangvirág életciklusa – csírázás és újulatképződés

A felnőtt egyedek virágzása utáni 3. évben megjelenő nagyszámú magonc arra utal, hogy az első lomblevél megjelenéséig két évre van szüksége a kicsírázott *H. adriaticum* magvaknak, addig a talajban fejlődnek.

A magoncok megjelenése időben folyamatos, a túlélésük a környezeti tényezők függvénye. Kedvező körülmények között tovább fejlődnek két leveles tölevélrózsájú egyeddé, kedvezőtlen körülmények hatására elpusztulnak, s eltűnnek. Feltételezhető, hogy a magoncok számára a túlélés és nem a csírázás a kritikus stádium.

A *H. adriaticum* fenológiai ritmusa nem köthető a szokásos, a naptári évvel harmonizáló, vegetációs periódushoz. A nagyobb tölevélrózsájú, illetve levélszámú növények megjelenési ritmusára jellemző, hogy az augusztus végi, szeptemberi esők után hajtanak ki. A magoncok megfelelő időjárás esetén, ősszel kis késéssel követik a nagyobb méretű növények kibúvását. A magoncok megjelenése az egész vegetációs periódus során folyamatos, legnagyobb egyedszámban az őszi időszakban fordulnak elő. A meleg és száraz ősz nem

kedvez a magoncok megjelenésének, ilyen őszt követően nagyon elhúzódnak a kibúvásuk. A hideg tél szintén kedvezőtlenül befolyásolja a talajfelszíni megjelenésüket.

A meteorológiai tényezők mellett fontos szerepe van a magoncok megjelenésében az anyanövény azévi státusának (vegetatív, reproductív, lappang). A magoncok együtt „mozognak” az anyanövénnyel, ha az nem jelenik meg a felszínen, a magoncok sem hajtanak ki. Az anyanövény megelőző évekbeli státusa viszont nem befolyásolja szignifikánsan a megjelenő magoncok számát (Bódis, 2010).

2.2.6. Az adriai sallangvirág magjának felépítése, mérete, tokonkénti átlagos száma

A kosborfélék családjának egyik legismertebb és legfontosabb jellegzetessége az, hogy magvaik rendkívül aprók, nagyon könnyűek és nagy számban képződnek. Erre a sajátosságukra utal a családot magába foglaló egykori rend régi tudományos elnevezése a *Microspermae* („apró magvúak”) is. A kosborfélék magjai több szempontból is nagyon különlegesek a növényvilágban: rendkívül kicsik, igen könnyűek és nagyon nagy számban képződnek.

Az apró magvaknak több előnye lehet a növény számára:

1. előállításuk az anyanövénytől kis ráfordítást igényel, és emiatt nagy számban képződhetnek
2. a terjesztő fajok esetében a magvak gyorsan (rendszerint néhány hét, de legfeljebb néhány hónap alatt) beérhetnek
3. kis tömegük miatt a széllel könnyen és hatékonyan terjedhetnek

Ugyanakkor az aprómagvúság más szempontból hátrányt is jelenthet; a miniatűr magvakban alig van hely a csírázást az egyedfejlődés korai szakaszában tápanyagokkal ellátó táplálósövetnek, emiatt a csíranövény kezdetben (többnyire) önállóan nem életképes, fennmaradásukhoz szüksége van bizonyos mikorrhiza-gombákra (Molnár és mtsai., 2011).

A megtévesztő fajok esetében a tokképzési arány alacsonyabb, tehát sokkal fontosabb, hogy az egyes tokokban hány mag képződik.

A *Himantoglossum adriaticum* esetében többen vizsgálták már, hogy átlagosan egy tokban hány mag található. A 2010-es évben a Keszthelyi-hegységben 14 tok átlag magszáma 4220 volt (Bódis, 2010). Egy 2011-ben közölt eredmény szerint ugyanitt 23 toktermésben átlagosan 5120 (min. 1350, max. 9970) mag volt (Bódis *et. al.* 2011). Sándor Zsuzsanna

szakdolgozatában (2013) 52 tok alapján meghatározta, hogy egy tokban átlagosan 7996 db mag található. A vizsgálatai során begyűjtött toktermésekben minimum 1119 db, maximum 23.740 db magot számlált meg. A tokok átlagos magszámát saját magam is vizsgáltam a laboratóriumi magvetésem során; az elvetett 8 darab tokban átlagosan 10.263 darab magot számláltam meg.

A magvak 0,35-0,53 mm hosszúak, és 0,15-0,21 mm szélesek. Az érett embrió mérete 135-160 X 82-160 μm (Bódis és mtsai., 2011).

2.3. Orchideák csíráztatása

A magok csíráztatásának tekintetében az orchideák három kategóriába sorolhatók (Arditti, 1967, 1979; Arditti és Ernst, 1984). Az első csoportot azok a trópusi epifiták és litofiták alkotják, amelyek könnyen csíráznak aszimbiotikus körülmények között. Olyan taxonok tartoznak ide, mint a *Cattleya* (trópusi Amerika), a *Phalaenopsis*, *Dendrobium* és *Cymbidium* (Ázsia és Óceánia). A trópusi teresztris és litofita fajok, - elsősorban a *Paphiopedilum* - alkotják a második csoportot. Ezeket nehezebb aszimbiotikusan csíráztatni és speciális közeget igényelnek (Arditti, 1982). A harmadik csoportba tartoznak a mérsékelt égövi teresztris fajok. Ezek az orchideák nem, vagy csak nagyon gyengén csíráznak aszimbiotikus körülmények között és általában sokkal jobban függnek a velük szimbiózisban élő gombáktól (Arditti, 1982). Ezen orchideák csíráztatásához Burgeff 1936-ban közölt írásában részletesen leírta azt a hatékony eljárást, mellyel a gombát és az orchidea magot kombinálta aszeptikus úton. Az eljárás lényege, hogy a steril csíráztató közeghez hozzáadják egy orchidea-gomba tiszta tenyészetét, annak érdekében, hogy segítse a magoncok fejlődését. A módszer komoly hátránya a nagy munkaigény, valamint az az olykor mindmáig megoldatlan probléma, hogy megtalálják a megfelelő gombatorzset és különösen a gomba optimális aktivitási fokát (Fast, 1980). Ez utóbbi körülmény szolgál magyarázatul arra, hogy az aszimbiotikus csíráztatás még mindig élénk érdeklődésre tart számot, és egyre újabb, összetettebb és komplexebb táptalajok, magkezelési eljárások kerülnek alkalmazásra.

Orchideák aszimbiotikus csíráztatása során szinte kivétel nélkül, minden fajnál és minden alkalommal, ugyanazokat a lépéseket kell megtenni a csíráztatandó faj igényeinek figyelembe vételével.

Ezek a lépések a következők:

1. a magok gyűjtése és tárolása
2. a magok előkezelése a vetésük során
3. a magok életképességének, minőségének ellenőrzése (nem elengedhetetlen)
4. a csíráztató táptalaj kiválasztása, elkészítése
5. a csíráztatás során a megfelelő körülmények biztosítása (szimbiotikus csíráztatás esetén a szimbióta gomba ráoltása is ebben a fázisban történik)

Az irodalomban minden egyes, az imént felsorolt lépésre több megoldási javaslat, útmutatás lelhető fel.

2.3.1. Maggyűjtés és tárolás

A magok gyűjtésénél minden esetben az a legfontosabb szempont, hogy olyan mag kerüljön csíráztatásra, melynek begyűjtése, illetve a mag természetes populációból történő eltávolítása a lehető legkisebb zavart okozza. Ugyanígy tekintetbe kell venni, hogy a majdani kiültetés sikerességét a mag származási helye jelentősen befolyásolhatja annak függvényében, hogy az adott populáció tisztaságának fenntartása, vagy genetikai változatosságának növelése az elsődleges cél.

Több megfigyelés van arra nézve, hogy zöld magtokból származó, félérett magok csíráztatása során *Cypripedium* és *Paphiopedilum* fajok esetében jobb csírázási eredményt értek el (Light, 1989; Wagner és Hansel, 1994; Lee és mtsai., 2005).

Light a maggyűjtés ideális időpontját a *Cypripedium* és *Paphiopedilum* fajoknál a megporzás utáni 47. nappal teszi (Light, 1989), ez nagyfokú egyezést mutat a 40 nappal a megporzás után végzett maggyűjtéssel, amit Wagner és Hansel által közölt tanulmány a legkedvezőbbnek ítél a *Cypripedium calceolus* esetében (Wagner és Hansel, 1994). Lee és mtsai. (2005) a legnagyobb arányú csírázást a megporzás után 90 nappal gyűjtött *Cypripedium* magokkal kapták.

2.3.2. A magok vetése során alkalmazott előkezelések

A magvetéshez éretlen termést használva - melyek még nem repedtek fel -, a bennük lévő magvak még nem szennyezettek. Az érett terméseken lehetnek vékony repedések vagy esetleg már fel is nyíltak a bordák mentén, így a magok már érintkezhetnek a szabad levegővel. Ez azt jelenti, hogy megfertőződhetnek a levegőben terjedő spórákkal, vagyis innentől kezdve nem

tekinthetők sterilnek (Fast, 1980), ezért a magok vetés előtti előkezelésének egyik fontos célja a magok sterilizálása.

