

HAZAI *ORCHIS MILITARIS* ÉLŐHELYEK ORCHIDEA-MIKORRHIZA GOMBÁINAK VIZSGÁLATA

OUANPHANIVANH NOÉMI, ILLYÉS ZOLTÁN, RUDNÓY SZABOLCS, BRATEK ZOLTÁN

Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar, Biológiai Intézet,
Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszék
1117 Budapest, Pázmány Péter sétány 1/C., e-mail: ouanoe@freemail.hu**Kulcsszavak:** orchidea mikorrhiza, specifikáció, *Epulorrhiza*, protokorm

Összefoglalás: Munkánk során az *Orchis militaris* szimbionta gombáinak azonosítása mellett a vizsgált élőhelyek szimbionta gomba közösségeinek összetételét is tanulmányoztuk. A szimbiontákat mikorrhizált gyökérszakaszokból és *in situ* csíráztatott protokormokból a sejtmagi ITS-régió szekvenciája alapján azonosítva azt tapasztaltuk, hogy az *Orchis militaris* a szimbionta gombák négy csoportjával is mikorrhizálódik (*Epulorrhiza* I. és II., *Ceratobasidium* és *Sebacina*), így feltételezzük, hogy a sokféle szimbionta gombával való kompatibilitás az egyik döntő tényező a vizsgált orchidea faj széles elterjedtségében.

A vizsgált élőhelyek szimbionta gomba közösségeinek elemzése alapján kezd körvonalazódni, hogy a lápréteken a legnagyobb a szimbionta gombák diverzitása. Stresszhatásra (például bolygatás, szárazság) a szimbionta közösségek egyre szegényebbé válnak; a vizsgált száraz illetve másodlagos élőhelyekről szinte kizárólag *Epulorrhiza* II. szimbionta gombákat tudunk kimutatni, melyek közül több típus először került elő orchideákról.

Az *Orchis militaris* csíranövényeinek és kifejtett egyedeinek szimbiontáit összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy a vizsgált faj egyedfejlődésének kezdeti szakaszában csak *Epulorrhiza* II. szimbionta gombákkal mikorrhizálódik, míg kifejtett egyedek esetében a lehetséges szimbionták sora bővül.

Bevezetés

Az *Orchis militaris* (vitézkosbor) az Orchidaceae család (kosborfélék) egyik hazai képviselője; eurázsiai-euroszibériai elterjedésű faj, mely hazánkban is gyakori. Igen változatos azon élőhelyek sora, ahol megtelepedhet (MOLNÁR V. 1999): a sokféle elsődleges társulás mellett bolygatott helyeken, így felhagyott bányákban, szőlőkben, kubikgödörökben, útbevágásokban, és vasúti töltések oldalában is megjelenhet, akár többzetes egyed számmal (BARINA 2000).

Az *Orchis militaris*-nak a többi orchideához hasonlóan igen apró (0,3–14 µg) magjai vannak (BRATEK et al. 2001), melyek szinte egyáltalán nem tartalmaznak raktározott tápanyagot, ezért mikorrhiza kapcsolat nélkül nem tud kifejlődni a magból a csíranövény. Feltételezzük, hogy a szimbionta gombák az orchideák életciklusa során folyamatosan cserélődnek; a különböző korú orchideaegyedek számára más és más gombák lehetnek az ideális szimbionta partnerek (RASMUSSEN 2002).

Az orchidea szimbionták többsége morfológiai alapon a *Rhizoctonia* forma-genusba tartozik. Léteznek anamorf (ivartalan) és teleomorf (ivaros) alakjaik is, melyek többségét sikerült egymásnak megfeleltetni; a legfontosabb anamorf-teleomorf nemzetségpárok a következők (BRATEK et al. 2001): *Ceratorrhiza* - *Ceratobasidium*, *Moniliopsis* - *Thanatephorus*, *Epulorrhiza* - *Tulasnella* és *Sebacina*. Az *Epulorrhiza* nemzetségen belül a *Sebacina*-k mellett két alcsoportot lehet elkülöníteni trópusi orchideákból származó izolátumok alapján (MA et al. 2003), melyeket *Epulorrhiza* I. és *Epulorrhiza* II. csoportként említene; az *Epulorrhiza* I. csoport ivaros megfelelői a *Tulasnella*-k, míg az *Epulorrhiza* II. csoport teleomorf megfelelőit még nem sikerült azonosítani.

