

Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar,
Biológiai Intézet, Növénytani tanszék

Csíráztatási protokoll kidolgozása herbáriumi maganyagokra

Készítette:

Tóth Kata Mária

Témavezetők:

Dr. Cserhalmi Dániel
egyetemi adjunktus

Endrédi Anett
biológus

Budapest

2015

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS	3
1.1. A TÉMA JELENTŐSÉGE	3
1.2. CÉLKITŰZÉSEK, KÉRDÉSEK, HIPOTÉZISEK	4
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
2.1. AZ ÉLETKÉPESSÉGET BEFOLYÁSOLÓ TÉNYEZŐK	6
2.2. AZ ÉLETKÉPESSÉG TESZTELÉSÉNEK MÓDSZEREI	9
2.3. A DORMANCIA FEOLDÁSA ÉS A CSÍRÁZTATÁS	11
2.4. A VIZSGÁLT FAJOK BIOLÓGIÁJA	11
3. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	14
3.1. MAGOK EREDETE, DOKUMENTÁCIÓJA	14
3.2. AZ ELŐKÍSÉRLET.....	14
3.3. MÓDOSÍTOTT KÍSÉRLETI ELRENDEZÉS	15
3.4. STATISZTIKAI ELEMZÉSEK	19
4. EREDMÉNYEK.....	20
4.1. MÓDSZERTANI EREDMÉNYEK	20
4.2. BIOLÓGIAI EREDMÉNYEK.....	22
4.2.1. Tömegmérések	22
4.2.2. Dormancia	23
4.2.3. Csírázás	26
5. DISZKUSSZIÓ.....	29
6. ÖSSZEFOGLALÓ.....	35
7. SUMMARY	36
IRODALOM	37
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	42
MELLÉKLETEK.....	43

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 (úgynevezett ortodox) magok tárolásával és későbbi csíráztatásával elősegíthető az egyes fajok megőrzése (COCHRANE et al. 2007), számos aktuális kutatás témája a fent említett tulajdonságok vizsgálata. E munkák azonban elsősorban gazdaságilag hasznos illetve kiemelkedően veszélyeztetett fajokra fókuszáltak. Épp ezért csak kevés adatunk van a természetes társulásokat 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 nagyszámú tényező (forrásterület éghajlata/időjárása, genetikai variabilitás, tárolási körülmények), illetve a sokszor túl alacsony mintaelemszám miatt. Ugyanakkor a módszer alkalmas az egyes fajok magjaira jellemző potenciális életképesség megállapítására, és mivel ezt egyre több kutatás

használja ki (MILBERG, 1994; LEINO & EDQUIST 2010, GODEFROID et al. 2011), idővel elegendő adat állhat rendelkezésre egy metaelemzéshez, amivel a fenti cél elérhetővé válhat.

1.2. Célkitűzések, kérdések, hipotézisek

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

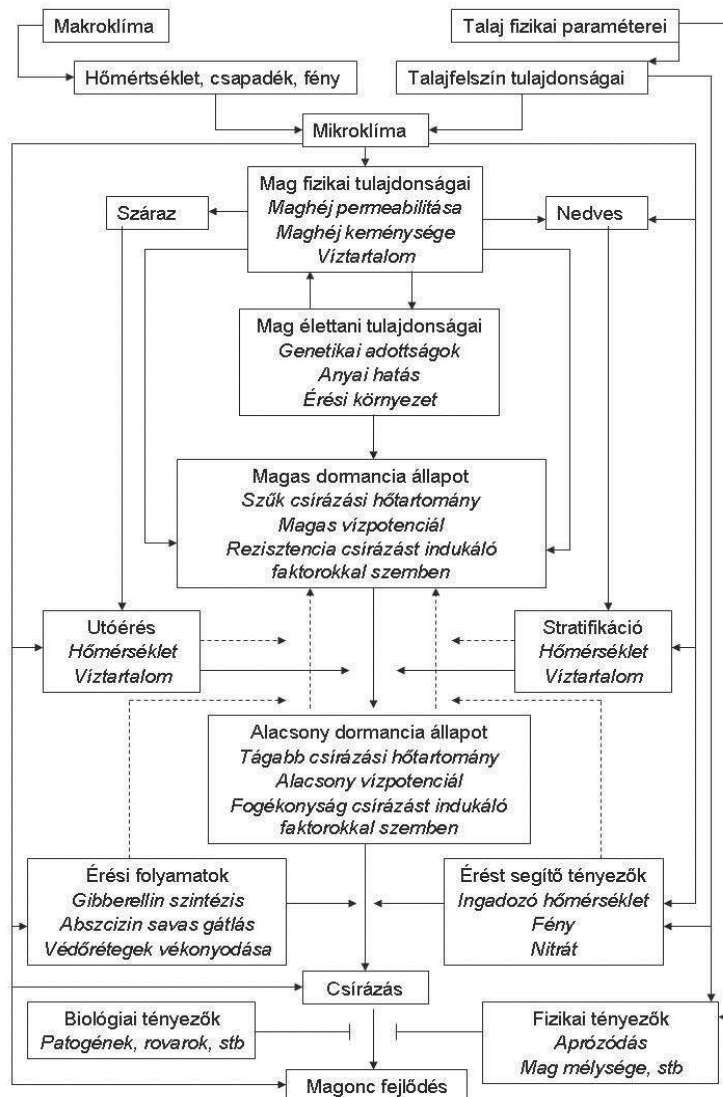
A szakirodalom alapján van létjogosultsága a herbáriumból történő életképesség-vizsgálatoknak (GODEFROID et al. 2011), de az általunk vizsgált fajokra még nincs kidolgozott protokoll, és a vizsgálat korlátai sem ismertek. Jelen kutatásban célunk volt egy olyan csíráztatási protokoll létrehozása, amely alkalmas arra, hogy 1) maximalizálja a várható csírázási arányt; 2) elősegítse a fentiekhez hasonló alapkutatási kérdések megválaszolásához szükséges adatok összegyűjtését. Az előbbi segítheti a mesterséges magbankokban történő magtárolás hatékonyságát, míg utóbbi a gyakorlati természetvédelemnek nyújthat hasznos információkat.

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. A magok

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.

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 csirázásra 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).

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

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

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).

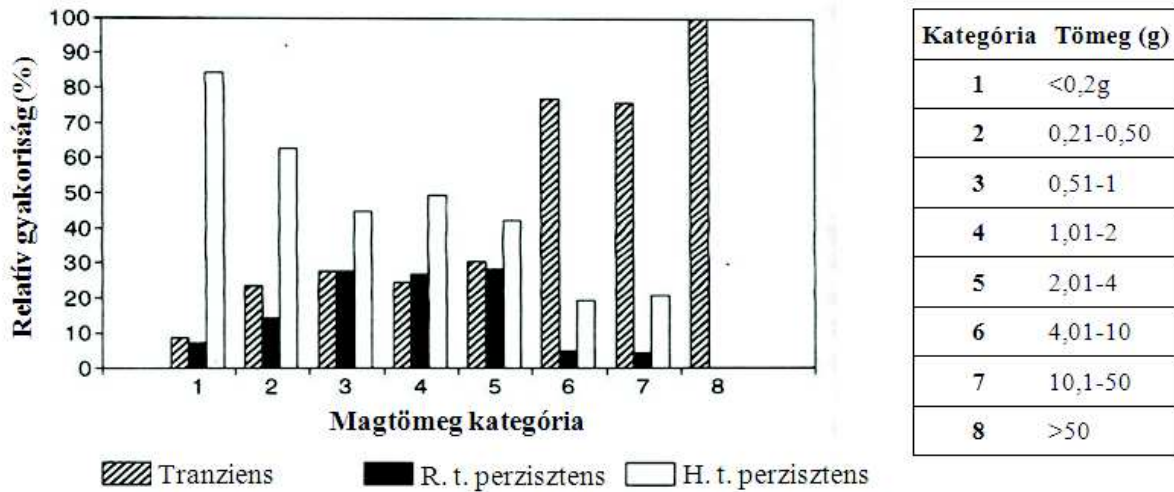
Az átlagos magélettartam tekintetében nagy eltérések lehetnek a növénycsaládok között. Vannak olyan családok (pl. *Cyperaceae*), ahol általában egy éven belül drasztikusan lecsökken a csírázóképeség (VAN DER VALK et al. 1999), ellenben például a *Fabaceae* családban az általánosnak mondható fizikai dormanciával 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 növénycsaládon 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 fentieken 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). Másrészt eltérést mutathat a kis, illetve nagy tömegű magokkal rendelkező fajok élettartama (CSONTOS, 2001). A szakirodalom alapján ez az összefüggés fordítottan arányos, vagyis a kisebb magvú fajok gyakran tovább megőrzik életképességüket (2. ábra).

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

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 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 csírázóképeséggel 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.

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 hibáktól 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. 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 (ELLIS et al. 1985; SUSZKA et al. 2008), ezen kívül úgynevezett gyorseszteket is alkalmaznak. Ilyen többek között a magok atmosférát követő tesztcsikkal történő cukormennyiség-meghatározás, a GADA-teszt (a glutaminsav-dekarboxiláz aktivitás mérése) (ELLIS et al. 1985) és a röntgenfelvétellel történő vizsgálat (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 sötétetés, 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 dormancia megszűnését a maghéj teljes vagy részleges eltávolításával lehet elérni (RAJJOU & DEBEAUJON, 2008). A keménymaghéjúság 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

Kísérleteink főként öt pillangósvirágú fajra fókuszáltak (3. ábra), 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 úgynevezett ortodox típusú maggal rendelkeznek.

3. ábra: A kutatás során vizsgált fajok



A fajok balról jobbra: *A. cicer*, *A. contortuplicatus*, *A. glycyphyllos*, *A. excapus*, *R. lutea*, *R. phyteuma*, *T. arvense*, *Th. arvense*.