Az előkezelés másik fontos célja lehet, érett magok esetén, a magok külső burkának meglazítása, megsértése, ezáltal, feltételezhetően a mag vízfelvételének megkönnyítése lévén, elősegítve a csírázást. Ugyanakkor nem bizonyított, hogy a magköpeny fizikailag gátolja a csírázást; lehet, hogy specifikus anyagokat tartalmaz, amik a magköpenyét legalább részlegesen elvesztett embrióra kevésbé képesek hatni (Miyoshi és Mii, 1988).

A még ép, fel nem nyílt termésekből steril körülmények között kinyert magok fertőtlenítés nélkül vethetők (Richter, 1982). Ebben az esetben, előzőleg magát a termést kell fertőtleníteni úgy, hogy a leszedett terméseket alkoholba mártva, majd láng felett áthúzza leégetjük a felszínét. Így a felületen megtapadt baktérium- és gombaspórák jó része elpusztul a magvak károsodása nélkül (Eszéki, 1996).

A már felnyílt, tehát sterilnek nem tekinthető termések esetében előkezeléshez a leggyakrabban a klórmeszes oldat (10 g $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 140 ml vízhez) használatos. Eszéki (2012) orchideamagok sterilizálásához a 10 g klórmész 90 ml desztillált vízben történő oldását javasolja, majd 30 perces állás után a dekantált oldattal a magvak előkezelését. A nátriumhipoklorit (NaOCl) oldat használata az ott képződő klórgáz csíraölő hatása miatt alkalmas magvak előkezelésére (Fast, 1980). Rasmussen (1990) 36 orchidea nemzetséget vizsgált (pl. *Himantoglossum*, *Orchis*, *Anacamptis*, *Ophrys*, *Dactylorhiza*, *Epipactis*, *Cephalanthera*), amely alapján arra a következtetésre jutott, hogy a NaOCl oldatának használata egyszerűbb (jobban tárolható), a $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ pedig hatásosabb orchideamagok fertőtlenítésére. Fast (1980) a klórtartalmú szerek mellett a hidrogénperoxidot (H_2O_2) is ajánlja a magok fertőtlenítésére, de ennek fertőtlenítő hatása valamivel gyengébb.

2.3.3. A magok életképességének, minőségének ellenőrzése

A magok életképességének ellenőrzése a gyűjtött magok minőségi értékelésén és a várható csírázási eredmény megbecslésén túl az alkalmazott előkezelések hatékonyságának ellenőrzésére is szolgálhat (Weinert, 1992). Az életképesség vizsgálatok legelterjedtebb módja a trifenil-tetrazólium-kloriddal (TTC) történő festés. Ezt a módszert Van Waes és Debergh 1986-ban közzétett kísérleteit követően kezdték széles körűen használni terjesztési orchideák életképességének vizsgálatokor. Ezekben a kísérletekben 23 nyugat-európai orchideafajt vizsgált, többek között a *Cypripedium calceolus*, *Epipactis helleborine*, *Listera ovata* és a *Dactylorhiza maculata* fajokat (Van Waes és Debergh, 1986a, b). A TTC-n kívül

több más festékanyag (fluorescein diacetát, FDA; malahit-zöld; savas fukszin, acid-fuchsin, AF) és még *Fusarium* nemzetséghez tartozó gombák is használatosak, használhatóak életképesség vizsgálatoknál (Vujanovic és mtsai., 2000).

2.3.4. A csíráztató táptalaj

A tápközeget alkotó anyagok egy része a növények számára létszükséglet: ezek a szervetlen sók, a szénforrás, vitaminok, hormonok. Egy sor más anyag, pl. aminosavak, szerves savak, komplex vegyületek szerepe esetleges, egy adott faj vagy adott fejlődési fázis esetében van jelentőségük. A táptalaj szervetlen komponensei a makro- (N, Mg, K, Ca, P, S) és mikroelemek (Mn, Cu, Zn, Mo, B, Cl). A nitrogén NO_3^- vagy NH_4^+ , illetve a két ionforma kombinációjaként van jelen. A MgSO_4 mind a magnézium-, mind a kénigényt kielégíti. A foszfort Na- vagy KH_2PO_4 alakjában (esetleg a kettő együtt is) lehet adagolni. A közegek a káliumot Cl^- , NO_3^- vagy H_2PO_4^- formájában tartalmazzák. A kalcium igény Cl^- vagy NO_3^- formában adagolva hatékonyan biztosítható (George és Scherrington, 1984, Thompson, 1977).

Fontos táptalajkomponensek a szénforrások (szénhidrátok). A cukrok közül a szacharóz a legáltalánosabban használt szénhidrát (Maróti, 1976.). A szénhidrátoknak nemcsak, mint táplálékforrásnak, de mint az ozmózis szabályozóinak is fontos szerepük van mind a táptalajban, mind a növényben (Brown és mtsai., 1979).

A nitrogén számos olyan vegyület alkotója, mint az adenzin trifoszfát (ATP), enzimek, struktúra fehérjék és nukleinsavak, ezért valószínű, hogy a csökkent nitrogén asszimiláció az alacsony csírázásban és lassú növekedésben nyilvánul meg az alacsony ammóniatartalmú közegeken (Stenberg és Kane, 1998). Kishi és Takagi (1997) tanulmányában arra is rámutat, hogy az egyes orchideafajok által preferált nitrogénforrás eltérő lehet.

Lucke (1976) a *Himantoglossum hircinum* aszimbiotikus csíráztatásához a táptalajba kókusztejet is tett, eredményei alapján az elvetett magok 4 hónap után indultak csírázásnak.

Az aszimbiotikus és szimbiotikus csíráztatáshoz használt táptalajok összetételükben, szén és nitrogén tartalmukban jelentősen különböznek egymástól, mert a nitrogén, akárcsak a szén felvehető mennyisége jelentősen befolyásolja a szimbiotikus csíráztatás és növénynevelés eredményességét, mivel könnyen felvehető szén és nitrogén jelenlétében a gomba parazitálja a növényt (Beyrle és mtsai., 1991).

A táptalajreceptek összeállításánál olyan kérdésekre keresik a választ, hogy miért előnyösebb az egyik só a másiknál, vagy miért fontos egy adott ion koncentrációja (Kishi és

Takagi, 1997). A jelenlegi kutatások abba az irányba haladnak, hogy tisztázzák ezeket a kérdéseket, illetve olyan összehasonlító tanulmányok készüljenek, amelyek alapján javaslatot lehet tenni az optimális táptalaj-formulára a különféle orchideanemzetségek és -fajok *in vitro* tenyésztéséhez.

2.3.5. A csíráztatás során biztosított körülmények

A csíráztatás körülményei közül, mivel a pH-t és a rendszerben lévő víz mennyiségét az alkalmazott táptalaj nagymértékben meghatározza, a fény mennyiségét és a hőmérsékletet szabályozzák. Otero és mtsai (2004), valamint Miyoshi és Mii (1988) állandó fényen, és állandó hőmérsékleten (24°C ill. 25°C), ezzel szemben Rasmussen (1990) teljes sötétben nevelte növényeit (20°C-on).

Gyakran alkalmazott a „chilling”, magyarul egy mesterséges vernalizáció, ami a csíranövények, csíráztatandó magok hidegkezelését jelenti, imitálva a téli hideg, nyugalmi periódust. De Pauw és Remphrey (1993) 2 hónapos 4°C-on történő hidegkezelés hatását vizsgálva (a vetést végig sötétben tartva) azt tapasztalta, hogy a hidegkezelés a növények táptalaj preferenciáját nem befolyásolja, de növeli a csírázás mértékét. Miyoshi és Mii (1998) 4°C-os hidegkezelés hatását vizsgálta időtartamának (0-3 hónapig) illetve kezdeti időpontjának (a vetéstől számított 0., 3., 6. héttől) függvényében. Eredményeik alapján a vetéskor megkezdett 8 hetes hidegkezelésnek van a legkedvezőbb hatása a csíráztatásra, és még a kezdetben 20°C-on tartott vetést is érdemes hidegkezelésnek kitenni, ebben az esetben 12 hetes hidegkezelés bizonyult a leghatékonyabbnak.

Rasmussen (2008) eredményei alapján *Himantoglossum hircinum* esetében 3 hónapos pihenőidőre van szükség hűvös, sötét helyen.

Gyakori, hogy sötétben történő nevelés után a protokormok megjelenésekor, vagy adott idővel a magvetést követően fényre helyezik a vetett növényeket. Előbbire jó példa Wagner és Hansel munkája, melynek során 20°C-on és sötétben csíráztatott magokat a protokormok megjelenésekor 22°C-ra és fényre helyezték. Weber és Webster (2001) munkájában a 10. héten kerültek fényre a csíranövények.

