

**Hazai lápi kosborfajok aktív védelmét megalapozó
élőhelyi és laboratóriumi vizsgálatok, különös
tekintettel a hagymaburok (*Liparis loeselii*) és a
tőzegorchidea (*Hammarbya paludosa*) fajokra**

Illyés Zoltán

Biológia Doktori Iskola (Dr. Erdei Anna)

Kísérletes Növénybiológiai Doktori Program (Dr. Szigeti Zoltán)

Témavezető:

Dr. Bratek Zoltán PhD

egyetemi adjunktus

Eötvös Loránd Tudományegyetem

Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszék

Budapest

2011

Bevezetés

Az orchideák szépségük és sok különleges tulajdonságuk mellett igen ritkák és sok veszélyeztetett fajt találunk köztük. A növényvilágban a legkisebb magvakat közöttük találhatjuk, és annak ellenére ritkák, hogy apró magvaik igen nagy számban, sok ezres vagy akár tízezres nagyságrendben termelődhetnek termésenként. Az igen apró, tartaléktápanyagot nem tartalmazó magok önmagukban képtelenek csírázni, így már a növény fejlődésének igen korai szakaszában egy másik szervezet, a megfelelő gombafaj segítségével szorulnak. A két szervezet között kialakuló szimbiózis nélkülözhetetlen a fejlődő orchidea számára.

Szinte minden élőhelytípusban található orchideafajok, de a lápoknak mégis kiemelkedő szerepük van az orchideafajok tekintetében. Sok orchideafaj kötődik ugyanis lápokhoz és egyéb vizes élőhelyekhez, több közülük tömeges lehet egy-egy természetközeli élőhelyfolton, viszont a lápok, mocsári élőhelyek igen sebezhetőek. Egykori lápjaink 97%-át elvesztettük, nagyrészt tudatos élőhely-átalakítás révén, a mezőgazdasági művelés és tőzgebányászat érdekében lecsapolásokkal, felszántással és tőzegkitermeléssel. A még megmaradt vizes élőhelyek pedig általában medence jellegük miatt veszélyeztetettek továbbra is, hiszen a nagy mennyiségben alkalmazott vegyszerek, műtrágyák gyűjtőhelyeivé válhatnak, ami elgyomosodásukhoz, növényfajaikban való elszegényedésükhöz vezet. A lápok drasztikus fogyatkozásuk és degradálódásuk miatt mára élőhelyi szinten is törvényi védelemben részesülnek minden rajtuk élő szervezettel együtt.

A lápi élőhelyek orchideái között a még tömeges fajok mellett vannak igen ritka, kiemelt figyelmet érdemlő taxonok. A hagymaburok (*Liparis loeselii*) és a tőzegorchidea (*Hammarbya paludosa*) a legritkább orchideáink közé tartoznak. Róluk szerzett ismereteink azonban nem állhatnak meg pusztán a növényfajok élőhelyi és fenológiai leírásainál, hiszen a természetben e két faj, rokonaikhoz hasonlóan, kizárólag gombával együtt fordul elő. A szimbionta gombák rendszertani besorolása mellett ismernünk kell azok elterjedését is ahhoz, hogy hatékonyan védhessük a gazdaszervezeteiket, az orchideákat. Aktív fajvédelmük során tehát a növény és gomba együttes ismerete, védelme és megőrzése hozhat csak eredményt.

Célkitűzések

Az orchidea-típusú mikorrhiza kutatása egy dinamikusan fejlődő ága a mikorrhizák kutatásának. Egyre mélyebb tudással rendelkezünk az egyes orchideafajok életciklusáról és gombapartnereinek taxonómiai helyzetéről, valamint a növény-gomba kapcsolat specifikusáról. Bizonyos ritka fajok esetében azonban ez az alaptudás is még hiányos, ahogyan a hagymaburok (*Liparis loeselii*) és a tőzegorchidea (*Hammarbya paludosa*) esetében is. Nem beszélve a potenciális orchidea-szimbionta gombák élőhelyi kötődéseiről, melyről még alig rendelkezünk ismeretekkel.