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 erdőszélek 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 elöntött, mocsaras talajokon él, áprilistól júniusig virágzik. Az *Astragalus excapus* 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 excapus* 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).

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 ortodox típusúak (RBG).

A protokoll pontosabb kidolgozásának céljából, valamint a herbáriumi magok életképességének szélesebb körű tesztelése okán a *Resedaceae* családba tartozó *Reseda lutea*-t és *Reseda phyteuma*-t (3. ábra), illetve a *Brassicaceae* családba tartozó *Thlaspi arvense*-t (3. ábra) 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. Eurázsiaiban őshonos, gyepekben és utak mentén, zavart élőhelyeken gyakori (BOJŇANSKY & FARGAŠOVÁ, 2007).

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 tizedes jegy pontosság szükségességének oka egyes magok rendkívül apró mérete volt, ami miatt már egy tizedes jegy 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 mérési pontossága között.

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-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.

3.3. Módosított kísérleti elrendezés

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

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.	61
<i>A. glycyphyllos</i>	Debrecen	1949.10.	30
<i>A. glycyphyllos</i>	NA	1992.06.	58
<i>A. glycyphyllos</i>	Románia	2004.	62
<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

2. táblázat: A módosított elrendezésben használt *Astragalus* magtételtek származási helye és gyűjtési ideje (n = magok száma kezelésként)

A csíráztatást megelőzően az előkísérlethez hasonlóan minden mag tömegét egyesével lemértük. A csíráztatáshoz azonban 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. A magok egyedi kódot kaptak, amely magába foglalta a magot tartalmazó plate sorszámát, a kezelés módját, illetve a mag elhelyezkedését a lemezen. (4. 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 szkarifikáltunk, majd átlagosan 10 nap csíráztatás után a ki nem csírázott magokon TTC tesztet végeztünk.

4. ábra: ELISA-plate-es csíráztatás



A piros pont kódja: 007KC1

A második kísérletsorozatban a magokat először kizárólag kezelés nélkül csíráztattuk. Az esetleges keménymaghéjúságot egyrészt a kezelés nélküli magok vízfelvételével, másrészt egy mesterségesen megsértett maghéjú csoport csírázási vizsgálataival teszteltük. A változásokat két hétig követtük nyomon, a kicsírázottakat további vizsgálatok céljából kineveltük, a megduzzadtakat a csírázási idő letelte után TTC-tesztnak 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 (5. ábra).

A herbáriumi 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).

5. ábra: Festődési mintázatok



A 004SZKD2 és a 004SZKE2 festődött, de csak a másodiknál jól elkülöníthető a mintázat.
A 001SZKA3 nem festődött.

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>	Sopronbánfalva	1934	25
<i>Thlaspi arvense</i>	Kerepes	1911	29
<i>Thlaspi arvense</i>	Predeal	1906	30

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

Változó mintaelemszámú csoportokkal dolgoztunk, azonban az egy tételhez tartozó kezelt és kezeletlen csoportokban megegyezett a magok száma. A *Thlaspi arvense* esetén a tételek alacsony magszáma miatt csak kezelés nélküli csoportokat használtunk

A csíráztatás szintén az előkísérletekben beállítottakkal megegyező környezeti paraméterek mellett történtek, Petri-csészékben. Ez alól csak a sötét-kezeléses *Reseda* csoportok tekinthetőek 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.

3.4. Statisztikai elemzések

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

Ezen kívül kiszámítottuk az egyes Petri-csészékhez tartozó csírázási százalékokat, a szkarifikált és kontroll csoportokat külön-külön tekintve. A csírázási arányok összehasonlításánál a várt értékektől függően Khi-négyzet tesztet homogenitás vizsgálatára, illetve Fisher-féle egzakt tesztet használtunk.

4. Eredmények

4.1. Módszertani eredmények

Figyelembe véve a szakirodalmat és saját kísérleteink tapasztalatait, összeállítottunk egy protokoll-javaslatot, mely a herbáriumokból származó pillangósvirágú vagy más, feltételezhetően fizikai dormanciával rendelkező fajok magjainak csíráztatására, vizsgálatára alkalmas (6. ábra). Ehhez az alábbi megfigyeléseket használtuk fel:

A csíráztatás előtt javasolt a magok egyedi lemérése, mely egyrészt lehetővé teszi a gyenge minőségű, erősen sérült vagy láthatóan léha magok kisselektálását, ha a csírázási arány maximalizálása a célunk. Másrészt mindez adatot szolgáltathat többek között a magtömeg-csírázási képesség összefüggésének vizsgálatához is.

A csíráztatás módját tekintve a Petri-csészés csíráztatás számos hátránnyal járt. Az egyik legnagyobb hátrány a magok egyedi nyomon követhetőségének hiánya. Emellett a penésszel történő átfertőződés veszélye is magas, a fertőzött magok eltávolítása után is gyakran tovább fertőződtek az egészségesek. Ezt még a *Reseda phyteuma* egyes tételei esetén használt hidrogén-peroxidos fertőtlenítés sem szüntette meg.

A keménymaghéjúság mértékének meghatározásához első lépésben kizárólag konrollként javasolt csíráztatni a magokat. A vízfelvétel alapján a magok állapotának leírására három kategóriát alkalmazhatunk.

1. Változást nem mutató magvak: a keménymaghéjúság még jelen van, emiatt a mag nem képes vizet felvenni.
2. Duzzadt magvak: a maghéj vízzáró rétege vagy megsérült vagy feloldódott, nincs keménymaghéjúság, de a magok nem feltétlenül életképesek
3. Csírázott magvak: a keménymaghéjúság feloldódott és a sziklevel megjelenésével az embrió bizonyítottan életképes.

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. Így a megduzzadt, nem penészes és ki nem csírázott magokon ezután kémiai életképesség-vizsgálat javasolt (TTC-teszt). Ennek segítségével elválaszthatóak a lélegző sejtek az élettelenektől, így becsülhető, hogy életképes volt-e a mag. 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 keménymaghéjúság általánosan jelen van, magasabb (1%-os) oldatkonzentrációt javasolunk.

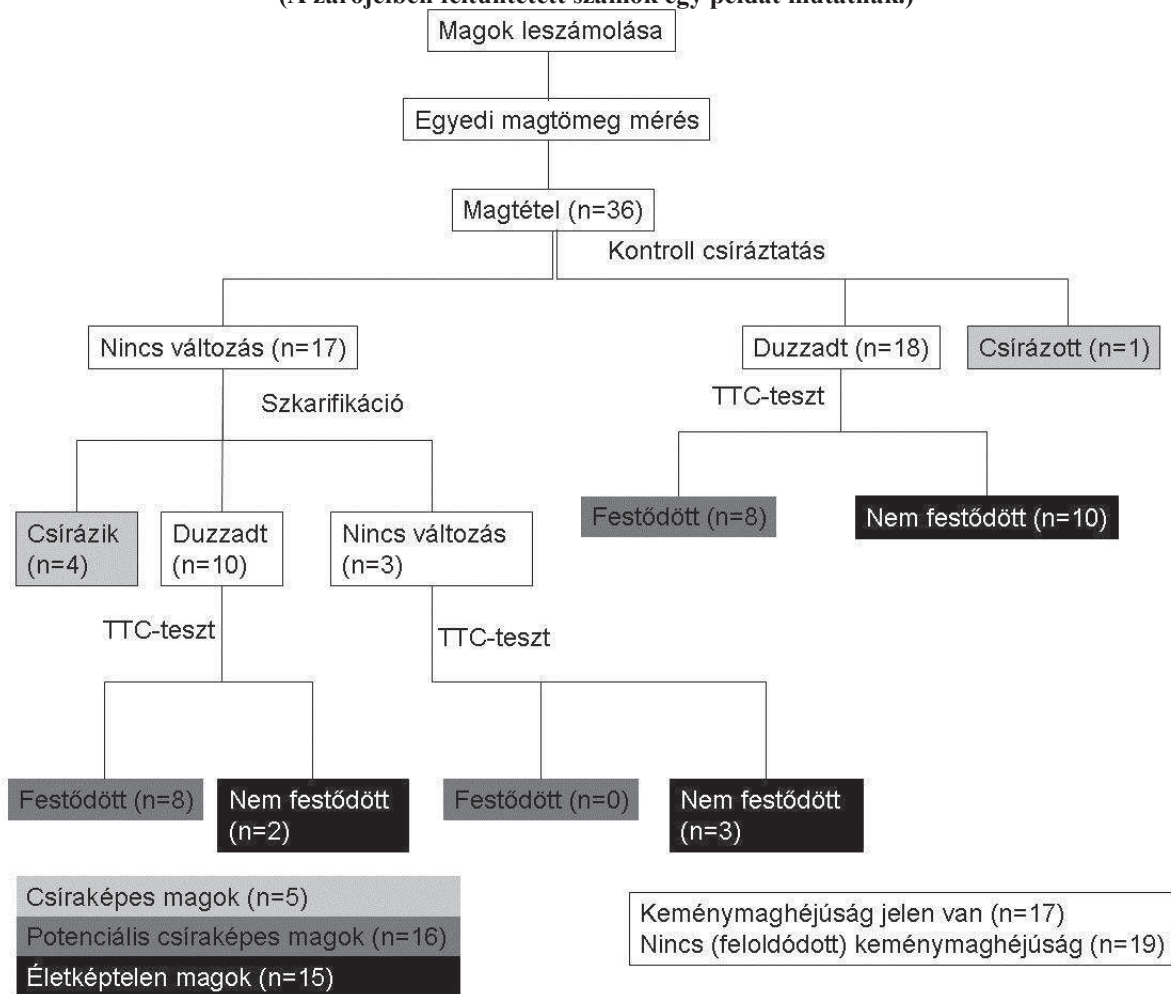
A kontroll csíráztatott magok közül a változást nem mutató, vagyis kemény maghéjú magokat ezután egyesével szkarifikálni kell, majd megismételni a csíráztatást, hogy pontos képet kapjunk a csírázó-képes magok arányáról. A dormancia megtörésére azért a szkarifikációt javasoljuk, mivel az előkísérletek során használt forrázásos eljárás hatékonysága jóval elmaradt a pengével történő maghéjroncsoláshoz képest (2. melléklet; $p < 0,001$, Khi-négyzet teszt).