3. Célkitűzések

Az adriai sallangvirág hazánkban igen ritka, természetvédelmi szempontból kiemelt faj. Manapság egyre mélyebb tudással rendelkezünk az egyes orchideafajok életciklusáról, csírázási arányáról. Bizonyos ritka fajok esetében azonban ez az alaptudás is még hiányos, ahogyan az adriai sallangvirág esetében is.

Munkám fő céljait az alábbi pontokban foglaltam össze:

1. A magvak életképességének vizsgálata laboratóriumban.
2. Az adriai sallangvirág élőhelyi – *in situ* – csíráztatásával a természetes csírázási arány becslése.
3. Az adriai sallangvirág laboratóriumi – *ex situ* – csíráztatásával felmérni, hogy az esetleges élőhelypusztulás, -átalakulás okozta tőszámcsökkenés során a faj mesterséges felszaporítása – és később a megfelelő élőhelyre kihelyezése – mekkora eséllyel valósítható meg.
4. Az adriai sallangvirág *ex situ* csíráztatása során az aszimbiotikus táptalaj nevelőközegként történő alkalmazhatóságának tesztelése.

4. Anyag és módszer

4.1. A magok eredete

A kísérletek során elvetett *Himantoglossum adriaticum* magok a Bakonyból, Sümeg-Tapolcai-hátról, a Kőszegi-hegységből illetve Horvátországból, az Isztriai-félszigetről származtak. A gyűjtésre 2013 júliusában került sor, amikor a toktermések már beértek, faluk megszáradt, de még nem nyíltak fel. A magokat felhasználásukig hűtőben tároltuk.

Fontossá vált a magokkal való további alkalmazás miatt, hogy statisztikai módszerrel megvizsgáljuk, van-e szignifikáns különbség az egyes mintaterületek magjainak csírázóképesége között. Ehhez az életképesség vizsgálatok adatait használtam és varianciaanalízist, valamint szignifikáns differencia számítást alkalmaztam.

4.2. A magok életképességének vizsgálata

Az életképesség vizsgált során, a rendelkezésre álló magok mennyiségét figyelembe véve, a legszükségesebbekre szorítkoztam. TTC-vel történő életképesség vizsgálatokat alkalmaztam. Mivel az orchidea magok annyira aprók, hogy a magot nem lehet szikével felválni, ezért ezt megelőzően valamiféle előkezelést kellett alkalmaznom annak érdekében, hogy a maghéj megrepedjen, és a TTC oldat az embrióhoz bejuthasson.

Annak érdekében, hogy ki tudjam választani, hogy hogyan tudnám a természeteshez legközelebb álló, tehát a lehető legmagasabb festődési arányt elérni a TTC vizsgálat során, a magokon 7 féle előkezelést alkalmaztam, ezek: 0,5%-os; 1%-os; 2%-os és 4%-os hypo oldat, továbbá klórmeszes, savas és mechanikai rázásos kezelés (kémcsórázó készülékkel). Minden egyes kezelés során 100-100 magot vizsgáltam.

A hypo-s előkezelés során 10 percre 0,5, 1, 2 és 4%-os hypo oldatba helyeztem az orchidea magvakat. A klórmeszes előkezelés során 10 g klórmeszet oldottunk 90 cm³ desztillált vízben, majd 10 perc oldódás után, előkezelésként, 10 percre az oldat felülúszójába helyeztem a magokat. A savval történő előkezelés a magok 10 percig 1%-os hypo, majd 10 percig 2% H₂SO₄-ben történő áztatását jelentette. A rázásos előkezelés során a magvakat és kevés kvarchomokot egy kémcsőbe helyeztem, amelyet rázógéppel 50 másodpercen át rázattam, majd a kvarchomokot a kémcsőből óvatosan kiöntöttem úgy, hogy a magok a kémcső aljában benne maradtak.

A magokat, a megfelelő előkezelés (hypo, klórmész, sav ill. rázás) és steril vízzel történő

háromszori öblítés után, 1 g TTC 100 cm³ desztillált vízben történő feloldásával nyert oldatba helyeztem, majd 5 napig 30°C-on, sötétben tároltam.

A TTC redukciója során a légzési láncban résztvevő enzimek aktivitásának következtében vörös színű, lipidoldékony csapadék (formazán) képződik, vagyis az aktív légzési láncsal rendelkező magok embriói vörösre színeződnek. A festődés illetve a magok épségének ellenőrzése Nikon Eclipse E200-as mikroszkóppal, negyvenszeres nagyításon történt.

A hét féle előkezelés közül legalkalmasabbnak talált kezeléssel minden egyes helyről 10 kémcsőnyi, egyenként 100 db maggal újból elvégeztem az életképesség vizsgálatot, ennek alapján meghatároztam az egyes helyekről származó magok átlagos csírázási képességét.

4.3. *In situ* csíráztatás

A magok *in situ* csíráztatásához diakeretes módszert alkalmaztunk (Illyés, 2011). Az egyes diakeretekbe átlagosan 300-500 db *Himantoglossum adriaticum* magot helyeztünk el. 60-60 diakeretet készítettünk el a két féle szitaszövetből, ezekre helyeztük rá a magokat, majd belepattintottuk a diakeretekbe. Minden egyes diakeretet zöld színű dróttal átfűztünk, és fém, számozott jelölőt tettünk rá a pontos visszakereshetőség érdekében (4.-5. ábra).

A magok visszakereshető módon történő élőhelyi csíráztatását kis lyukátmérőjű (85 és 100 μm) malomipari szitaszövet segítségével végeztük. A magok a kettéhajtott szövet belsejébe kerültek, majd ezt követően diakerettel erősítettük meg őket (2. ábra), mely egyben le is zárta a szövetet (Rasmussen és Whigham, 1993). Mindkét visszagyűjtés alkalmával vizsgáltam, hogy a két féle szitaszövetbe való elhelyezésnek mekkora szerepe van a csírázásban. A diakereteket a talaj legfelső részébe függőlegesen helyeztük ki (3. ábra).



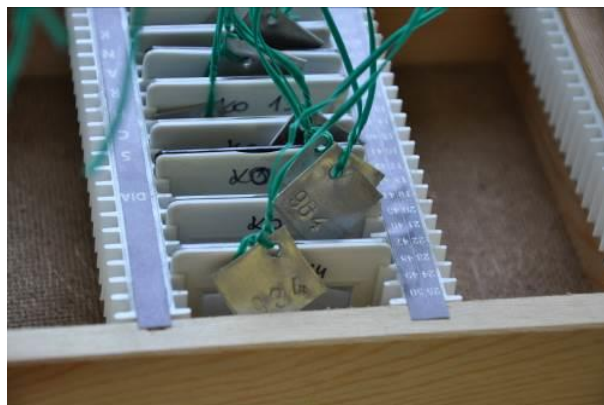
2. ábra A kihelyezendő diakeretek



3. ábra A kihelyezett diakeretek



4. ábra A diakeretek megjelölése zöld dróttal



5. ábra Diakeretek a fém jelölővel

Az *in situ* csíráztatást két helyen: a Keszthelyi-hegységben a Pilikán-Szoroshadi út mellett, a Sümeg-Tapolcai-háton pedig a Sümeg-Tapolcával összekötő út mellett végeztük.

Összesen 120 db diakeretet helyeztünk ki 2013 októberében a Keszthelyi-hegységben és a Sümeg-Tapolcai-háton 6-6 helyre, minden esetben egy fejlett anyatőtől 10-20 cm távolságba, ezen kívül összesen 36 db kontroll diakeretet is kihelyeztünk ugyanezekre a területekre, de az anyatövektől 10 méternél távolabb, ahol nem található sem fejlett, sem csírázó tő (1. táblázat). A 120 db diakeretet tízesével helyeztük ki a kiválasztott 12 helyre, míg a kontroll diakereteket hármassával.