A fent vázolt lehetőségek tükrében munkám fő céljait az alábbi pontokban foglaltam össze:

1. A hagymaburok élőhelyi – *in situ* – csíráztatásával a természetes csírázási arány becslése.
2. A hagymaburok és a tőzegorchidea fajok szimbionta gombáinak kimutatása élőhelyen csíráztatott protokormjaikból
3. Hazai vizes élőhelyek orchidea-típusú mikorrhiza-kapcsolatban potenciálisan részt vevő gombacsoportjainak kimutatása, élőhelyi kötődéseiknek feltárása

A felvázolt célok elérése érdekében végzett munka módszereit a következő fejezetben részletezem.

Anyagok és módszerek

A tőzegorchideát *in situ*, egyetlen ismert hazai élőhelyén, a gelénesi Bábtaván csíráztattuk egy vegetációs perióduson keresztül.

A hagymaburok magjait *in situ* és *ex situ* körülmények között is csíráztattuk. *In situ* a hagymaburok magjait két, a faj jelenleg is élő populációjának élőhelyére (Pákozdi, Dunaharaszti), egy, a vizsgálati periódus alatt lappangó (2003-tól 2009-ig) populációjának élőhelyére (Kistómalom), egy bizonytalan (2005-től nincs adat) előfordulási helyére (Vaja) és a tőzegorchidea populációjának élőhelyére helyeztük ki. A kihelyezés és a visszagyűjtés közt eltelt idő szempontjából két eltérő kísérletet állítottunk be. Az említett élőhelyek mindegyikén történt azonos éven belül tavaszi kihelyezés és őszi begyűjtés. A Velencei-tavon pedig ezen felül történt őszi magkihelyezés és következő év nyár eleji, őszi és két évvel később őszi begyűjtés is. Az *in situ* magkihelyezéseket kettéhajtott malomipari szitaszövet (lyukátmérő 85 és 100 μm) belsejébe helyezett magokkal végeztük (Rasmussen és Whigham 1993). A hagymaburok *ex situ* csíráztatását az Eötvös Loránd Tudományegyetem Botanikus Kertjében, a Velencei-tóról származó tőzegdarabján végeztük.

A vizes élőhelyek orchidea-típusú mikorrhizát kialakító gombáinak vizsgálatához kilenc orchideát vontunk be a kísérletbe. Az *in situ* csíráztatott hagymaburok és tőzegorchidea a vizsgálat extrém vizes (úszólápi és dagadólápi) élőhelyeinek specialista fajai voltak. A többi, vizsgálatba bevont orchidea taxon szélesebb élőhelyspektrummal rendelkezik. Három orchidea taxont úszólápokon és teresztris élőhelyeken is vizsgáltuk: mocsári kosbor (*Orchis laxiflora* ssp. *palustris*), hússzínű ujjaskosbor (*Dactylorhiza incarnata*), mocsári nőszőfű (*Epipactis palustris*). További négy orchidea taxon egyedei csak teresztris élőhelyekről kerültek elő: szúnyoglábu bibircsvirág (*Gymnadenia conopsea*), szarvasbangó (*Ophrys oestrifera*), pókbangó (*O. sphegodes*), vitézkosbor (*Orchis militaris*). A vizsgálatba bevont élőhelyeket vízállapotuk szempontjából kategorizáltuk (úszóláp, teresztris láp, mocsár, sztyep), és növényzetük talajvíz ill. talajnedvesség indikációjának (WB index) segítségével (Borhidi 1995) jellemeztük.