A csíráztatási periódus végén szintén három kategóriába sorolhatóak a magok, azonban ezek más jelentéssel bírnak a magok állapotára nézve.

1. Változást nem mutató magvak: vagy nem jól szkarifikált vagy üres, léha magok
2. Duzzadt magvak: a keménymaghéjúság jelen volt, ezt a szkarifikációval megszüntettük, azonban a magok nem biztos, hogy életképesek
3. Csírázott magok: a keménymaghéjúság jelen volt, de a szkarifikáció ezt megszüntette, így a mag fejlődésnek indulhatott, és a szikleveél 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 keménymaghéjúság 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 esetén.

6. ábra Javasolt csíráztatási protokoll herbáriumai pillangósvirágú fajok esetén
(A zárójelben feltüntetett számok egy példát mutatnak.)

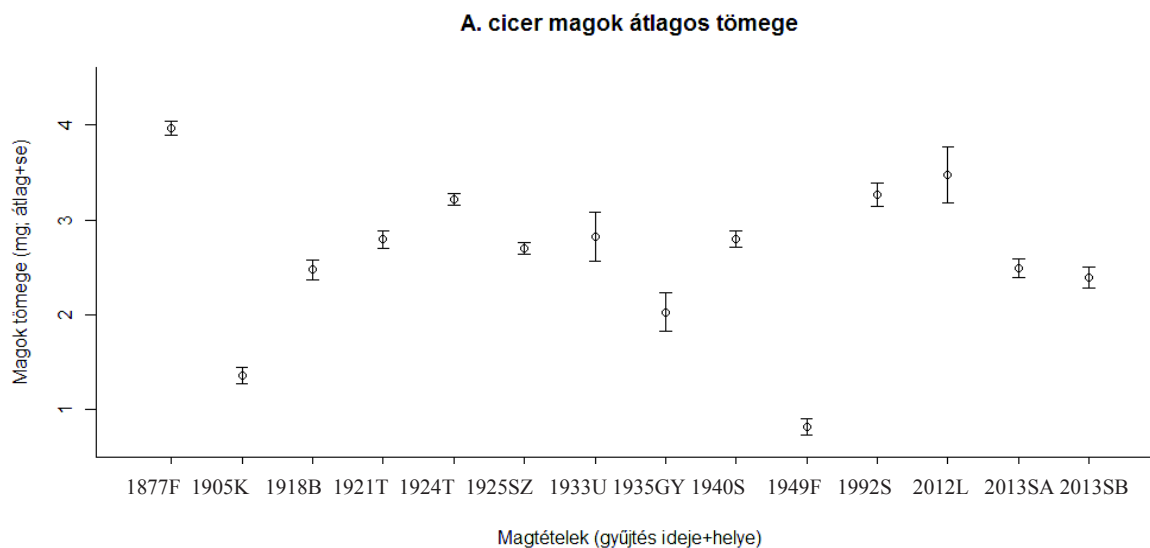


4.2. Biológiai eredmények

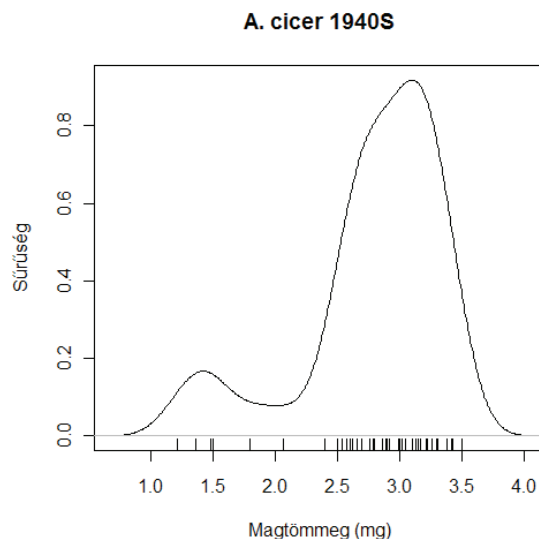
4.2.1. Tömegmérések

A módosított kísérleti elrendezésnél egyik fajnál sem találtunk egyértelmű trendet a magok átlagos tömegét tekintve az idő függvényében (7. ábra). Ugyanakkor az megfigyelhető, hogy a magtömegek eloszlása az egyes tételekben sok esetben nem normális, hanem jellemzően kétszcúszú görbét mutatott (8. ábra). A tömegadatokat jelen dolgozatban nem hasonlítottuk össze, ez a kutatás későbbi szakaszában várható, amennyiben megfelelő számú adat gyűlik össze. Általánosan elmondható, hogy a vizsgált fajokra az RGB adatbázisában megtalálható értékektől kisebb és nagyobb átlagos magtömeg egyaránt jellemző volt, de ez az eltérés egyik esetben sem látszott jelentősnek

7. ábra: *A. cicer* átlagos magtömegek tételenként az idő függvényében



8. ábra Magtömegek kétsúcsú eloszlása



4.2.2. Dormancia

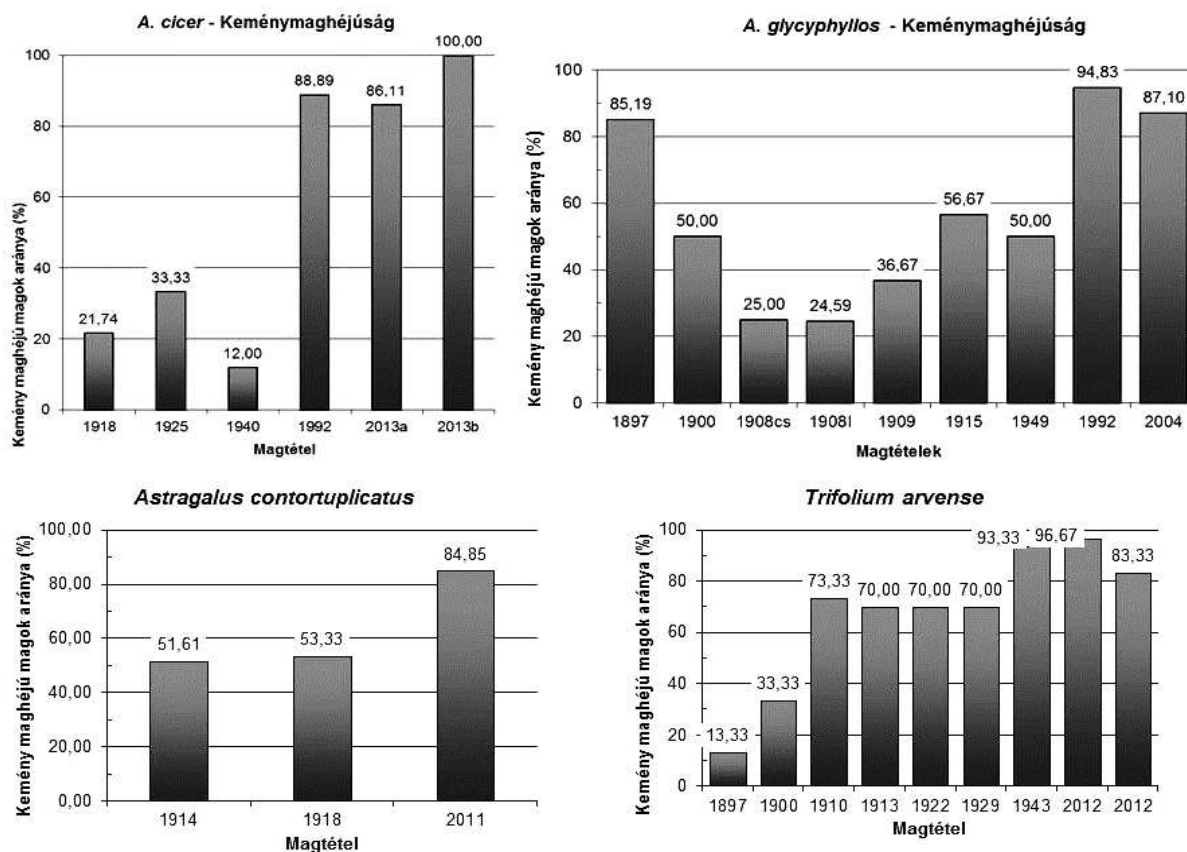
A pillangósvirágú fajainknál a fizikai dormancia, vagyis a keménymaghéjúság jelenlétét és mértékét is vizsgáltuk az egyes tétélekben. Ezt a meg nem duzzadt, tehát vízfelvételt nem mutató kontroll magok arányával jellemeztük. Eredményeinek a 9. ábra foglalja össze.

Az *Astragalus contortuplicatus* 1914/15-ös magtételében 15db magnál tapasztaltunk vízfelvételt, azaz a keménymaghéjúság 51,61%%-os. Az 1918-ból származó magok esetén 14 mag mutatott vízfelvételt, tehát az előzőhöz hasonló mértékben, 53,33%-ban maradt fenn a

keménymaghéjúság. A friss, 2011-ből származó magok közül mindössze 5db mag vett fel vizet (majd ki is csírázott). Ezek alapján 84,85%-ban volt jelen a keménymaghéjúság.