1. táblázat: Az *in situ* kihelyezett diakeretek adatai

Hely Kihelyezés időpontja	Anyató mellé kihelyezett diakeretek (db)	GPS	Kontroll diakeretek száma (db)	GPS
Keszthely 1 2013.10.12.	10	46°47'33,1" 17°16'34,1"	3	46°47'32,8" 17°16'34,1"
Keszthely 2 2013.10.12.	10	46°47'40,8" 17°16'38,8"	3	46°47'40,8" 17°16'38,7"
Keszthely 3 2013.10.12.	10	46°47'43,1" 17°16'40,1"	3	46°47'43,4" 17°16'39,4"
Keszthely 4 2013.10.12.	10	46°47'33,2" 17°16'36,4"	3	46°47'33,0" 17°16'36,3"
Keszthely 5 2013.10.12.	10	46°47'53,3" 17°16'51,9"	3	46°47'53,6" 17°16'52,4"
Keszthely 6 2013.10.12.	10	46°48'04,1" 17°16'57,5"	3	46°48'04,0" 17°16'58,4"
Sümeg 1 2013.10.01.	10	46°57'28,8" 17°20'49,2"	3	46°57'28,5" 17°20'50,3"
Sümeg 2 2013.10.01.	10	46°57'29,7" 17°20'49,4"	3	46°57'29,5" 17°20'50,4"
Sümeg 3 2013.10.01.	10	46°57'25,4" 17°21'10,2"	3	46°57'27,5" 17°21'09,7"
Sümeg 4 2013.10.01.	10	46°57'22,7" 17°21'16,4"	3	46°57'22,7" 17°21'16,8"
Sümeg 5 2013.10.01.	10	46°57'08,8" 17°21'58,1"	3	46°57'08,9" 17°21'57,7"
Sümeg 6 2013.10.01.	10	46°56'43,5" 17°22'24,1"	3	46°56'43,4" 17°22'23,8"

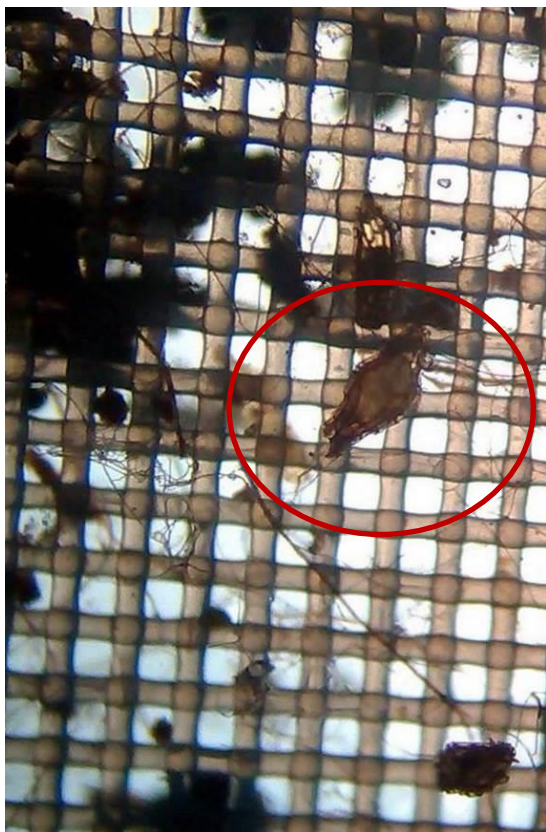
Összesen három visszagyűjtést terveztünk, ebből kettő már megvalósult. Minden esetben 3-3 diakeretet és 1-1 kontroll keretet szedünk fel. Az első felszedésre 2014 júniusában, a másodikra 2014 szeptemberében került sor. A harmadik felszedés tervezett ideje 2015 tavasza. Azért lettek ezek az időpontok kiválasztva, mivel a *H. adriaticum* virágzási ideje júniusban van, és a mikorrhiza szimbióta aktivitás ekkor a legnagyobb. Ősszel, szeptembertől a növény életciklusában újabb aktivitás következik be, ugyanis az őszi esők hatására hajtanak ki az új növények. A 2015 tavaszi kisedés a növény magbanki szerepére adhat majd választ, azaz, hogy 1 évi elfekvés után is indulhat-e meg csírázás.

Az egyes diakeretekbe került pontos magmennyiséget a visszakeresés után, a mikroszkóp alatti feldolgozás során számláltam meg.

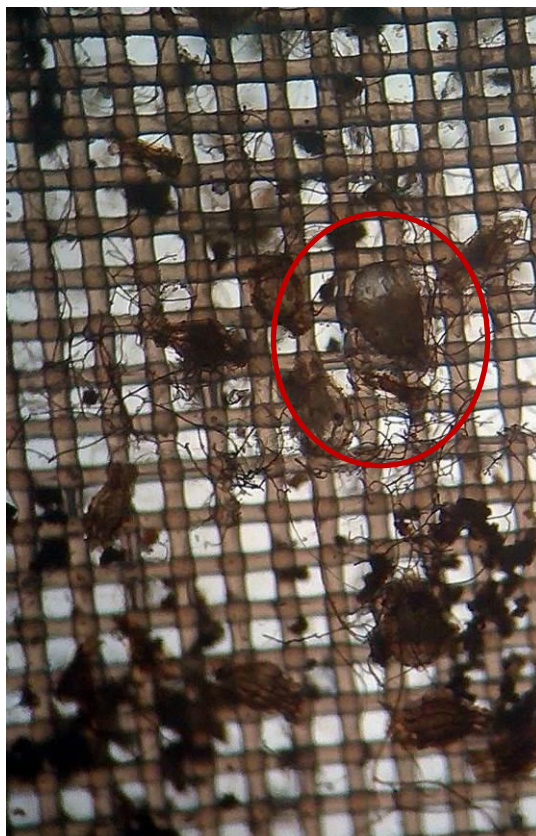
Az első kisedés során arra a kérdésre kerestünk választ, hogy ennyi idő alatt a csírázás már megindult-e. Éppen ezért ekkor még csak azt figyeltük meg, hogy a diakeretekben található-e látható protokorm (csírákezdemény). A második kisedés során már különböző csírázási stádiumok voltak megfigyelhetők, így fontossá vált a protokormok különböző stádiumok szerinti besorolása (2. táblázat) és feljegyzése. Az egyes stádiumokat a 6-9. képeken mutatom be.

2. táblázat: A protokormok stádiumok szerinti besorolása

stádium	rövid jellemzés:
0. stádium	a protokorm jól láthatóan megduzzadt a maghéjban, de azt még nem törte át
1. stádium	a protokorm már áttörte a maghéjat, de a maghéj még látható rajta
2. stádium	a maghéj már nem látható, és a protokormokon látszanak a rhizoidszőrök
3. stádium	a protokorm szabad szemmel is jól látható, néhány mm-es méretű, rajta hajtáskezdemény



6. ábra 0. stádiumú protokorm



7. ábra 1. stádiumú protokorm



8. ábra 2. stádiumú protokorm



9. ábra 3. stádiumú protokorm

4.4. *Ex situ (in vitro)* csíráztatás

A magok *ex situ*, táptalajra történő első vetése az ELTE Füvészkertben történt 2013. szeptember 20-án. A magok előkezelését és a vetést steril körülmények - steril fülke és sterilizált eszközök (10. ábra) között végeztem. A sterilizett „Fast ” táptalajt a magvetés előtti napokban készítettük el (3. táblázat).



10. ábra Steril fülke

3. táblázat: A „Fast” táptalaj receptje. Forrás: R. Eszéki, Szendrák, 1992.

1200ml	FM
Ph:5,5	
Ca (NO ₃) ₂ X 4H ₂ O	100 mg
NH ₄ NO ₃	200 mg
KH ₂ PO ₄	100 mg
KCl	200 mg
MgSO ₄ X 7H ₂ O	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

A táptalajt lombikokba adagoltam ki, majd alumíniumfóliával fedtem le, ezután következett a sterilizálás, 35 percig 10^5 Pa nyomáson 120°C -on. Dermedés után a steril fülkébe helyeztem az üvegeket a magvetésig.

A magvetés előkezeléseként a *H.adriaticum* magokon klórmeszes előkezelést alkalmaztunk, amely során 10 g klórmeszet oldottunk 90 cm^3 desztillált vízben, pár csepp Tween-t adtunk hozzá, majd szűrőpapíron át hagytuk, hogy leszűrődjön.

A kapott szűrt oldatot a kémcsövekbe helyezett elvetendő magokra a kémcsövek feléig feltöltöttem, dugóval lezártam, majd 10 percig állni hagytam a magokat a szűrletben. Időközben többször összeráztam a kémcsöveket. Az utolsó 2 percre a kémcsöveket fejjel lefelé fordítottam (11. ábra), hogy a magok felülre 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 szikével juttattam a kémcsövek faláról a lombikokban levő táptalajok felszínére, majd az egyenletes eloszlás érdekében néhány csepp steril vízben üvegbot segítségével szélesztetem őket. Ezek után a lombikok száját a fertőzések és a kiszáradás ellen háromszoros légáteresztő fóliával lefedtem, majd a tetejét alumíniumfóliával borítottam (12. ábra).



11. ábra A magvetés előtti előkezelés



12. ábra A lombikok a magvetés után

Összesen hat lombikba történt magvetést, mindegyik esetében érett tokból származó magokat vetettem el. A 2013. szeptember 20-án vetett magok számát a 4. táblázatban foglalom össze.