Az orchid szimbiózis specifikusságára vonatkozóan ellentmondásos eredményeket találtunk (WARCUP 1971, MASUHARA et al. 1993, PERKINS et al. 1995). Terepi vizsgálatok alapján valószínűnek tűnik, hogy a fotoszintetikus képességüket veszített, obligát módon mikorrhizálódó orchideák specifikus kapcsolatban állnak szimbionta gombáikkal (TAYLOR és BRUNS 1999), de fotoszintetizáló orchideák esetében is születtek igen szűk mikorrhiza diverzitásról tanúskodó eredmények (MCCORMICK et al. 2004). A kapcsolat specifikussága valószínűleg az egyedfejlődés folyamán is változik: a fejlődés korai, obligát szakaszában feltehetően specifikusabb kapcsolat áll fenn a partnerek között, mint később, amikor már fakultatívvá válik a kapcsolat.

Kísérleteink során az *Orchis militaris* szimbionta gombáinak vizsgálatát végeztük el több élőhelyen, kifejlett egyedek gyökerét és a faj csíranövényeit (protokorm) feldolgozva. Vizsgálataink célja az volt, hogy megnézzük, van-e kapcsolat a vizsgált orchidea széles elterjedtsége és szimbionta gombáinak diverzitása között. Kutatásaink során néhány egyéb orchideafajt is vizsgálva (*Dactylorhiza incarnata*, *Epipactis palustris*) arra is próbáltunk fényt deríteni, hogy a vitézkosbor különböző típusú vizsgált élőhelyein van-e különbség a szimbionta gomba közösségek összetételében. Emellett a különböző vizsgálati módszerek lehetővé tették, hogy az *Orchis militaris* szimbiontáit különböző fejlettségi stádiumokban (csíranövény és kifejlett egyed) összehasonlítsuk, és megvizsgáljuk, hogy a vitézkosbor mikorrhizációja változik-e az egyedfejlődése folyamán.

Anyag és módszer

Vizsgált élőhelyek

Kutatásaink során természetközeli és másodlagos, valamint üde és száraz élőhelyeket választottunk vizsgálati területként.

Természetközeli élőhelyként három területet vizsgáltunk: az ócsai láprét-sztyepprért komplexum és a Kunpeszér melletti „Peszéradacsi rétek” orchideákban igen gazdag, üde élőhelyek. Harmadik természetközeli élőhelyként az Érd határában elhelyezkedő Kakukk-hegyet választottuk, mely egy xero-mezofil gyep. Másodlagos élőhelyként felhagyott bányákat, illetve szőlőket választottunk. Ezek közül a tokodaltároi Gete-alji homokbányában üde és száraz területek is találhatóak. A bányába sok orchideafaj települt be a felhagyás óta (BARINA 2000). A Pusztavámhoz közeli egykori szénbányát (Cica-homok, Oroszlány), mely száraz élőhely, csak később hagyták fel, így itt kevesebb orchideafaj él. Felhagyott szőlőként a mogyorósbányai Öreg-hegyet és a Sárisáp melletti (közigazgatásilag Tokodhoz tartozó) Puszta-szőlőt vizsgáltuk, melyek szintén száraz élőhelyek.

Szimbionta gombák izolálása

A szimbionta gombák izolálását kifejlett orchideaegyedekből gyökérszegmens technikával végeztük. A földlabdával együtt begyűjtött bimbós vagy virágzó orchideaegyedek gyökérzetének egy részét (vagy kis növények esetén az egész gyökérzetet) a rátapadt föld lemosása után 1 cm hosszú darabokra vágtuk, majd 0,1% AgNO₃-oldatban 1–3 percig felületileg sterilizáltuk őket. Ezután a gyökérszegmenseket hosszában kettévágtuk, és a gombák felszaporítására alkalmas burgonyakeményítő táptalajra (PDA) helyeztük.

A táptalajon kinövő gombákat izoláltuk, és tiszta tenyészetet hoztunk létre belőlük.

Az izolálás nehézségei miatt (VÉRTÉNYI és BRATEK 1996) abszolút etanolba is eltettünk gyökérmintákat a szimbionta gombák molekuláris azonosításához.

Az *in situ* csíráztatásos módszerrel csíranövények szimbiontaikat vizsgáltuk; ennek során kb. 600–1000 *Orchis militaris* magot szórtunk 4×8 cm-es malomipari szitaszövet darabokra, majd a szitaszövetet egy diakeretbe rögzítve a talajba ástuk. Egy vegetációs periódus elteltével a diakereteket kiástuk; a szitaszövet 80 µm-es lyukátmérője nem engedi, hogy az orchideamagvak kiessenek belőle, viszont a szimbionta gombák hifái be tudnak hatolni a magvakhoz, és indukálhatják csírázásukat. Csírázást csak abban az esetben tapasztalhatunk, ha egy megfelelő gomba szimbiózisra lépett az orchideamagvakkal.