Összehasonlítva ezeket az arányokat, azt tapasztaljuk, hogy míg a két régebbi magtétel azonos mértékű dormanciát mutat ($p>0,05$, Khi-négyzet teszt), addigra a friss tétel szignifikánsan nagyobb mértékű keménymaghéjúsággal rendelkezett ($p<0,01$, Khi-négyzet teszt).

9. ábra : Pillangósvirágú fajok keményhéjúsági aránya az idő függvényében



Az *Astragalus cicer* 1918-ből származó tételénél a 23 kontroll magból 18 mag megduzzadt, ami 21,74%-os keménymaghéjúságot feltételez. Az 1925-ben gyűjtött magoknál ez az érték 33,33% (18 duzzadt mag), míg az 1940-es tételnél mindössze 12,00% (22 duzzadt mag) volt.

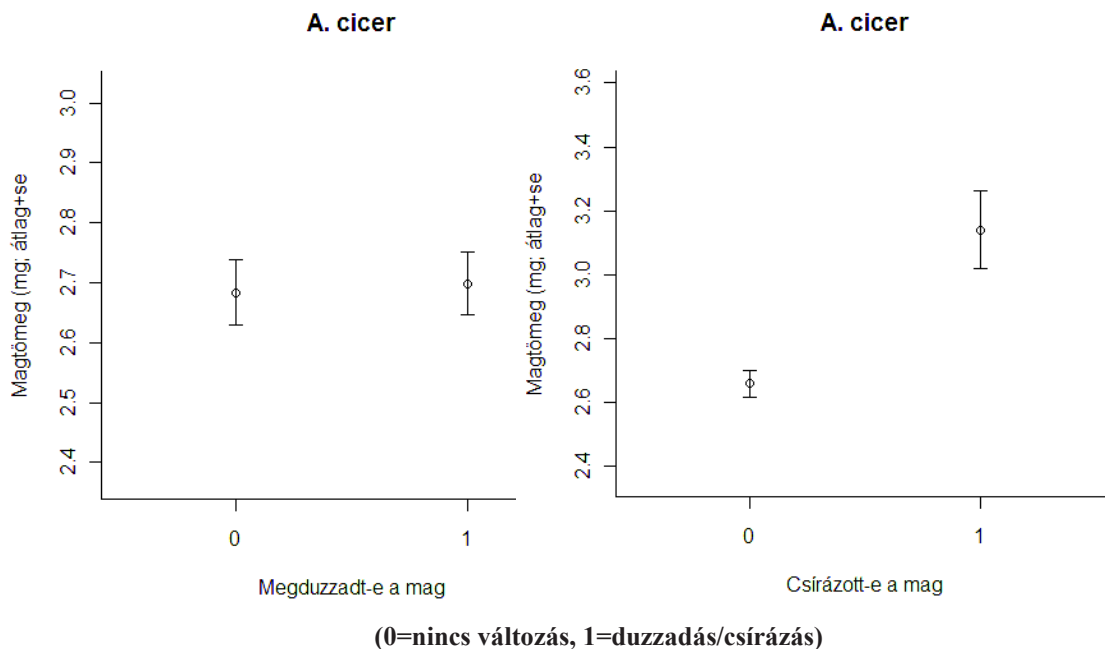
Az 1992-es, strasbourgi gyűjtésből 4 mag duzzadt meg, így a kemény maghéj még 89%-ban jelen volt. A Seregélyesről, 2013-ból származó két magtétel közül az egyikben 5 vett fel vizet (86,11%-os keménymaghéjúság), a másikban pedig egy sem (100%-os keménymaghéjúság).

Összehasonlítva az egyes tételeket, a 9. ábrán is látszik, hogy a három legfiatalabb magtételünk elkülönül a három idősebb magtételtől a keménymaghéjúság tekintetében. Az 1992-nél régebben gyűjtött tételek hasonlóan alacsony arányban tartalmaznak dormans

magokat ($p=0,1839$, Khi-négyzet teszt), mint ahogy a három legfiatalabb tétel arányai sem különböznek egymástól ($p=0,1642$, Fisher-féle egzakt teszt), de a dormancia mértéke a két csoport között szignifikánsan eltér ($p < 0,001$, Khi-négyzet teszt).

A vízfelvétel és a magok kezdeti tömege közötti összefüggést vizsgálva az *Astragalus cicer*nél azt láthatjuk, hogy a vízfelvélt mutató magok tömege nem tért el a kemény maghéjú magok tömegétől. (10. ábra).

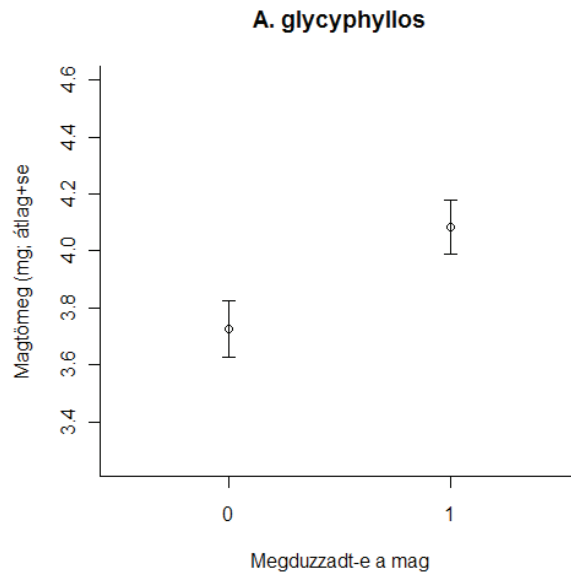
10. ábra *A. cicer* magok duzzadása és csírázása a magok korának függvényében



Az *Astragalus glycyphyllos* az 1897-es kezeletlen magokból csak 4db duzzadt meg, ami 85,19%-os keménymaghéjúságot feltételez. Az 1900-as évektől 1992-ig a keménymaghéjúság 25-50% közötti, míg 1992 után 87,1-94,83% közötti értékre növekszik. Ha összehasonlítjuk a tételeket, megállapítható, hogy a duzzadás szempontjából a legidősebb magtétel (1897-ből) a friss, 1992 utáni magtételhez hasonlóan kis arányban mutatott vízfelvélt ($p=1425$; Khi-négyzet teszt), illetve az 1900 és 1949 közötti tételek sem térnek el egymástól jelentősen ($p=1792$; Khi-négyzet teszt;), azonban a két csoport különbözik egymástól ($p < 0,05$; Khi-négyzet teszt;).

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 (11. ábra).

11. ábra Magtömegek és duzzadás összefüggése *A. glycyphyllos* esetében



0=nincs változás, 1=duzzadás

Az *Astragalus excapus* magjai kezeléstől függetlenül nem vettek fel vizet. A keménymaghéjúság nem volt mérhető.

A *Trifolium arvense* magjai közül az 1897-es tételnél a keménymaghéjúság aránya csak 13,33%, de ez az 1900-as magoknál már 33,33%-ra emelkedik. Az 1910-es magoknál tovább emelkedik 73%-ra, majd az ezt követő négy időpontban (1910-1929 között) a keménymaghéjúság értéke nem változik jelentősen. Az 1943-as tételnél már azonban 90% fölé emelkedik, és a friss tételek esetében sem csökken már 80% alá. A fentiek alapján a magtételek a magok korával összefüggően három, jól elkülönülő csoportot alkotnak. A legmagasabb keménymaghéjúsági arány az 1943-nál frissebb magok esetén látható ($p=0,16$). Az 1910 és 1929 között gyűjtött tételek keménymaghéjúsága szintén nem különbözik egymástól szignifikánsan ($p=0,98$), míg az 1900 előtti tételek egy újabb csoportot alkotnak ($p=0,06$). A három felsorolt csoport egymástól szignifikánsan különbözik ($p<0,022$) (9. ábra).

A *Reseda* fajok és a *Thlaspi* egyik tétele sem mutatott vízfelvételt.

4.2.3. Csírázás

Az *Astragalus contortuplicatus* magjait csak az előkísérlet során csíráztattuk (2. melléklet). A szkarifikált csoport, 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. Az 1918-as magok esetében egy csíra jelent meg (3,33%), míg a friss tételből 5 (15,15%). A forrázással kezelt friss magok

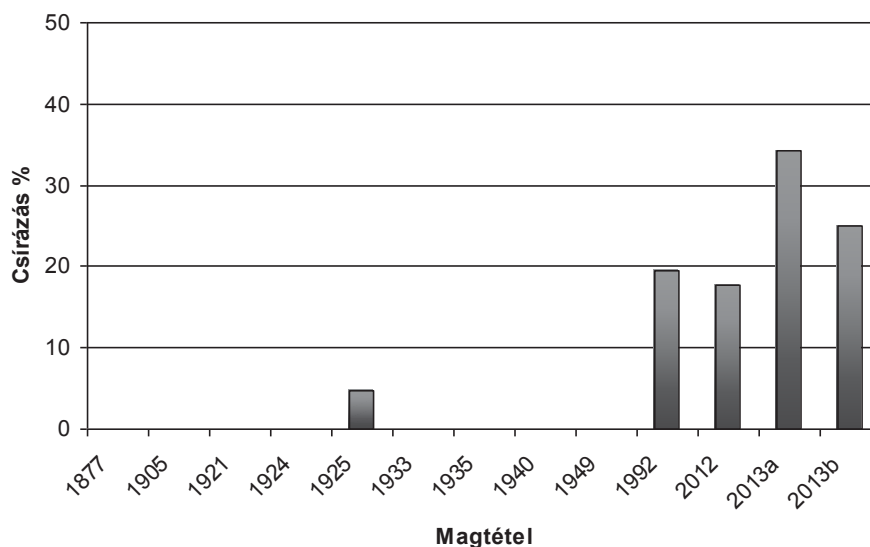
mindössze 7,1%-os csírázást mutattak, ami szignifikánsan alacsonyabb volt a szkarifikált magokénál ($p < 0,001$; Khi-négyzet teszt).