4. táblázat: A 2013. szeptember 20-án vetett magok száma

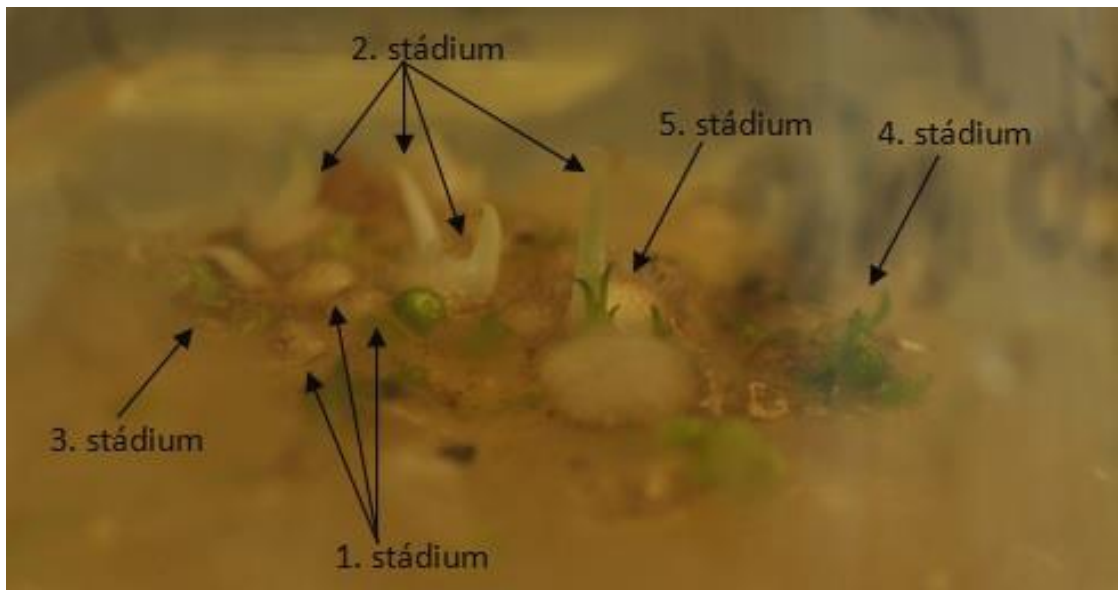
Lombik	elvetett mag (db)
B3	9216
B13	8100
B15	12224
ST	9960
KO	11300
U	10184

Magvetés után 1 hét inkubációs idő következett, ami alatt megfigyeltük, hogy a táptalaj steril maradt, vagy befertőződött-e. Az inkubációs idő letelte után a lombikokat hűtőbe tettük (4°C) 3 hónapra, majd a csírázás, illetve a hajtáskezdemények megjelenéséig sötétben, szobahőmérsékleten (24°C) helyeztük el. A csírázó állományokat természetes fényen, de továbbra is 24°C-on neveltük tovább.

Az első protokorm megjelenésétől fogva havonta ellenőriztem a lombikokat, és 2014. október 4-én a lombikokban talált összes protokormot stádiumok szerint besoroltam. Összesen hét stádiumot különböztettem meg (5. táblázat, 13-15. ábrák).

5. táblázat: A lombikokban talált protokormok stádiumok szerinti besorolása

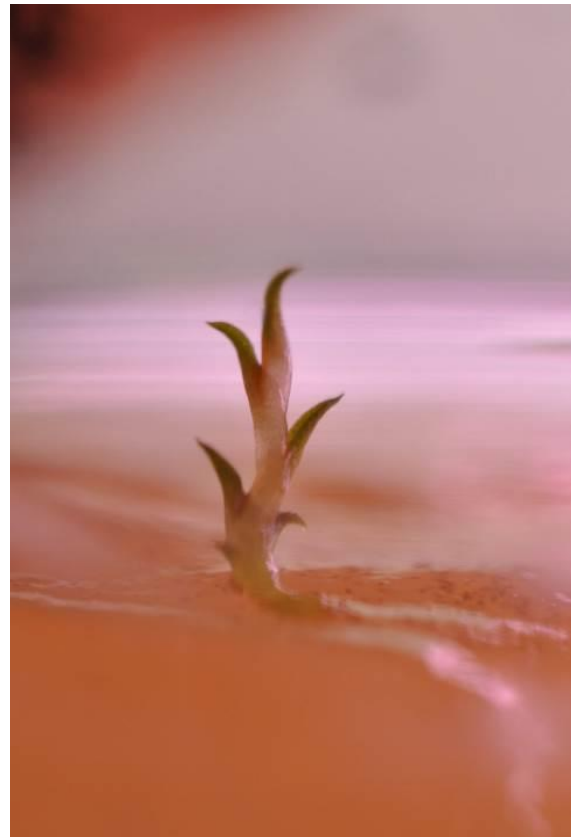
Stádium	Rövid jellemzés
1. stádium	protokorm megjelenik, fehér színű
2. stádium	fehér protokormon megjelenik a hajtáskezdemény
3. stádium	zöld, két leveles állapot, <0,2 cm
4. stádium	zöld, két leveles állapot, <0,5 cm
5. stádium	zöld, négy leveles állapot, ~0,5 cm
6. stádium	zöld, négy leveles állapot, ~1 cm
7. stádium	zöld, hat leveles állapot, ~1-1,5 cm



13. ábra A lombikokban levő csírák 1-5. stádiumig



14. ábra 6. stádiumú csíranövény



15. ábra 7. stádiumú csíranövény

2014 októberében a B13-as lombikban megjelent 6-7-es stádiumú csíranövényeket áttűzdeltem, azaz friss, steril táptalajra átültettem őket. Ezúttal három különböző táptalajra történt az ültetés: egy alap Fast táptalajra, egy +10 g burgonyapelyhet tartalmazó táptalajra és egy +100 mg burgonya homogenizátumot tartalmazó táptalajra. Mindegyikből 3-3 lombiknyit készítettünk, ezekbe 5-5 csíranövényt ültettem át.

5. Eredmények

5.1. A magok életképesség vizsgálatának eredményei

A különböző előkezelések során a festődött magok arányát a 6. táblázatban foglaltam össze.

6. táblázat: A festődött magok %-os aránya

Előkezelés	Festődött magok aránya (%) (100 db magból)
hypo, 10 perc, 0,5%	21
hypo, 10 perc, 1%	17,5
hypo, 10 perc, 2%	17
hypo, 10 perc, 4%	19
10 g klórmész/90 cm ³ H ₂ O, 10 perc	16
10 perc 1% hypo; majd 10 perc 2% H ₂ SO ₄	13
kvarchomokos rázás 50 mp	35

A legmagasabb festődést (elméleti csírázást) a mechanikai, rázásos kezeléssel értem el, ezért a továbbiakban ezt a módszert alkalmaztam.

A 7. táblázatban a sümeg-tapolcai, a kőszegi, a bakonyi és az isztriai magok rázásos kezelés utáni TTC vizsgálatának tízszeres ismételtsben végzett eredményeit mutatom be.

7. táblázat: A különböző helyekről származó magok TTC-vel végzett életképesség vizsgálatának eredményei

Származási hely	átlag (%)	min. (%)	max. (%)	szórás
Sümeg-Tapolca	18,8	12	27	4,96
Kőszeg	19,5	13	28	4,18
Bakony	16,1	13	21	3,03
Isztria	16	8	29	5,83

A nullhipotézis azt mondja ki, hogy az élőhelyek között nincs szignifikáns különbség a csírázási átlagok tekintetében. Mivel a kapott p-érték > 0,05 (8. táblázat); ezért a nullhipotézist elfogadjuk.

8. táblázat: A varianciaanalízis eredményei

VARIANCIAANALÍZIS						
Tényezők	SS	df	MS	F	p-érték	F krit.
Csoportok között	115	3	38,33333	1,721987	0,179812	2,866266
Csoporton belül	801,4	36	22,26111			
Összesen	916,4	39				

A kapott eredményt a szignifikáns differencia (SZD₅%) számítás is igazolta. Ennek eredményét összevetettem az egyes élőhelyek csírázási átlagainak különbségeivel, és az ezek során kapott eredmények (9. táblázat) alapján is kijelenthetjük, hogy nincs szignifikáns különbség a különböző helyekről származó magok csírázási átlagai között, így a magvetés során nem okoz gondot az, hogy az egyes magok más-más helyről származnak.

9. táblázat: Az analízis eredménye (NS: nincs szignifikáns különbség)

sorszám	átlagok különbsége	SZD5%	eredmény
1.	1,1 <	4,28	NS
2.	2,7 <	4,28	NS
3.	2,7 <	4,28	NS
4.	2,8 <	4,28	NS
5.	3,8 <	4,28	NS
6.	3,9 <	4,28	NS

5.2. In situ csíráztatás eredményei

A kihelyezéstől számított 8. és 11. hónap utáni felszedés során kapott eredményeim összesítését a 10. táblázatban foglalom össze.