Az orchideák protokormjaiból és gyökereiből gyökérszegmens (Bernard 1904), illetve peloton kiemelési technikával is izoláltunk gombatorzseket. Az izolált gombatorzseket molekuláris taxonómiai módszerrel vizsgáltuk és csoportosítottuk. Az egyes gombacsoportok esetében akár faji szintű azonosításra is alkalmas, riboszómális ITS régió (Frøslev és mtsi

2007) szekvenciái alapján soroltuk kládokba a gombatorzseinket. A DNS-szekvenciák pontos illesztését a ClustalW (Thompson és mtsi 1994) programmal, illetve ugyanazt az algoritmust felhasználó MEGA 4 (Tamura és mtsi 2007) programcsomaggal végeztük. A filogenetikai elemzéseket ugyancsak a MEGA 4 programcsomag programjaival végeztük.

Eredmények és értékelésük

Munkám általam legfontosabbnak tartott eredményeit az alábbi pontokban foglalom össze:

- Sikerült izolálni és azonosítani a tőzegorchidea (*Hammarbya paludosa*) mikorrhiza-képző gombapartnerét a növény *in situ* csíráztatott protokormjaiból. A szimbionta ITS szekvenciája alapján egy *Tulasnella* nemzetséghez tartozó gomba.
- Az *in situ* csíráztatás módszere úszólápokon is sikeresen alkalmazható volt. Mind a hagymaburok két vizsgált úszólápi élőhelyének nád-sás tőzegében (Velencei-tó, Soroksári-Duna: Dunaharaszti), mind a tőzegmohás bábtavai tőzegorchideás élőhelyen csíráztak az orchideák magjai.
- A vizsgálatokban sikerült kimutatni, hogy a hagymaburok magjai a természetben igen alacsony (0,1-0,5%) arányban csíráznak. Ezzel az adattal a faj életciklusának egy igen lényeges szakaszáról kaptunk információt, mely szakaszt eddig nem vizsgáltak (Wheeler és mtsi 1998, Rolfsmeier 2007).
- Az az eredmény, hogy a hagymaburok magjai a faj élőhelyen fellelhető, kifejlett töveinek közelében jelentősen nagyobb arányban csíráznak, mint azoktól távol, a mikorrhiza-gomba kifejlett orchideák körüli fokozott jelenlétére utal. További vizsgálatokat igényel annak a kiderítése, hogy a sűrűbb gomba előfordulást követi-e az orchideák megtelepedése, vagy a sikeres egymásra találás után dúsul-e fel a gomba micéliuma az orchidea körül.
- Az úszólápokon egy *Tulasnella*, anamorf nevén *Epulorhiza* („I.”) taxon dominanciája figyelhető meg, a szárazabb élőhelyeken pedig egy ettől ITS szekvencia hasonlósága alapján távol álló *Epulorhiza* („II.”) csoport képviselői dominálnak. Ezzel az eredménnyel egybecseng Bonnardeaux és mtsi (2007) azon megállapítása, miszerint a terjedőben levő *Disa bracteata* orchidea faj sikerét *Epulorhiza* típusú (a mi általunk

kapott I. csoporthoz hasonló) mikorrhiza-partnerének zavarástűrő tulajdonsága okozhatja.

- A teresztris élőhelyeken az orchidea-mikorrhizát kialakító gombacsoportok nagyobb változatosságban jelennek meg, mint az úszólápokon. A hazánkban úszólápi specialista hagymaburok látszólagos gomba-partner fajspecifitását a potenciális gombapartnerek számának extrém vizes élőhelyek irányában történő csökkenése okozza, vagyis nem zárható ki, hogy a hagymaburoknak más gombafajok is lehetnek szimbionta-partnerei.
- A hagymaburok ritkasága és hazai előfordulásait figyelembe véve úszólápi élőhelyekhez való kötődése nem magyarázható a vele szimbiózisban élő gombacsoportok kizárólagosan úszólápi megjelenésével, mivel ezek a teresztris élőhelyeken is kimutathatók voltak. Ebből arra lehet következtetni, hogy a hagymaburok hazánkban (mikro)klimatikus okok miatt él szinte kizárólag úszólápi élőhelyeken.