Összehasonlítva a csírázási eredményeket, azt tapasztaltuk, hogy a két régebbi magtétel esetén nincs szignifikáns eltérés a kontroll és a szkarifikált csoportok csírázása között ($p > 0,1$; Fisher-féle egzakt próba), de a 2011-es magtételnél a kezelés szignifikánsan megnövelte a csírázási arányt ($p < 0,001$; Khi-négyzet teszt).

Az *Astragalus cicer*nél összesen 503 mag került csíráztatásra. Kontroll csoportokat csak 6 tételnél tudtunk felállítani (1918, 1925, 1940, 1992, 2013SA, 2013SB), de ezek sem az előkísérlet, se a módosított elrendezés során nem csíráztak ki. A szkarifikált csoportok közül a régi tételekből csak az 1925-ös magok csíráztak. Az előkísérletben 3 mag csírázott ki, a módosítottban egy sem, így összességében 4,76%-os csírázást tapasztaltunk. Az elültetett példányok életképesnek bizonyultak.

Szkarifikálás hatására az összes 1992 utáni tétel képes volt csírázásra. Az 1992-es, Strasbourgban gyűjtött magok közül 7 (19,4%), a Leghia-ból származó friss (2012) magokból 3 (17,65%), míg a seregélyesi (2013) mintákból 12 (34,29%), illetve 9 (25%) csírázott ki (12. ábra).

12. ábra: *A. cicer* csírázása szkarifikáció hatására



Az *Astragalus glycyphyllos* esetében összesen 376 magot csíráztattunk. Sem az előkísérletben használt (1. melléklet), sem a módosított kísérlet során nem tapasztaltunk csírázást még a kezelés ellenére sem.

Az *Astragalus excapus* magjai sem csíráztak, kezeléstől függetlenül.

A *Trifolium arvense* magok közül csak a friss magok esetében tapasztaltunk csírázást. Míg a Bordeaux-ból származó, 2012-es tétel kezelés nélkül 10%-os, kezelés hatására 90%-os

csírázást mutatott, addig az ugyanabból az évből, de Muenster-ből származó tételnél ez 20% és 100% volt. A kezeléstől függetlenül a két tétel csírázása nem tért el egymástól, azonban a kezelés mindkét esetben szignifikánsan megnövelte a csírázást ($p < 0.001$; Fisher-féle egzakt teszt;)

A *Reseda lutea*, *Reseda phyteuma* és *Thlaspi arvense* magjai az előbb említett fajéhoz hasonlóan szintén nem csíráztak. A rezeda fajok esetében nem találtunk különbséget a sötét/világos kezelés, illetve a fertőtlenítés hatására sem.

A protokoll alapján szerettük 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 gyakori elszíneződés. Mivel a szakirodalomban nem áll rendelkezésre pontos festődési mintázat, saját eredményeink e része jelen vizsgálathoz még nem alkalmazhatóak.

5. Diskusszió

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

Először is fontos megjegyezni, hogy hasonló herbáriumi vizsgálatok esetén sokszor nem áll rendelkezésre olyan nagyságú mintaelemszám, melyet az általános magvizsgálati protokollok elvárnak, mivel általában egy-egy herbáriumi lapon csak egy-két természetes egyed és sokszor kevés mag található, azonban törekedni kell egy minimum 30 magból álló mintára, és fokozottan figyelni kell, hogy a legjobb csíráztatási módszert alkalmazzuk, így maximalizálva a csíráztatás hatékonyságát. Ezzel együtt is tisztában kell lenni a módszer korlátaival, és hogy a kis mintaelemszám mellett mindez csak arra lehet alkalmas, hogy a potenciális élettartamot becsüljük, komolyabb összehasonlításokra alkalmatlan.

A magok leszámolásakor történő átvizsgálása és az egyedi lemérés egyrészt segíthet a láthatóan sérült, illetve üres magok eltávolításában, ami a hosszú távú tárolhatóságot teszi hatékonyá (BARTHODEISZKY, 1980), másrészt adatot szolgáltat ahhoz, hogy miként befolyásolja a kezdeti magtömeg az élettartamot (CSONTOS, 2001). A 8. ábrán is látszik, hogy a vélhetően üres vagy halott magok elkülöníthetőek lehetnek már egy ilyen vizsgálattal is.

Az élettartam tesztelésével kapcsolatban fontos változtatásunk a biológiai (csíráztatásos) és kémiai (TTC-tesztes) módszerek kombinálása, mely segítségével ellensúlyozható lehet a két módszer becslési hibája, és pontosabb adatot kapunk az életképességről.

A csíráztatásnál a Petri-csésze használata általánosan elfogadott, de a magok közti átfertőződés esélye igen nagy. A teljesen lezárt, kilógó itatóspapírral ellátott Petri-csészék használata javasolható így, ugyanakkor a bevitt magokat is fertőtleníteni kell a fajnak megfelelő fertőtlenítőszer optimális ideig történő használatával. Az általunk használt H₂O₂ vagy nem bizonyult megfelelőnek, vagy a sterilizálási idő nem volt optimális, így a protokoll ezen lépése még finomítást igényel.

Az ELISA plate-ben történő csíráztatás több előnnyel is jár a Petri-csészés módszerrel szemben. Az egyik, hogy minden mag egyedi kódszámot kap, így minden további vizsgálatban a beazonosítás lehetővé válik. Ez megint fontos lehet a magok egyes paramétereinek és csírázókéességük közti összefüggések vizsgálatakor. Másrészt, mivel minden mag egy különálló rekeszben van, ezért a Petri-csészés csíráztatással szemben penészedés esetén a

gombahifa nem jut át a szomszédos cellákba, így könnyebben izolálható a fertőzés. Hátrány azonban, hogy a vízutánpótlás nem olyan könnyen megoldható, mint a Petri-csészék esetén, komoly odafigyelést igényel, hogy a magok ne száradjanak ki, vagy ne álljanak a vízben sokáig. Ezzel együtt is, úgy gondoljuk, ez a csíráztató-közeg előnyösebb a kutatás céljait tekintve, mint a Petri-csészében történő csíráztatás.

A protokoll egyik fontos eleme az első lépésként kontrollként való csíráztatás és csak ezután történő szkarifikálás alkalmazása, így ugyanis megállapítható a keménymaghéjúság mértéke. Bár az életképesség-vizsgálathoz ez elsődleges lépés, friss magok esetében nincs jelentősége.

A *Fabaceae* családban általános a fizikai dormancia (LEINO et al., 2010). Mivel LONG és munkatársai (2012), valamint PATANE & GRESTA (2006) kísérletei is azt bizonyítják, hogy a szkarifikált, friss *Astragalus arpilobus* és *Astragalus hamosus* magvak nagyobb csírázási százalékot mutattak, mint a kezeletlenek, így az általunk vizsgált *Astragalus* fajoknál is hasonlót vártunk. A szakirodalom többféle módszert javasol a fizikai dormancia megtörésére (SUSZKA, et al., 2008; ZELENCHUK, 1961). Letesztelve mind a szkarifikálást, mind a forrázást, azt kaptuk, hogy előbbi hatékonysága jelentősen nagyobb. Lehetséges, hogy a forrázás ideje nem volt megfelelő, azonban a szkarifikálás jól alkalmazható, megbízható módszer, így kizárólag ezt javasoljuk a keménymaghéjúság megtörésére. A különböző időpontokból származó megtételek esetében különböző mértékű maghéjkeménységet feltételeztünk. A keménymaghéjúság és az életképesség közös meghatározásához leginkább a fent említett lépcsőzetes kezelési módszertant tartjuk megfelelőnek, vagyis, hogy minden tételt először kizárólag kezelés nélkül csíráztatunk, majd csak a változást nem mutató magokat szkarifikáljuk. Habár elképzelhető, hogy a magok kontrollként történő csíráztatása majd szkarifikáció előtti kiszáritása olyan változásokat indukál a magban, mely 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 az adott fajokra érvényes 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.

A TTC-oldat élettani hatásai a vizsgált fajokra nem ismertek. A kutatás során egy alkalommal a megduzzadt, ki nem csírázott magok egy része fejlődésnek indult a TTC-oldatba történő beáztatás után. Ebben az esetben kiderült, hogy az adott magok életképesek

voltak és a maghéjkeménységük is megszűnt, arra viszont nem kaptunk választ, hogy miért nem indultak fejlődésnek a csíráztatás során. Egy másik, gyakorlati hátrány, hogy az ELISA-plate-ben történő festés során elszíneződés lép fel, és az oldat maradéka nehezen távolítható el, ezáltal a lemez használhatatlanná válik.

Az *Astragalus contortuplicatus* esetében kimutattuk, hogy a magok akár 99 évvel a magszórás után is csírázóképesek lehetnek. A csírázási arányra valószínűleg hatással van a magok kora, ugyanis a vizsgálatunkban a kontroll csoportoknál a kor előrehaladtával folyamatosan csökkent a csírázási százalék.

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). Az *A. contortuplicatus* folyó menti élőhelyein általában elöntés utáni, friss iszapfelszíneken szokott megjelenni, így 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 szabad, hogy kicsírázzanak. Kutatásunk látszólag megerősíti, hogy a hosszú tárolás során feloldódhat a keménymaghéjúság (BASKIN & BASKIN, 1998), az *A. contortuplicatus* esetén 90 év után már jelentősen lecsökken a keménymaghéjú magok aránya. Azonban kevés minta áll rendelkezésre, így nem állítható biztosra, hogy ez a mechanizmus áll a különbségek mögött.