10. táblázat: Csírázási arányok 8 és 11 hónap után, szabadföldben (K: kontroll)

Helyszín	kihelyezéstől számított 8 hónap után	kihelyezéstől számított 11 hónap után				
	csírázási arány (%)	csírázási arány (%)	0. stádium (%)	1. stádium (%)	2. stádium (%)	3. stádium (%)
Keszthely 1	0,2	31	30,9	0	0	0
Keszthely 1 K	0	8	8,2	0	0	0
Keszthely 2	0,08	65	38,7	16,9	8,2	1,4
Keszthely 2 K	0	15	15,1	0	0	0
Keszthely 3	0	62	62,2	0	0,2	0
Keszthely 3 K	0,63	11	10,7	0	0	0
Keszthely 4	0,25	84	61,4	15,69	6,1	0,9
Keszthely 4 K	0	6	6,2	0	0	0
Keszthely 5	0	14	13,5	0,066	0	0
Keszthely 5 K	0	34	33,9	0	0	0
Keszthely 6	0,066	60	57,5	2,56	0,09	0
Keszthely 6 K	0	39	39,09	0	0	0
Keszthely össz.	0,094	42				
Keszthely K össz.	0,08	19,4				
Sümeg 1	0	61,28	60,2	0,89	0,07	0,07
Sümeg 1 K	-	-	-	-	-	-
Sümeg 2	0,096	14,5	14,5	0	0	0
Sümeg 2 K	0	-	-	-	-	-
Sümeg 3	0,2	43,4	42	1,35	0	0
Sümeg 3 K	0	0	0	0	0	0
Sümeg 4	0,27	2,5	2,5	0	0	0
Sümeg 4 K	0	9,2	8,5	0,7	0	0
Sümeg 5	0,22	73,5	69	3,78	0,16	0,32
Sümeg 5 K	0	4,86	4,8	0	0	0
Sümeg 6	0	66,8	64,8	1,96	0	0
Sümeg 6 K	0	0	0	0	0	0
Sümeg össz.	0,11	34,7				
Sümeg K össz.	0	3,5				

8 hónappal a kihelyezés után (első visszagyűjtés), 2014 júniusában, a Keszthelyi-hegységben kihelyezett összes visszagyűjtött *H.adriaticum* magoknak csak a 0,094%-a csírázott (10 db csíranövény 10622 db magból). Ha csak azokat a magokat vesszük figyelembe, melyek élő sallangvirág tövek 10-20 cm-es körzetébe kerültek, az arány 0,1%-ra nő. A kontroll keretek esetében a csírázási arány 0,08% (2 csíranövény a 2497 db magból).

11 hónappal a kihelyezés után (második visszagyűjtés), 2014 szeptemberében, a Keszthelyi-hegységben kihelyezett összes visszagyűjtött *H.adriaticum* magoknak a csírázási aránya már a 42%-ra nőtt (4321 db csíranövény a 10274 db magból). Ebbe beleszámítottam a 0. stádiumban levő magokat is. Az élő sallangvirág tövek 10-20 cm-es körzetébe került magok esetében az arány 50,3% (3787 csíranövény a 7526 db magból). A kontroll keretekben a csírázási arány 19,4% (534 csíranövény a 2748 db magból).

A Sümeg-Tapolcai-háton 8 hónappal a kihelyezés után (első visszagyűjtés), 2014 júniusában, a kihelyezett összes visszagyűjtött *H.adriaticum* magoknak csak a 0,11%-a csírázott (9 db csíranövény a 7862 db magból). Az élő sallangvirág tövek 10-20 cm-es körzetében a csírázási arány 0,13% (9 db csíranövény a 6732 db magból). A kontroll keretek esetében a csírázási arány 0%, azaz egyetlen csíranövényt sem találtam ezekben a keretekben.

11 hónappal a kihelyezés után (második visszagyűjtés), 2014 szeptemberében, a Sümeg-Tapolcai-háton visszagyűjtött *H.adriaticum* magoknak a csírázási aránya már 34,7%-ra nőtt (3242 db csíranövény a 9325 db magból). Ebbe a 0. stádiumban levő magokat is beleszámítottam. Ha csak az élő sallangvirág tövek 10-20 cm-es körzetébe lehelyezett diakereteket vesszük figyelembe, az arány 39,9% (3195 csíranövény a 7992 db magból). A kontroll keretek esetében a csírázási arány 3,5% (47 csíranövény az 1333 db magból).

Mindkét visszagyűjtés alkalmával vizsgáltam, hogy a két féle szitaszövetbe való elhelyezésnek mekkora szerepe van a csírázásban. Vizsgálataim során az első, júniusi visszagyűjtés alkalmával a Keszthelyi-hegységben 100 µm átmérőjű szitaszövetben kihelyezett és felszedett összes magnak a 0,1%-a (6 csíranövény az 5456 db magból), a Sümeg-Tapolcai-háton kihelyezett ugyanilyen lyukátmérőjű szitaszövetben a felszedett összes magnak a 0,08%-a (3 csíranövény az 3428 db magból) csírázott. Az ugyanakkor 85 µm átmérőjű szitaszövetben kihelyezett és felszedett magoknak a Keszthelyi-hegységben a 0,08%-a (4 csíranövény az 5166 db magból), a Sümeg-Tapolcai-háton a 0,13%-a (6 csíranövény az 4434 db magból) csírázott.

A második, szeptemberi visszagyűjtés alkalmával a Keszthelyi-hegységben 100 µm átmérőjű szitaszövetben kihelyezett, és felszedett összes magnak a 41,1%-a (2167

csíranövény az 5265 db magból), a Sümeg-Tapolcai-háton felszedetteknek a 36,8%-a (1632 csíranövény a 4434 db magból) csírázott. A 85 µm átmérőjű szitaszövetben kihelyezett és felszedett magoknak a Keszthelyi-hegységben a 43,0%-a (2154 csíranövény az 5009 db magból), míg a Sümeg-Tapolcai-háton a 32,9%-a (1610 csíranövény a 4891 db magból) csírázott.

5.3. *Ex situ (in vitro)* csíráztatás eredményei

A 2013 szeptemberi magvetés során egyik lombik sem fertőződött be. A vetéstől számított 9. hónapban, 2014 júniusában, a lombikok felében figyeltem meg a protokorm képződés első jeleit. A B13 jelű lombikban 30 protokormot számoltam, míg a másik kettőben csak 1-2-t. Innentől kezdve minden hónapban megvizsgáltam a lombikokat, és legtöbb esetben új csíranövényeket fedeztem fel (11. táblázat). Már rögtön az első alkalommal látszott, hogy a B13-as számú lombikban sokkal több a csíranövény, mint a többiben, és ez a további hónapokban sem változott meg. A B13-as lombikban 2014 októberére, a magvetéstől számított 13. hónapra a csírázási arány 1,3%, míg a B3-as lombikban 0,03%, a B15-ösben 0,008%, az ST-ben 0,02%, a KO-ban 0,009%, az U-ban pedig 0,03% (12. táblázat). Az *ex situ (in vitro)* csíráztatás során elért tényleges csírázási arány 0,18%.

A tűzdelés során 6-os és 7-es stádiumú csíranövényeket lehet friss táptalajra átültetni, így 2014 októberében egyedül csak a B13-as lombikot tudtam erre felhasználni, mivel azokban volt magas számú, ilyen stádiumú csíranövény.

11. táblázat Az egyes megfigyelések alkalmával a lombikokban talált összes protokorm száma

Megfigyelés ideje	B3 (db)	B13 (db)	B15 (db)	ST (db)	KO (db)	U (db)
2014.06.04	2	30	0	1	0	0
2014.07.11	2	46	0	1	0	0
2014.08.11	3	74	2	2	0	2
2014.09.09	3	87	1	2	0	3
2014.10.04	3	104	1	2	1	3

A 2014.10.04-i megfigyelés alkalmával az egyes lombikokban talált protokormok számát stádiumok szerint a 12. táblázatban foglaltam össze.

12. táblázat: Az egyes lombikokban talált protokormok száma stádiumok szerint:

lombik	elvetett mag (db)	vetéstől számított 13. havi (2014. 10. 04.) megfigyelés								
		1. stádium (db)	2. stádium (db)	3. stádium (db)	4. stádium (db)	5. stádium (db)	6. stádium (db)	7. stádium (db)	összes csírázó (db)	csírázási arány (%)
B3	9216	0	0	0	0	1	1	1	3	0,03
B13	8100	10	8	10	20	22	24	10	104	1,3
B15	12224	1	0	0	0	0	0	0	1	0,008
ST	9960	0	1	0	1	0	0	0	2	0,02
KO	11300	0	1	0	0	0	0	0	1	0,009
U	10184	0	0	3	0	0	0	0	3	0,03

6. Eredmények értékelése

A TTC-vel történő életképesség vizsgálat azt mutatja meg, hogy az adott előkezelések segítségével, a felrepedt maghéjon át az embrióba bejutó TTC a magot megfesti-e, tehát az életképes-e. Ez csak egy elméleti arány, a valódi csírázási arány meghatározására, megbecslésére nem alkalmas. Ez az eredmény nem összehasonlítható az *in situ* csírázási arány eredményével, ugyanis a talajban lévő teljes talajflóra mintegy leemészti a külső maghéjat az embrióról, és ezt a természetes úton történő „előkezelést” mesterséges módon az orchideák magjainak apró méretéből fakadóan nem lehet ugyanolyan eredménnyel elérni.