12–12 diakeretet helyeztünk ki három élőhelyen. Kunpeszéren 2006. április 4-től szeptember 27-ig, Tokodaltárón 2006. április 15-től október 20-ig, Mogyorósbányán pedig 2006. április 15-től november 6-ig voltak a talajban az orchidea magok.

Szimbionta gombák azonosítása molekuláris biológiai módszerrel

A szimbionta gombák azonosítását a nukleáris DNS ITS-régiójának szekvenciája alapján végeztük (GARDES et al. 1991). Az ITS1 és ITS2 régiók (internal transcribed spacer) a riboszómák 18S, 5,8S és 25/28S alegységeit kódoló gének közé ékelődnek be. Nem kódoló régiók, viszonylag nagy variabilitásuk faj- illetve nemzetség szintű azonosítást tesz lehetővé.

A folyamat első lépéseként DNS-t vontunk ki izolált, burgonyakeményítő tápoldatban felszaporított gombatorzsból, vagy közvetlenül az *Orchis militaris* szimbionta gomba által kolonizált részből (gyökér vagy protokorm). A minták kis mennyisége miatt bizonyos esetekben a DNS feltárását gyöngymalmos módszerrel végeztük az anyagvesztés elkerülése végett. Ennek során egy speciális Eppendorf-csőbe egy üvegyöngyöt és kevés kvarchomokot tettünk a minták mellé, majd kétszer 1,5 percig rázattuk 30/sec frekvenciával. Ezután 600–750 µl CTAB-lízispuffert öntöttünk rá (2% CTAB, 100 mM Trisz-HCl, 4 M NaCl, 20 mM EDTA), majd a továbbiakban KÁRÉN et al. (1997) protokollját követtük.

Az azonosítás következő lépése az nrITS-régió felszaporítása volt polimeráz láncreakcióval (PCR) (KÁRÉN et al. 1997). A felszaporításhoz izolált gombatorzsek esetében ITS1 és ITS4 primereket használtunk (WHITE et al. 1990), míg a gyökér- és protokorm-DNS kivonatok esetében a fentiek mellett a gombaspecifikus ITS1F és Basidiomycota-specifikus ITS4B primereket is használtuk (GARDES és BRUNS 1993). A sikeres PCR termékeket tisztítási lépés után szekvenáltuk, a szekvenáló reakcióhoz ITS1 és ITS4 primereket használtunk.

Szekvenciák elemzése

A szekvenciák kromatogramjait ellenőriztük és javítottuk a Chromas program felhasználásával, majd az NCBI adatbázis Blast programjával megkerestük a hozzájuk legközelebb álló szekvenciákat. A szimbionta gombákból kapott szekvenciáink mellé az EMBL adatbázisából csoport-azonosítóként választottunk néhány gombafajt, illetve a közeli, nem faji rangon szereplő orchidea szimbionta szekvenciákból is kiválasztottunk néhányat. A kapott szekvenciákat az EMBL adatbázisba a következő hivatkozási számokkal helyeztük le: AM697948, AM711604-AM711623.

A saját és kiválasztott szekvenciák felhasználásával törzsfát készítettünk; a fa szerkesztését 1000 véletlenszerű ismétlést (bootstrap) figyelembe véve, a MEGA 3.1 programcsomag „Maximum parsimony” algoritmusának felhasználásával végeztük.

Eredmények és megvitatásuk

Összesen 21 szimbionta gombát sikerült kimutatnunk, melyek közül 16 *Orchis militaris*-ből, 4 *Epipactis palustris*-ből, egy pedig *Dactylorhiza incarnata*-ból származott. A kimutatott szekvenciák többségét közvetlen molekuláris módszerekkel azonosítottuk (gyökérmintából vagy protokormokból vonva ki DNS-t): a gyökerekből izolált 62 gombatörzsből csak a morfológiai alapon szimbiontának tűnőket azonosítottuk molekuláris módszerekkel is, ily módon négy szimbionta gombát tudtunk azonosítani.

A szimbionta gombáinkat, csoportazonosítókat és közeli szekvenciákat tartalmazó molekuláris törzsfa az 1. ábrán látható.