Mivel az előkísérlet során nem volt lehetőség egyedi nyomonkövetésre, a csírázás/duzzadás magtömeggel való összefüggését nem vizsgáltuk.

Az *Astragalus cicer* magjainál nem találtunk trendszerű változást a tömegben a magok korának függvényében, ezt az egészséges és halott/üres magok elkülönülése, valamint az alacsony mintaelemszám is okozhatja. A keménymaghéjúság tekintetében mind az 1918-as, mind az 1940-es magok esetében alacsony keménymaghéjúságot tapasztaltunk, de az 1925-ös tételnél a vízfelvétel nem volt számottevő. Ez jelentheti a teljesen életképtelen magok nagyobb arányát és amennyiben ez csapadék szempontjából szárazabb év volt, úgy előfordulhat az életképtelen magok arányának növekedése (CSERESNYÉS-BÓZSING 2010). A friss tételekben magas volt a keménymaghéjúság aránya, melyet más, korábbi kutatások is igazoltak (ACHARYA et al. 1993). Ugyanakkor a keménymaghéjúság mértékének természetes csökkenését korábban szintén bizonyították (CARLETON et al. 1971).

Vizsgálatunk során az előkísérletben az 1925-ös magtétel kicsírázott, de utána csak 1992 után származó magoknál tapasztaltuk újra az embriók fejlődését, akkor is csak a

szkarifikált csoportokban. Emellett az is látszik, hogy a csírázási képesség 22 év után nem mutat erős változást, de ennél hosszabb tárolás után már jelentősen romlik. Más kutatásokban is az *A. cicer* friss, szkarifikált és nem szkarifikált magjai egyaránt 95% körüli csírázást mutatnak (RBG), saját eredményeink ennél alacsonyabb csírázási erélyt mutattak.

Az életképesség tekintetében azt mondhatjuk, hogy a faj magjai potenciálisan akár 90 évig is életképesek maradhatnak, bár a mintaelemszám ebben az esetben is alacsony volt. Más kutatások is (CSONTOS et al. 2006) alátámasztják, hogy a faj hosszabb életképességgel rendelkezik, így vizsgálatukban a 36 éves magok szkarifikálást követően még 68%-ban kicsíráztak. Ezt figyelembe véve a 90 éves tárolás utáni néhány százalékos csírázás egyfajta lineáris trendet mutat.

A csírázásbeli különbségeket okozhatta a magok tömegbeli eltérése is. Jobb körülmények között nagyobb magvak képződnek (GÁSPÁR, 1980), és a vizsgálatok alapján úgy tűnik, hogy a nagyobb tömegű magok jobban is csíráznak (9. ábra). A klimatikus tényezők pedig szintén meghatározzák a faj csírázását és dormanciáját. Szárazabb élőhelyen kétszer nagyobb az életképtelen magok aránya, mint egy kedvező üde élőhelyen. Ugyanakkor csapadékosabb évben az életképtelen magok aránya nem változott, de a dormans magok aránya erősen lecsökkent (CSERESNYÉS-BÓZSING 2010).

Az *Astragalus glycyphyllos* magtömegei az *A. cicer*-hez hasonlóan nem követnek trendet az idő függvényében, melynek oka szintén lehet az alacsony mintaelemszám, illetve az életképtelen magok aránya lehet.

A vízfelvétel igen alacsony volt (9. ábra) a nagyon régi, illetve a friss tételeknél. Előbbi esetében valószínűsíthető a magas keménymaghéjúság, a régi tételek esetében viszont ez inkább magyarázható a teljesen életképtelen, léha magok magasabb arányával.

Egyik kísérletben sem sikerült csírázásra bírni a magokat, ezért feltételezzük, hogy a faj életképessége meglehetősen alacsony. A szakirodalom ugyanakkor igen ellentmondásos a fajjal kapcsolatban. A friss magok esetében a csírázóképeség 90-100% lehet (RGB), de 21 év után ez még mindig elérheti a 75-85%-ot (GODEFROID et al. 2010). Más szerzők szerint viszont közel 30 éves tárolás után már csak 25% (HARRINGTON, 1972) vagy annál alacsonyabb (CSONTOS et al. 2006) lesz a csírázás. Mindezek alapján a faj magjai potenciálisan kicsírázhattak volna, de mint fentebb láttuk, amennyiben az érési körülmények nem voltak megfelelőek, ez okozhatja az életképtelen magok magasabb arányát.

A *Trifolium arvense* esetében a keményhéjúság mértékének csökkenése az eredmények alapján kimutatható (9. ábra). Ezt magyarázhatja a faj általános elterjedése és gyom jellege, azaz nincs érdekében hosszú távon életképes magokat termelni. A csírázás

tekintetében mind a szkarifikált, mind a kontrollcsoportok esetében csak a friss magok csíráztak, mely egybevág az irodalommal (RGB), de mivel a második legfiatalabb magtétel is idősebb volt 70 évnél, így elképzelhető, hogy ennyi idő alatt a magok elvesztették csírázókéességüket, bár egyes kutatások alapján akár 20%-os csírázás is elérhető (BEQUEREL, 1934) ilyen korú tételek esetén.

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). Ugyanakkor ezt nem sikerült bizonyítanunk, mert a minták nem vettek fel vizet, feltételezhetően azért, mert a legfiatalabb mag is 60 éves volt, és a *Trifoliumhoz* hasonlóan már elvesztette csírákéességét.. Ugyanakkor 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 *Reseda* fajok és a *Thlaspi arvense* esetében sem vízfelvételt, sem csírázást nem tapasztaltunk a kezeléstől függetlenül. Ugyanakkor a *Reseda lutea* esetében bizonyított, hogy a faj magjai érésük után igen mély dormans állapotba kerülnek (EBRAHIMI et al. 2010). Mindez azonban biztosan egy eltérő mechanizmus, mint ami a *Fabaceae* családban jelen van. A fajok életkéességéről nem találtunk adatokat a szakirodalomban.

A kutatás során az általunk feltett kérdésekre az alábbi válaszokat kaptuk:

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

Bár két faj, az *A. contoruplicatus* és *A. cicer* esetén több mint 90 évvel a begyűjtés után életképesek maradhatnak a magok, más esetekben (*Reseda* és *Thlaspi* fajok) nem tapasztaltuk a szakirodalomban (RGB) jelzett hosszú eltarthatóságot.

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

Több faj esetén sikerült kimutatni a keményhéjúság csökkenését. Tapasztalataink alapján a maghéj feloldódhat (BASKIN & BASKIN, 1998), azonban ez és a dormancia megszűnése nem jelent feltétlen csírákéességet. Valószínűsíthető, hogy egyéb tényezők (eltérő életmenet-stratégia, különböző tárolási körülmények) is befolyásolhatják a magok életkéességét.

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

Az *A. cicer* esetében egyértelműen a nagyobb magok jobban csíráznak, azonban a többi fajnál nem találtunk hasonló összefüggést. A nagyobb magok jobb csíráképességének egyik lehetséges oka, hogy jobb évben a növény több tápanyagot tud a magokba juttatni.

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

Kutatásunk alapján hasonló vizsgálatokhoz a herbáriumi anyag felhasználható, de figyelembe kell venni a módszer korábban ismertetett korlátait. A herbáriumok használata során a benne tárolt magok korának nagy variabilitása és a gyűjteményi diverzitás szélesspektrumú vizsgálatokat tesz lehetővé. Azonban a gyűjteményekben jellemzően kevés természetes példány található, az azokban tárolt magok között pedig ennél is kisebb arányban vannak felhasználható minőségűek. Emellett az eltérő tárolási körülmények negatívan befolyásolhatják a kísérlet kimenetelét, az alacsony genetikai diverzitás pedig a későbbiekben okozhat gondot.

6. Összefoglaló

Napjainkra a fajok kihalási rátája jelentősen megnőtt. A fennmaradt fajok és élőhelyeik megőrzése még fontosabbá vált, melyhez szükséges az adott fajok természetrajzának és ökológiájának ismerete. Egy növénytársulás regenerációs képessége az adott terület magbankján alapul, melynek ismeretével lehetővé válik a fajsztű védelem és a fajmegőrzés, illetve segítségével könnyebben becsülhető lenne egy-egy növénytársulás regenerációs képessége és környezeti változásokra adott válasza. A magok csírázóképségének (viability) és élettartamának (longevity) vizsgálatára in situ és ex situ módszerek egyaránt alkalmazhatóak, utóbbihoz hosszú távú adatsort nyújthat a herbáriumokban tárolt maganyag.

Kutatásunk fő kérdései, hogy a hazai pillangósvirágú fajok magjai mennyi ideig őrzik meg potenciális csírázóképségüket, hogyan függ ez a magok tömegétől, hosszú távon milyen mértékben veszítik el a családra jellemző keménymaghéjúságot, illetve milyen mértékben használhatóak herbáriumi gyűjtések a konzervációbiológiai kutatásokban. Emellett célunk 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 a *Fabaceae*, a *Resedaceae*, illetve a *Brassicaceae* családba tartozó fajok herbáriumi és 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 a halott, azonnali csírázásra képes és a potenciálisan életképes magok, valamint megállapítható a keménymaghéjúság aránya. Kimutattuk több faj esetében, hogy a keménymaghéjúság feloldódhat, de ez nem jelenti feltétlen a mag életképessé válását. Ugyanakkor a mag tömege befolyásolhatja a vízfelvételt és a csírázást. Vizsgálataink alapján a herbáriumi magok alkalmasak életképesség vizsgálatokra is a korlátozó tényezők figyelembe vételével, ugyanakkor még számos módszertani kérdés további finomítást igényel. Eredményeink jól használhatók a konzervációbiológiában magbankok létesítéséhez, fajok visszatelepítése esetében, vagy élőhelyek komplex regenerálásában.