Az életképesség vizsgálatok során mért elméleti csírázókéesség kisebb (átlagban 17,7%), mint a termőhelyen (*in situ*) kihelyezett diakeretekben 2014 szeptemberében mért tényleges csírázás (42%), azonban magasán meghaladta az *ex situ*, lombikokban elért tényleges csírázást (0,18%). Vagyis a TTC redukcióját végző légzési lánc enzimeinek jó működőképességét mutató vöröses elszíneződése a magoknak (formazán képződés) önmagában még nem feltétlenül volt biztosíték a magok magas csírázási arányára.

Az *in situ* csíráztatás eredményei alapján megfigyelhető, hogy az októberi magvetés és a júniusi felszedés között eltelt 8 hónap alatt a magok többsége még nem kezdett el csírázni, azonban a magvetéstől számított 8. és 11. havi felszedés között eltelt 3 hónap alatt mindkét helyen beindult a csírázás. Tehát a magvetéstől számítva 8-11 hónap kellett a kihelyezett magoknak ahhoz, hogy a csírázás az élőhelyen megkezdődjön. Eredményemet összevetve Carey és Farrell (2002) *Himantoglossum hircinum in situ* csírázási adataival, a *H. hircinum* magok csak a vetéstől számított második évben kezdtek csírázni, és mindössze csak az 1-5%-uk volt az általam jelölt 2.-3. stádiumban, azonban a magok 15-40%-a mutatta jelét a csírázásnak.

Eredményeim alapján kijelenthetjük, hogy a két szitaszövet között nincs túlzottan nagy eltérés csírázás tekintetében, de a nagyobb, 100 µm átmérőjű szitaszövetben általában véve valamivel magasabb volt a csíranövények száma. A két élőhely közül a Keszthelyi-hegységben valamivel nagyobb volt a *H. adriaticum* magok csírázási aránya.

Fontos azt megjegyezni, hogy eredményeimbe beleszámítottam a 0. és 1. stádiumban lévő, tehát a csírázás közeli állapotú magokat is. Ezekhez a stádiumokhoz még nem kell gombapartner, tehát nem „igazi” csíranövények, de ezek nagyon fontos adatok ahhoz, hogy a magok közül mennyi életképes, mennyi az, amelynek lehetősége van arra, hogy a

gombapartnerrel való találkozás hatására meginduljon a hajtáskezdemény képződés, és ezzel valódi csíranövénnyé váljon.

Mikroszkópos megfigyeléseink szerint a gombapartnerrel való szimbiózis az 1. és 2. stádium között jön létre.

Az *ex situ* laborban végzett kísérletem során, az első csíranövények a vetéstől számított 9. hónapban jelentek meg. Ez összevág az *in situ* csíráztatás során kapottakkal. Eredményeimet összevetve egyéb mérsékelt övi orchideafajok *in vitro* vetésének csírázási idejével, Eszéki (2012) vizsgálatai alapján a *Himantoglossum hircinum* magok a vetéstől számítva 14 hónap alatt, az *Anacamptis pyramidalis* magok 14 hónap, az *A. laxiflora* magok 25 hónap, az *A. morio* magok 14 hónap, a *Dactylorhiza incarnata* magok 7 hónap 25 nap alatt, a *D. maculata* magok 1 hónap 20 nap, a *Gymnadenia conopsea* magok 6 hónap, a *Neotinea tridentata* magok 11-14 hónap, a *Platanthera bifolia* magok 3-22 hónap alatt csíráztak. Rasmussen és Whigham (1998) vizsgálatai alapján a *Corallorhiza odontorhiza* magjai a vetéstől számított 7. hónapban, míg a *Goodyera pubescens* a 6. hónapban kezdett el csírázni.

Mindezek alapján kijelenthetem, hogy a *H. adriaticum* esetében 8-11 hónap kell ahhoz, hogy a magok csírázása jelentős mértékben beinduljon. A kapott eredmények alapján a *H. adriaticum* fajvédelmét az *ex situ* módszerrel történő szaporítás eredményesen segítheti. Az *in situ* vizsgálatok eredményével pedig fontos adatokat nyertünk a faj ökológiájának megismeréséhez, melyek elengedhetetlenek az eredményes élőhelyen történő fajvédelmi törekvésekhez.

7. Összefoglalás

Dolgozatomban a hazai vadon élő, fokozottan védett orchideafajunk, a *Himantoglossum adriaticum* magjainak életképesség vizsgálatát, *in situ* és *ex situ* csíráztatásának módszerét, menetét és eredményeit tárgyalom. Azért választottam ezt a témát, mivel ez a faj természetvédelmi szempontból igen fontos, és a szakirodalomban eddig nem rendelkezünk ilyen irányú ismeretekkel.

A magok életképesség vizsgálata során a TTC-vel történő festési vizsgálatot a rendelkezésemre álló magokon, minden élőhelyről, ahonnan volt begyűjtött érett tok, 10 db kémcsőnyi, egyenként 100-100 darab magon végeztem el (tehát élőhelyenként 1000 db magon), amelynek előkezeléseként egy mechanikai rázásos magburok-repesztést alkalmaztam, majd 5 napig zárt, sötét helyen TTC oldatban hagytam állni. Kiértékelést ezek után végeztem, a pirosra megfestődöttek jelezték az életképes magokat. Ez a vizsgálat csak egy elméleti arányt ad eredményül. A tényleges csírázási arányokat az *ex situ* és az *in situ* csíráztatás során lehet megadni.

Az *in situ* csíráztatás során diakeretes módszert alkalmaztunk. A Keszthelyi-hegységben és a Sümeg-Tapolcai-háton 6-6 helyre helyeztünk ki 10-10 diakeretbe zárt magcsomagot az anyatövek 10-20 cm-es körzetébe, valamint további 3-3 diakeretet az anyatövektől 10 méteres távolságba, kontrollként. Összesen három visszagyűjtést tervezünk, ebből kettő már megvalósult. Minden esetben 3-3 diakeretet és 1-1 kontroll keretet szedünk fel. Az első felszedésre 2014 júniusában, a másodikra 2014 szeptemberében került sor. A harmadik felszedés tervezett ideje 2015 tavasza.

Az *ex situ* csíráztatás során 2013 szeptemberében az ELTE Fűvészkert orchidea laborjában Fast táptalajra vettem el 8 lombiknyi érett tokból származó magot.

Az életképesség vizsgálat során az összes vizsgált magra vonatkoztatva, a magok 17,7%-a volt életképes.

Az *in situ* csíráztatás során az első felszedéskor, 8 hónappal a kihelyezés után mindkét élőhelyen szinte alig volt csíranövény, a Keszthelyi-hegységben felszedett diakeretekben levő magok csírázási aránya 0,094%, a Sümeg-Tapolcai-háton pedig 0,11%. A második felszedéskor, 11 hónappal a kihelyezés után beindult a csírázás, a Keszthelyi-hegységben 42%-ra, a Sümeg-Tapolcai-háton 34,7%-ra nőtt a felszedett diakeretekben a csírázási arány.

Az *ex situ* csíráztatás során egyik lombik sem fertőződött be, és a vetéstől számított 9. hónapban megindult a csírázás. Egyetlen lombikban (B13 kódú) csíráztak kiemelkedően jól a

H. adriaticum magok, 2014 októberében, a magvetéstől számított 13. hónapban ennek a lombiknak a csírázási aránya 1,3% volt. A maradék 7 lombikban is megindult a csírázás, de jóval kisebb arányban. Ugyanebben a hónapban a B13-as lombikban található 6-os és 7-es stádiumú, tehát az 1 cm és annál nagyobb 4 illetve 6 leveles csíranövényeket áttűzdeltem, azaz átültettem friss táptalajba, ez alkalommal 3 különböző félébe, hogy a jövőben a táptalajok csíranövények fejlődésére gyakorolt hatását is vizsgálni tudjam.

Összevetve az *in situ* és *ex situ* csírázásokat, mind a természetben, mind a laboratóriumi körülmények között a *H. adriaticum* magjai az őszi vetéstől számított 9-11. hónapban kezdtek el nagy mennyiségben csírázni, tehát a magok addig nyugalmi állapotban maradnak, de megőrzik a csírákéességüket.

Vizsgálataim alapján a faj magjainak csírázási aránya megnyugtatóan magas a természetes élőhelyén, így valószínűleg az életmenet ezen szakasza nem kulcseleme a faj veszélyeztetettségének. A mikorrhiza gomba partnerével való találkozás, mely „továblöki” a csírázási folyamatot és beindítja a csíranövény növekedését, azonban már jóval ritkább esemény. A természetben előforduló orchidea tövektől távolabb a gombapartner csírázást segítő hatása drasztikusan lecsökkent. Ebből arra lehet következtetni, hogy a gombának fontos szerepe lehet a faj életciklusában. A gombáról képzelt jövőbeni ismeretek tehát igen fontosak lehetnek a fajvédelmi törekvésekben.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom belső konzulensemnek, Dr. Bódis Juditnak, aki végig támogatott, segítette munkámat. Köszönöm Neki, hogy mindvégig biztatott és időt szakított rám.