A „Célkitűzések” fejezetben munkám fő céljait három pontban jelöltem meg, ennek tükrében az alábbiakban részletezem röviden az elért eredményeket:

1. A hagymaburok életciklusának első, csírázás fázisáról korábban nem rendelkeztünk terepi ismeretekkel. Munkám során sikeresen alkalmaztam az orchideáknál használt *in situ* csíráztatás módszerét, mely által sikerült megfigyelni a hagymaburok természetes élőhelyein végbemenő csírázási folyamatokat, és meghatározni a csírázás nagyságrendjét.
2. A ritka orchideák mikorrhiza-partnereinek vizsgálata természetvédelmi problémákat is felvet, miszerint a hagyományos gombaizolálási technikák az élő orchideatövek pusztulását okozzák. Ezzel szemben az élőhelyen csíráztatott magok vizsgálata nem veszélyezteti az orchideák természetes populációját. A mindössze néhány tíz egyedből álló egyetlen hazai tőzegorchidea élőhelyen és két hagymaburok élőhelyen sikerült azonosítani az orchideafajok mikorrhiza-képző gombapartnerait az élőhelyen csíráztatott magok segítségével.

3. A vizes élőhelyek nemcsak hazánkban, de egész Európában egyre zsugorodó, veszélyeztetett élőhelyek. Sok értékes növény és állatközösségnek adnak otthont ezek az élőhelyek, melyek többek között igen értékes orchidea élőhelyek is. Az orchideafajok élőhelyekhez kötődését már régóta vizsgálják, és erről igen pontos ismereteink vannak. A velük szimbiózisban élő gombafajok élőhelyi preferenciáiról, azok változatosságáról korábban nem álltak rendelkezésre adatok. Munkám során az úszólápi, tőzeglápi, teresztris lápi és mocsári élőhelytípusok, valamint a hozzájuk kapcsolódó szárazabb sztyeppi élőhelyek orchidea-szimbiota sokféleségét vizsgáltam. Eredményeim alapján az egyes élőhelytípusok gombavilága jól elkülönül, egyes gombacsoportok bizonyos élőhelyeken dominánssá válnak (*Tulasnella* spp. – úszóláp, *Epulorhiza* II-es csoport száraz élőhelyek).

Irodalomjegyzék

- Bernard N. (1904): Recherches expérimentales sur les orchidées. I-III. Methodes de culture; champignon endophyte; la germination des orchidees. *Revue Generale de Botanique* 16: 405-451.
- Borhidi A. (1995): Social behaviour types, the naturalness and relative ecological indicator values of the higher plants in the Hungarian Flora. *Acta Botanica Hungarica* 39: 97-181.
- Frøslev T. G., Jeppesen T. S., Laessoe T., Kjøller R. (2007): Molecular phylogenetics and delimitation of species in *Cortinarius* section *Calochroi* (Basidiomycota, Agaricales) in Europe. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44: 217-227.
- Rasmussen H. N., Whigham. D. F. (1993): Seed ecology of dust seeds in situ: A new study technique and its application in terrestrial ecology. *American Journal of Botany* 80: 1374-1378.
- Rolfsmeier S. B. (2007): *Liparis loeselii* (L.) Rich. (yellow widelip orchid): a technical conservation assessment. USDA Forest Service, Rocky Mountain Region. Elérhető: <http://www.fs.fed.us/r2/projects/scp/assessments/liparisloeselii.pdf>
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. (2007): MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positionspecific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Wheeler B. D., Lambley P. W., Geeson J. (1998): *Liparis loeselii* (L.) Rich. In eastern England: constraints on distribution and population development. *Botanical Journal of Linnean Society* 126: 141-158.