7. Summary

According to the human impact, the extinction rate of the species was increased. 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, and with the knowledge of the germination biology of frequent and natural species the regeneration capacity of a habitat can be more predictable such as their response to environmental effects. The germination of seed with high longevity can help the conservation of the species. 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 species of the *Fabaceae*, from *Resedaceae* and *Brassicaceae* families. Seeds were collected from herbarium sheets of hungarian universities and fresh samples. Based on the germination tests the first version of the germination protocol was designed which combine biological and chemical methods. With our protocol dead, germinating, and 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*), but 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.

Irodalom

- ACHARYA, S.N., KOKKO, E. G. FRASER, J. (1993): Storage duration and freeze-thaw effects on germination and emergence of cicer milkvetch (*Astragalus cicer*) seeds. *J. Seed Technol.* (17): pp. 1-13.
- AKHALKATSI, M., LÖSCH, R. (2005): Water limitation effect on seed development and germination in *Trigonella coerulea* (Fabaceae). *Flora* (200): pp. 493–501.
- ALLEN, P. S., BENECH-ARNOLD, R. L., BATLLA, D., BRADFORD K. J. (2007): Modeling of seed dormancy. In: Bradford, K., & H. Nonogaki. (eds.) 2007: Seed Development, Dormancy and Germination. Blackwell Publishing. p. 73-112.
- BARTHODEISZKY, A. (1980): A magvak tárolása. In: SZABÓ, L. GY. (ed) 1980: A magbiológia alapjai. Budapest, Akadémiai kiadó. pp. 153-158.
- BASKIN, C. C., BASKIN, J. M. (1998): Seeds – Ecology, Biogeography, and Evolution of dormancy and Germination. San Diego, Academic Press. p. 666.
- BASKIN, C. C., BASKIN, J. M. (2004): A classification system for seed dormancy. *Seed science research* 14(1): pp. 1-16.
- BECKER, T. (2010): Explaining Rarity of the Dry Grassland Perennial *Astragalus exscapus*. *Folia Geobot.* (45) pp. 303-321.
- BECQUEREL, P. (1934): La longevite des graines macrobiotiques. *Comptes Rendus Academiques des Sciences* (199): pp. 1662-1664.
- BITTERCOURT, S. R. M., VIEIRA, R. D. (1966): Use of reduced concentrations of tetrazolium solutions for the evaluation of the viability of peanut seed lots. *Seed Sci. and Technol.* (25): pp. 75-82.
- BOJŇANSKY, V., FARGAŠOVÁ, A. (2007): Atlas of Seeds and Fruits of Central and East-European flora. Dordrecht, Springer, pp. 1046.
- CARLETON, A.E., AUSTIN, R.D., STROH, J.R., WIESNER, L.E. and SCHEETZ, J.G. (1971): Cicer milkvetch (*Astragalus cicer* L.) seed germination, scarification and field emergence studies. *Montana Agric. Exp. Sta. Bull.* (655): pp. 3-21.
- COCHRANE, J. A., CRAWFORD, A. D., MONKS, L. T. (2007): The significance of ex situ seed conservation to reintroduction of threatened plants. *Australian Journal of Botany* 55(3): pp. 356–361.
- CSERESNYÉS-BÓZSING, E. (2010): A hólyagos csüdfü (*Astragalus cicer* L.) magtermelésének és csírázóképeségének vizsgálata. *Botanikai Közlemény.* 97(1-2.): pp. 49–57.

- CSONTOS, P. (2001): A természetes magbank kutatásának módszerei. *Synbiologica Hungarica* (4): pp. 155.
- CSONTOS, P., BÓZSING, E., KÓSA, G., ZSIGMOND, V. (2006): Csírázóképeség vizsgálata természetes flóránk fajainak hagyományos gyűjteményekben őrzött magvain. *Bot. Közlem.* 93(1-2.): pp. 93-98.
- DEGEN, Á. (1923): A keményhéjú magvak jelentősége a vetőmagban. In: SZABÓ L. GY. (ed): A magbiológia alapjai. Budapest, Akadémiai kiadó. p. 391.
- DOGAN, Y., BASLAR, S., MERT, H. H. (2002): A study on *Reseda lutea* L. distributed naturally in West Anatolia, Turkey. *Acta Bot. Croat.* 61(1): pp. 35-43.
- EBRAHIMI, E., ESLAMI, S. V., SAEEDI, M. (2010): Study on effective factors in breaking seed dormancy of cutleaf mignonette (*Reseda lutea*). *Proceedings of 3rd Iranian Weed Science Congress, Volume 1: Weedbiology and ecophysiology*, Balbosar, Iran. Pp. 49-51.
- EBRAHIMI, E., ESLAMI, S. V. (2013): Breaking dormancy and effect of some environmental factors on germination of cutleaf mignonette (*Reseda lutea* L.) seeds. *Journal of plant protection (agricultural science and technology)* (27): pp. 177-184.
- ELLIS, R. H., HONG, T. D., ROBERT, E. H., (1985): Handbook of seed technology for genebanks. Rome: International Board for Plant Genetic Resources, p. 667.
- GALGÓCZI, J. (1964): Keményhéjúsági vizsgálatok pillangósvirágú növények magvaival. *Növénytermelés* (13): pp. 347-360.
- GÁSPÁR, S. (1980): A magvak életképessége és meghatározásának módszerei. In: SZABÓ, L. GY. (ed.) 1980: A magbiológia alapjai. Budapest. Akadémiai Kiadó. p. 391.
- GODEFROID, S., VAN DE VYVER, A., VANDERBORGHT, T. (2010): Germination capacity and viability of threatened species collections in seed banks. *Biodivers Conserv.* (19): pp. 1365–1383.
- GODEFROID, S., VAN DE VYVER, A., STOFFELEN, P., ROBBRECHT, E., VANDERBORGHT, T. (2011): Testing the viability of seeds from old herbarium specimens for conservation purposes. *Taxon* (60): pp. 565-569.
- GRABE, F. (1970): Tetrazolium testin handbook for agricultural seeds. Handbook on seed testing. *Association of Official Seed Analysts*. p. 62..
- HARRINGTON, J. F. (1972): Seed storage and longevity. In: KOZLOWSKI, T. T. (ed.) *Seed Biology* vol 3. New York & London. Academic Press pp. 145-245.
- HILHORST H. W. M., FINCH-SAVAGE, W. E., CADMAN CS. C., TOOROP P. E., LYNN J. R. (2007): Seed dormancy release in *Arabidopsis Cvi* by dry after-ripening, low

- temperature, nitrate and light shows common quantitative patterns of gene expression directed by environmentally specific sensing. *Plant J.* (51): pp. 60–78.
- JAYASURIJA, K. M. G. G., WIJETUNGA, A. S. T. B., BASKIN, J. M., BASKIN, C. C. (2013): Seed dormancy and storage behaviour in tropical Fabaceae: a study of 100 species from Sri Lanka. *Seed Science Research* (23): pp. 257-269.
- KIRÁLY, G. (ed.) (2009): Új magyar fűvészkönyv. Magyarország hajtásos növényei. Jósvafő: Aggteleki Nemzeti Park Igazgatóság. p. 616.
- LEINO, M. W., EDQUIST, J. (2010): Germination of 151-year old *Acacia* spp. seeds. *Genet Resour Crop Evol.* (57): pp. 741–746.
- LESKU B., MOLNÁR A. (2007): A Hortobágy növényritkaságai. *Daru füzetek*. Debrecen: Hortobágyi Nemzeti Park Igazgatóság. p. 120.
- LONG, Y., TAN, D.Y., BASKIN, C. C., BASKIN, J. M. (2012): Seed dormancy and germination characteristics of *Astragalus arpilobus* (Fabaceae, subfamily Papilionoideae), a central Asian desert annual ephemeral. *South African Journal of Botany* (83): pp. 68–77.
- MATUS, G., VERHAGEN, R., BEKKER, R. M., GROOTJANS, A. P. (2003): Restoration of the *Cirsio dissecti*-*Molinietum* in the Netherlands: can we rely on soil seed banks? *Applied Vegetation Science* (6): pp. 73–84.
- MEA (Millenium Ecosystem Assessment) (2005): Ecosystems and Human Well-being: General Synthesis. Island Press and World Resources Institute, Washington DC.
- MILBERG, P. (1994): Germination of up to 129-year old, dry-stored seeds of *Geranium bohemicum* (Geraniaceae). *Nordic Journal of Botany* (14): pp. 27–29.
- MILBERG, P. (1997): Weed seed germination after short-term light exposure. germination rate, photon fluence response and interaction with nitrate. *Weed Research* (37): pp. 154-167.
- MURDOCH, A. J., ELLIS R. H. (2000): Dormancy, Viability and Longevity. In: FENNER, M. (ed.) (2000): Seeds. The ecology of regeneration in plant communities. CABI Publishing, Wallingford. p. 410.
- NAGEL, M., BÖRNER, A. (2010): The longevity of crop seeds stored under ambient conditions. *Seed Science Research* 20(1): pp. 1-12.
- NOVÁK, J., PRACH, K. (2010): Artificial sowing of endangered dry grassland species into disused basalt quarries. *Flora* 205(3): pp. 179-183.
- PATANE, C., GRESTA, F. (2006): Germination of *Astragalus hamosus* and *Medicago orbicularis* as affected by seed-coat dormancy breaking techniques. *Journal of Arid Environments* (67): pp. 165–173.