Köszönöm Dr. R. Eszéki Eszternek, hogy helyet biztosított számomra a budapesti ELTE Fűvészkert orchidea laborjában, bevezetett az orchideák táptalajra történő magvetésének és csíráztatásának rejtelmeibe, végig figyelte és segítette munkámat, mindenben támogatott, és bármikor időt szakított rám. Az, hogy megismerhettelek, számomra mindenképpen egy mérföldkő az életemben. Köszönök mindent, amit Tőled tanulhattam.

Köszönöm Dr. Illyés Zoltánnak, hogy bevezetett az orchideák terepi csíráztatásának világába. Hálával tartozom, hogy a rengeteg egyéb elfoglaltsága mellett mindig szakított időt arra, hogy munkámat szemmel tartsa, a terepi munkálatokban és a mikroszkópos kiértékelés során ott legyen mellettem, és segítsen.

Köszönöm Hegedűsné dr. Baranyai Nórának, hogy a statisztikai elemzésekben segítségemre volt.

Valamint köszönöm minden családtagomnak és barátomnak, akik bármilyen úton-módon segítettek, hogy ez a dolgozat elkészüljön, és akik eddigi tudományos-emberi pályámon előbbre vittek.

Irodalomjegyzék

- Arditti J. 1967. Factors affecting the germination of orchid seed. Bot. Rev. 33: 1-97
- Arditti J. 1979. Aspects of the physiology of orchids. Advances Bot. Res. 7: 241-665.
- Arditti J. 1982. Orchid seed germination and seedling culture - a manual. In: J. Arditti (ed.): Orchid Biology: reviews and perspectives, III. Cornell University Press, Ithaca. P. 243-370.
- Arditti, J., R. Ernst. 1984. Physiology of germinating orchid seeds. In: Arditti, J. (ed.): Orchid Biology: reviews and perspectives, III. Cornell University Press, Ithaca. p. 177-222.
- Beyrle 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.
- Bódis J. 2010. *Himantoglossum adriaticum* populációk dinamikája: demográfiai és életmenet jellemzők. Doktori értekezés, Keszthely
- Bódis J., Molnár V. A. 2011. Az európai orchideák életmenete és állománydinamikája. In: Molnár V Attila (szerk.) Magyarország orchideáinak atlasza. Budapest: Kossuth Kiadó - MTA FKI, pp. 117-131. (Kossuth Természettár)
- Bódis J., Sramkó G., Óvári M., Molnár V. A. 2011. Adriai sallangvirág. In: Molnár V Attila (szerk.) Magyarország orchideáinak atlasza. Budapest: Kossuth Kiadó - MTA FKI, pp. 375-380. (Kossuth Természettár)
- Bódis J., Molnár V. A. 2011. Az európai orchideák főbb megporzási típusai. In: Molnár V Attila (szerk.) Magyarország orchideáinak atlasza. Budapest: Kossuth Kiadó - MTA FKI, pp. 49-50 (Kossuth Természettár)
- 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.
- Burgeff H. 1936. Samenkeimung der Orchideen. Gustav Fischer Verlag, Jena, pp. 312
- Carey P. D., Farrell L. 2002. *Himantoglossum hircinum* (L.) Sprengel. Journal of Ecology. № 90. pp. 216-218
- 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 Botanic 71: 879-885.
- Eszéki E. 1996. Trópusi orchideák aszimbiotikus mikroszaporítása az ELTE Botanikus Kert laboratóriumában. Orchidea 1996 (1): 24 - 27.

- Eszéki E. 2012. Orchideafajok génmegőrzési és szaporítási lehetőségei. Doktori értekezés, Budapest
- Fast G. 1980. Vermehrung und Anzucht, In: ed: Fast G. Orchideenkultur, Botanische Grundlagen, Kulturverfahren, Pflanzenbeschreibungen. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart
- George E. F., Scherrington P. D. 1984. Plant propagation by tissue culture. Handbook and directory for commercial laboratories. Exegetics LTD, Eversley, England.
- Ježek Z. 2005. Encyklopedie orchidejí (magyar), Orchideák enciklopédiája [ford. Illés Beatrix]. Ventus Libro, Budapest, pp. 304
- Johnson T. R., Stewart¹ S. L., Dutra D., Kane M. E., Richardson L. 2007. Asymbiotic and symbiotic seed germination of *Eulophia alta* (Orchidaceae) - preliminary evidence for the symbiotic culture advantage. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 90:313–323.
- Kishi F., Takagi K. 1997. Analysis of medium components used for orchid tissue culture. *Lindleyana* 12 (3): 158-161.
- Király G. 2007. Vörös Lista – A magyarországi edényes flóra veszélyeztetett fajai. Sopron
- Lauzer D., St-Arnaud M., Barabe D. 1994. Tetrazolium staining and in vitro germination of mature seeds of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae). *Lindleyana* 9: 97–204.
- 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
- Lucke, F. 1976. Erste Ergebnisse zur asymbiotischen Samenkeimung von *Himantoglossum hircinum*. *Die Orchidee* (Hamburg), 27, 60-61.
- Light M. H. S. 1989. Germination in the *Cypripedium/Paphiopedilum* alliance; *Canadian Orchid Journal*, 5: 11-19.
- Maróti M. 1976. A növényi szövettenyésztés alapjai. Budapest. Akadémiai Kiadó.
- Miyoshi K., Mii M. 1988. Ultrasonic treatment for enhancing seed germination of terrestrial orchid, *Calanthe discolor*, in asymbiotic culture. *Scientia Horticulturae*, 35, 127-130.
- Molnár V. A. 2003. Egyszikűek. Orchideák, nősziromok, liliomok és rokonaik a Kárpát-medencében. *ÉlőVilág Könyvtár*, Kossuth Kiadó, Budapest, pp. 112
- Molnár V. A. 2006. Kosborfélék – Orchidaceae. In: Ujhelyi P., Molnár V. A. (szerk.): *Élővilág enciklopédia II. – A Kárpát-medence gombái és növényei*. Kossuth Kiadó, Budapest, pp. 149-166.

- Molnár V. A., Bódis J., Sulyok J., Sramkó G. 2011. Az európai orchideák megporzásbiológiája - áttekintés a Magyarország Orchideáinak Atlasza című kötethez., KITAIBELIA 16: (1-2) pp. 21-35.
- Molnár V. A., Óvári M., Sramkó G. 2011. A Magyarországon előforduló orchideák osztályozása és nevezéktana. In: Molnár V. A. (szerk.): Magyarország orchideáinak atlasza. Kossuth Kiadó, Budapest. pp. 42-45
- Molnár V.A., Sonkoly J., E.Vojtkó A. 2011. Az orchideák magjai. In: Molnár V Attila (szerk.) Magyarország orchideáinak atlasza. Budapest: Kossuth Kiadó - MTA FKI, pp. 81-90 (Kossuth Természettár)
- Nash N., La Croix I. (consultants), Banks D. (writer) 2005. Flora's Orchids. Timber Press, Portland, pp. 368.
- 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.
- Rasmussen H. N. 1995. Terrestrial Orchids from Seed to Mycotrophic Plant. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- 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 Environ., 13: 171-177.
- Rasmussen H. N., Whigham D. F. 1998. The underground phase: a special challenge in studies of terrestrial orchid populations. Botanical Journal of the Linnean Society, 126: 49-64.
- Richter, W. 1982. Orchideen: Pflegen, Vermehren, Züchten. Neumann, Radebeul.
- Sándor Zs. 2013. A *Himantoglossum adriaticum* szaporodásbiológiai vizsgálata. Keszthely
- Sramkó G., Molnár V. A., Hawkins J., Bateman R.M. 2014. Molecular phylogeny and evolutionary history of the Eurasiatic orchid genus *Himantoglossum* s.l. (Orchidaceae). - Annals of Botany DOI 10.1093/aob/mcu179
- Stenberg M. L., Kane M. E. 1998. In vitro seed germination and greenhouse cultivation of *Encyclia Boothiana* var. *erythronioides*, an endangered Florida orchid. Lindleyana 13(2): 101-112.
- Thompson P. A. 1977. Orchids from seed. Royal Botanic Gardens, Kew, England.

- 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. *Physiology of Plants* 66: 435±442.
- Van Waes J.M., Debergh P.C. 1986b. In vitro germination of some Western European orchids. *Physiology of Plants* 67: 253±261.
- Vujanovic V., St-Arnaud M., Barabeâ D., Thibeault G. 2000. Viability Testing of Orchid Seed and the Promotion of Colouration and Germination. *Annals of Botany* 86: 79-86.
- Wagner J., Hansel A. 1994. In vitro seed-germination of *Cypripedium calceolus* at various embryogenic stages. *Angewandte Botanik* 68 (1-2): 5-9.
- Weber R. W. S., Webster J. 2001. Teaching techniques for mycology: 14. Mycorrhizal infection of orchid seedlings in the laboratory. *Mycologist* 15: 55-59.
- Weinert, A. B. 1992. *Lehrbuch der Organisationspsychologie*. 3. Auflage, Psychologie VerlagsUnion: Weinheim.