A témához kapcsolódó publikációk

Referált tudományos folyóiratokban megjelent dolgozatok:

- Illyés Z.**, Ouanphanivanh N., Rudnóy Sz., Orczán Á. K., Bratek Z. (2010): The most recent results on orchid mycorrhizal fungi in Hungary. *Acta Biologica Hungarica* 61 (Suppl.): 88-96. (in press) (impact factor 2009: 0,551)
- Illyés Z.**, Halász K., Rudnóy Sz., Ouanphanivanh N., Garay T., Bratek Z. (2009): Changes in the diversity of the mycorrhizal fungi of orchids as a function of the water supply of the habitat. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 83: 28-36. (impact factor 2009: 0,523)
- Bratek Z., **Illyés Z.**, Szegő D., Vértényi G. (2001): Az orchidea-típusú mikorrhiza képződésének és működésének egyes kérdései. *Botanikai Közlemények*. 88: 185-193.

Tudományos könyvek részletei:

- Illyés Z.**, Molnár V. A. (2011): Lápi hagymaburok – *Liparis loeselii* (L.) L.C.M. Richard 1817. In: Molnár V. A. (szerk.): Magyarország orchideáinak atlasza. Kossuth Kiadó, Budapest, pp. 279-281.
- Illyés Z.** (2011): Orchidea-típusú mikorrhiza. In: Molnár V. A. (szerk.): Magyarország orchideáinak atlasza. Kossuth Kiadó, Budapest. pp. 103-115.
- Illyés Z.** (2006): Az orchideák mikorrhizája. In: Ujhelyi P., Molnár V. A. (szerk.): Élővilág enciklopédia II. – A Kárpát-medence gombái és növényei. Kossuth Kiadó, Budapest, p. 153.
- Illyés Z.** (2006): A hagymaburok (*Liparis loeselii*). In: Ujhelyi P., Molnár V. A. (szerk.): Élővilág enciklopédia II. – A Kárpát-medence gombái és növényei. Kossuth Kiadó, Budapest, p. 166.

Teljes közlemények konferencia-kiadványokban:

- Illyés Z.**, Takács A. A., Takács G., Kiss P. (2007): Szempontok a *Liparis loeselii* magyarországi élőhelyeinek természetvédelmi szempontú kezeléséhez. III. Magyar Természetvédelmi Biológiai Konferencia, Eger, 2005. november 3-6., Természetvédelmi Közlemények 13: 403-410.
- Illyés Z.**, Rudnóy Sz., Bratek Z. (2005): Aspects of *in situ*, *in vitro* germination and mycorrhizal partners of *Liparis loeselii*. Proceedings of the 8th Hungarian Congress on

Plant Physiology and the 6th Hungarian Conference on Photosynthesis, 2005 august 22-25., Szeged, Acta Biologica Szegediensis 49: 137-139.