- PÉNZESNÉ, K. E., ORBÁN, S., PÓCS, T., SASS-GYARMATI, A. (2013): Az Eszterházy Károly Főiskola megújult herbáriuma (EGR). *Acta Academiae Agriensis Sectio Biologiae* (40): pp. 6-8.
- RAJJOU, L., DEBEAUJON, I., (2008): Seed longevity: Survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. *C. R. Biologies* (331): pp. 796–805.
- RAO, N. K., HANSON, J., DULLOO, M. E., GHOSH, K., NOVELL, D., LARINDE, M. (2006): Manual of seed handling in genebanks. Handbooks for Genebanks No. 8. Rome. Bioversity International. p. 147.
- RBG Royal Botanical Garden Kew. URL: <http://data.kew.org/sid/storage.html> (Letöltés időpontja: 2014.10.01.)
- R DEVELOPEMENT CORE TEAM (2012): A Language and Environment for Statistical Computing. – R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <http://www.R-project.org/> (Letöltés időpontja: 2014. 09. 01.)
- RICKETTS, T.A., DINERSTEIN, E., BOUCHER, T., BROOKS, T.M., BUTCHART, S.H.M., HOFFMANN, M., LAMOREUX, J.F., MORRISON, J., PARR, M., PILGRIM, J.D., RODRIGUES, A.S.L., SECHREST, W., WALLACE, G.E., BERLIN, K., BIELBY, J., BURGESS, N.D., CHURCH, D.R., COX, N., KNOX, D., LOUCKS, C., LUCK, G.W., MASTER, L.L., MOORE, R., NAIDOO, R., RIDGELY, R., SCHATZ, G.E., SHIRE, G., STRAND, H., WETTENGELA, W. and WIKRAMANAYAKE, E. (2005): Pinpointing and preventing imminent extinctions. *PNAS*, (102): pp. 18497-18501.
- ROBERTS, H. A. (1981): Seed bank in soils. *Adv. Appl. Biol.* (6): pp. 1-55.
- SAINI, H. S., BASSI, P. K., GOUDEY, J.S., SPENCER, M.S. (1987): Breakage of Seed Dormancy of Field Pennycress (*Thlaspi arvense*) by Growth Regulators, Nitrate, and Environmental Factors. *Weed Science* (35): pp. 802-806.
- SCHWIENBACHER, E., MARCANTE, S., ERSCHBAMER, B. (2010): Alpine species seed longevity in the soil relation to seed size and shape – A 5-year burial experiment in the Center Alps. *Flora* (205): pp. 19-25.
- SUSZKA, B., MULLER, C., BONNET-MASIMBERT, M. (2008): Az erdei lombos fák magjai a begyűjtéstől a vetésig. Budapest: Mezőgazda Kiadó. p. 291.
- SZABÓ, L. GY. (1980): A magbiológia alapjai. Budapest. Akadémiai Kiadó. p. 391.
- TAKÁCS, A., LACZKÓ, L. MOLNÁR, V. A. (2013): A herbáriumok 'új típusú' felhasználásai. *Botanikai Közlemények* 100(1–2): pp. 217–238.

- TAKÁCS, A., NAGY, T., FEKETE, R., LOVAS-KISS, Á., LJUBKA, T., LÖKI, V., LISZTES-SZABÓ, ZS., MOLNÁR, V.A. (2014): A Debreceni Egyetem Herbárium (DE) I.: A „Soó Rezső Herbárium”. *Kitaibelia* 19(1): pp. 142-155.
- TATÁR, S. (2009): Hat lápi növényfaj magjainak túlélőképessége. In: *VI. Kárpát-medencei Biológiai Szimpózium előadaskötete* (szerk.: Kiss, Gyenis, Penksza) 2009. Magyar Biológiai Társaság, Budapest, pp. 141-147.
- THE PLANT LIST (2013). Version 1.1. URL: <http://www.theplantlist.org/> (Letöltés időpontja: 2014.10.01.)
- THUILLER, W. (2007): Biodiversity: climate change and the ecologist. *Nature* (448): pp. 550-552.
- VALKÓ, O., TÖRÖK, P., TÓTHMERÉSZ, B., MATUS, G. (2010): Restoration Potential in Seed Banks of Acidic Fen and Dry Mesophilous Meadows: Can Restoration Be Based on Local Seed Banks? *Restoration Ecology* 19(101): pp. 9-15.
- VAN DER VALK, A. G., BRENHOLM, T. L., GORDON, E. (1999): The restoration of sedge meadows: seed viability, seed germination requirements, and seedling growth of *Carex* species. *Wetlands* (19): 756-764.
- VAN TREUREN, R., DE GROOT, E. C., VAN HINTUM, TH. J. L. (2012): Preservation of seed viability during 25 years of storage under standard genebank conditions. *Genetic Resources and Crop Evolution* 60(4): pp. 1407-1421.
- ZELENCHUK, T. K., (1961): The content of viable seed in meadow peaty soils of the L'vov region. *Byull. Mosk. Obshch. Ispyt. Prir.*, 66(3) p. 77-92.

Köszönetnyilvánítás

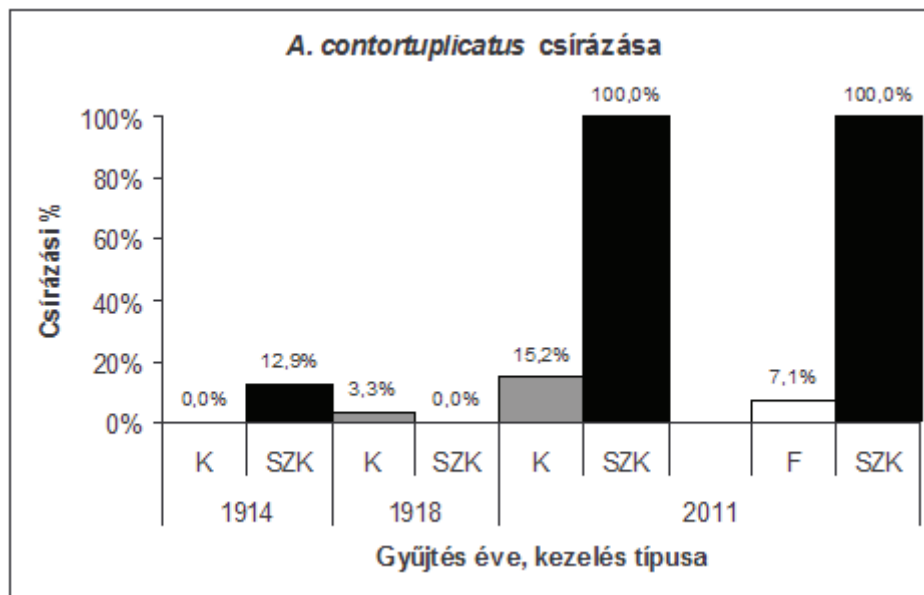
Első sorban köszönettel tartozom Endrédi Anettnek és Dr. Cserhalmi Dánielnek, a legjobb témavezetőknek. Köszönöm, hogy ha kellett, éjjél is fennmaradtak segíteni és bármiről is volt szó, mindig meghallgattak. A segítségük és útmutatásuk nélkül ez a dolgozat nem születhetett volna meg. Mellettük megköszönöm szüleimnek, hogy a legnehezebb helyzetekben is mellettem álltak. Köszönöm továbbá a segítséget a SZIE ÁOTK Növénytan tanszék munkatársainak, valamint az Ökológia tanszéknek, külön kiemelten Dr. Hornung Erzsébetnek, hogy lehetővé tette számomra a laborhasználatot, és Hlavajiné Szabó Margitnak, aki mindig segítségemre volt. Hálával tartozom továbbá Dr. Kis Jánosnak, aki javaslataival segített jobb és pontosabb munkát végezni. Végül, de nem utolsó sorban köszönöm Maticsek Orsolyának, Godányi Eszternek és Rigler Eszternek a sok vidám percet, melyek a nehezebb pillanatokban mindig segítettek.

Mellékletek

1. melléklet: Az előkísérlet során csíráztatott magok adatai (SZK= szkarifikált, F= forrázott)

Faj	Gyűjtési idő, hely	Kód	Kezelés	Kezelt magok (db)	Kezeletlen magok (db)
<i>A. contortuplicatus</i>	1914/1915, Óbecse	14O	SZK	31	31
<i>A. contortuplicatus</i>	1918, Törökbecse	18T	SZK	30	30
<i>A. contortuplicatus</i>	2011, Tiszaug	011T	F, SZK	14, 33	33
<i>A. cicer</i>	1918, Budaörs	18B	–	–	23
<i>A. cicer</i>	1925, Szentendre	25SZ	SZK	27	27
<i>A. cicer</i>	1940, Sárfenyősziget	40S	SZK	25	25
<i>A. glycyphyllos</i>	1908, Cserna-völgy	08CS	SZK	24	24
<i>A. glycyphyllos</i>	1909, Dobogókő	09D	–	–	30
<i>A. glycyphyllos</i>	1915, Csikóvár-hegy	15CS	–	–	30
<i>T. arvense</i>	1897, Ismeretlen	97I	SZK	30	30
<i>T. arvense</i>	1900, Szabei	00SZ	SZK	30	30
<i>T. arvense</i>	1910, Kovácspatak	10K	SZK	30	30
<i>T. arvense</i>	1913, Balatonalmádi	13B	SZK	30	30
<i>T. arvense</i>	1922, Hatvan	22H	SZK	30	30
<i>T. arvense</i>	1929, Dolaháza	29D	SZK	30	30
<i>T. arvense</i>	1943, Kenderes	43K	SZK	30	30
<i>T. arvense</i>	2012, Bordeaux	2012B	SZK	30	30
<i>T. arvense</i>	2012, Muenster	2012M	SZK	30	30

2. melléklet: *A. contortuplicatus* különböző évekből származó magjainak csírázási arányai az előkísérletben, a kezelés típusától függően



K= kontroll, SZK= szkarifikált, F= forrázott