Kivonatok folyóiratokban, kongresszusi és konferencia kiadványokban

- Illyés Z.**, Ouanphanivanh N., Jezovith G., Bratek Z. (2008): Orchideaszimbionta gombák azonosítása molekuláris taxonómiai módszerekkel. Molekuláris taxonómiai, filogenetikai és filogeográfiai kutatások Magyarországon, Szakmai találkozó, Diószegi Sámuel emlékére. 2007. november 17., Debrecen, Kitaibelia 13: 211.
- Halász K., Geösel A., Lukács N., Bratek Z., **Illyés Z.** (2008): The use of symbiotic fungi to propagate Hungarian native orchids. First Symposium on Horticulture in Europe, 2008. february 17-20, Ausztria, Vienna, Book of Abstracts: p. 250.
- Halász K., Geösel A., Lukács N., Bratek Z., **Illyés Z.** (2007): Applying symbiotic fungi to germinate Hungarian native orchids. 15th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest, July 18-20, 2007. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica. Abstracts. 54: 44.
- Ouanphanivanh N., **Illyés Z.** (2006): Hazai orchidea fajok és szimbionta gombáik vizsgálata: fajspecifitás vagy élőhelyspecifitás. Magyar Biológiai Társaság, Botanikai Szakosztály, 1422. szakülés, 2006. december 4., Budapest, Botanikai Közlemények 93: 127.
- Illyés Z.**, Garay T., Ouanphanivanh N., Bratek Z. (2006): Orchidea szimbionta gombák ökológiai diverzitása vizes élőhelyeken. 7. Magyar Ökológus Kongresszus, Budapest, 2006. szeptember 4-6, Előadások és poszterek összefoglalói: p. 91.
- Illyés Z.**, Eszéki E., Ouanphanivanh N., Garay T., Halász K., Geösel A., Lukács N., Bratek Z. (2006): Conservation methods of Hungarian native orchids and identification of symbiotic mycorrhizal fungi. 1st European Congress of Conservation Biology, Eger, 2006. augusztus 22-26. Book of Abstracts: p. 119.
- Illyés Z.**, Eszéki E., Rudnóy Sz., Szegő D., Bratek Z. (2005): *Ex-situ* conservation of *Liparis loeselii* (Orchidaceae) at Eötvös Loránd University, Hungary. XVII International Botanical Congress, Vienna, Austria Center, 17 - 23 July 2005., Abstracts: p. 607.
- Illyés Z.** (2005): Az orchideákat mikorrhizáló gombák különböző izolálási technikáinak alkalmazása a *Liparis loeselii* aktív védelmében. Magyar Biológiai Társaság, Botanikai Szakosztály, 1408. szakülés, 2005. április 18., Budapest, Botanikai Közlemények 92: 214.

- Illyés Z.**, Bratek Z., Balogh M. (2003): Élettani vizsgálatok a *Liparis loeselii* védelméért. Magyar Biológiai Társaság, Botanikai Szakosztály, 1390. szakülés, 2003. április 7., Budapest, Botanikai Közlemények 90: 162-163.
- Illyés Z.**, Bratek Z., Balogh M. (2003): *Liparis loeselii* szimbiotikus nevelése aktív védelme érdekében. 6. Magyar Ökológus Kongresszus, 2003. augusztus 27-29. Gödöllő, Előadások és Poszterek összefoglalói: p. 118.
- Illyés Z.** (2003): Egy lehetséges kísérleti módszer a *Liparis loeselii* aktív védelmében. IX. Nemzetközi Környezetvédelmi Szakmai Diákkonferencia. 2003. július 2-4., Mezőtúr, Összefoglalók: p. 23.
- Illyés Z.** (2003): A *Liparis loeselii* (L.) Rich mikroszaporításának lehetőségei. XXVI. Országos Tudományos Diákköri Konferencia Biológia Szekció, Összefoglalók: p. 94.
- Bratek Z., Halász K., Szegő D., **Illyés Z.** (2002): Mycorrhizal fungi from native orchids of Hungary. Második Magyar Mikológiai Konferencia, 2002. május 29-31. Szeged, Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 49: 375.
- Illyés Z.**, Balogh M., Bratek Z. (2002): A *Liparis loeseli* (L.) Rich. hazai előfordulásai és a mikroszaporítással történő állományerősítés lehetőségei. Aktuális flóra- és vegetációkutatás a Kárpát-medencében V. 2002. március 8-10. Pécs, Összefoglalók: p. 92.
- Illyés Z.** (2002): A *Liparis loeselii* (L.) Rich. hazai refúgiumai. Magyar Biológiai Társaság, Botanikai Szakosztály, 1382. szakülés, 2002. május 13., Fiatal Botanikusok Előadói Versenye II., Budapest, Botanikai Közlemények 89: 230.

Népszerűsítő cikkek:

- Illyés Z.** (2009): Hazai orchidea fajok élőhelyválasztási stratégiái. Orchideák és Broméliák. Magyar Orchidea Társaság Lapja, 2009/1: 11-15. (ISSN szám: 230-8290)
- Garay T., **Illyés Z.** (2008): Hogy unokáink is láthassák. Orchideavédelem – a laborból. Élet és Tudomány. 43: 1359-1361.