Az *Orchis militaris*-ből kimutatott szimbionta gombák

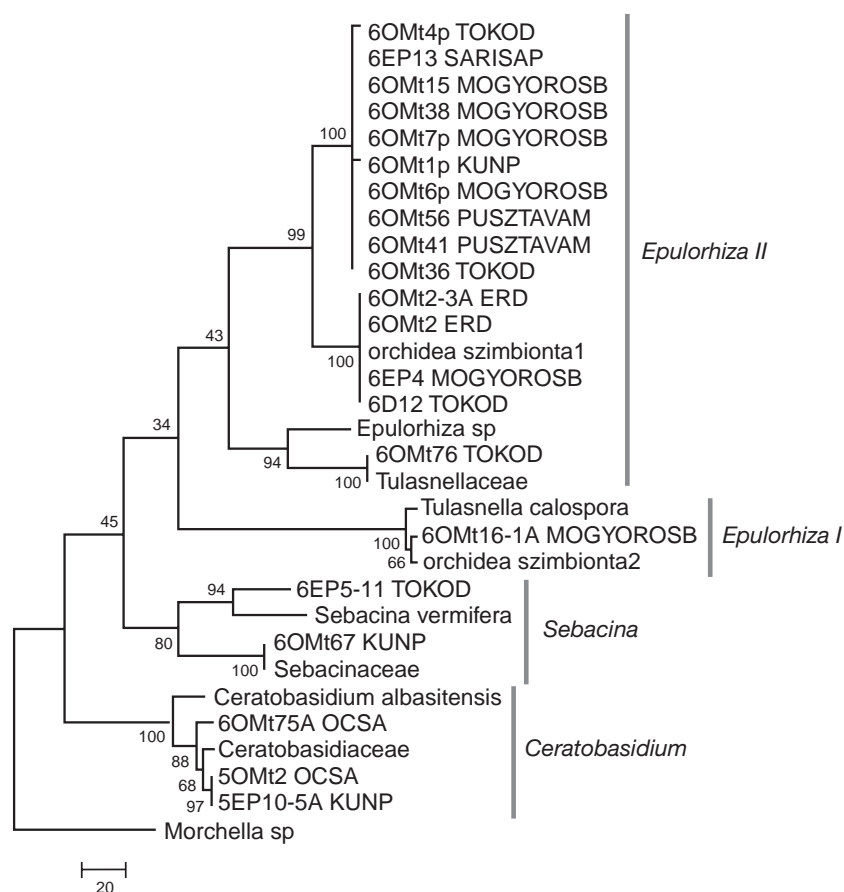
Az *Orchis militaris*-ből kimutatott 16 szimbionta gomba szekvencia között az orchidea szimbionták négy nagy csoportjának (*Epulorhiza* I., *Epulorhiza* II., *Sebacina* és *Ceratobasidium*) is vannak képviselői, tehát az *Orchis militaris* tág szimbionta spektrummal rendelkezik. Feltételezzük, hogy ez a tulajdonság fontos tényező lehet az *Orchis militaris* széles elterjedtségében.

A kimutatott szimbionták több, mint kétharmada az *Epulorhiza* II. csoportba tartozik; a csoporton belül határozottan elkülönülő 6OMt76 számú minta hasonlít legjobban az irodalmakban fellelhető *Epulorhiza* II. szimbionta szekvenciákhoz (MA et al. 2003, BIDARTONDO et al. 2004), míg a csoport többi szekvenciájához ILLYÉS et al. (2006a) bükk-hegységi *Orchis purpurea* szimbionta szekvenciája áll a legközelebb. Más hasonló publikált orchidea szimbionta szekvenciát nem találtunk, tehát úgy tűnik, hogy vizsgálataink során az orchidea szimbiontáknak egy olyan csoportját mutattuk ki, melyet eddig orchideákból nem izoláltak.

Az *Epulorhiza* II. gombák mellett más szimbionta csoportokat, nemzetségeket is kimutattunk. *Tulasnella* (*Epulorhiza* I.) szimbiontát csak egy esetben kaptunk, a mogyorósbányai felhagyott szőlőből; ez érdekes adat, ugyanis korábbi adatok alapján (ILLYÉS et al., 2006b) *Tulasnella* csoportba tartozó gombákat elsősorban nedves, sőt vizes (úszólápi) élőhelyekről sikerült kimutatni. A *Ceratobasidium* nemzetség képviselőit csak Ócsáról tudtuk kimutatni, *Sebacina* szimbionta gombát pedig Kunpeszéről begyűjtött *Orchis militaris* egyedekből tudtunk azonosítani.

1. ábra. „Maximum parsimony” eljárással készült konszenzus törzsfá orchideaminták gyökeréről és csíranövényekből kapott *Rhizoctonia* forma-genushoz tartozó szekvenciák és referenciák bevonásával. A törzsfá elgyökereztetéséhez kívülálló fajként egy bangó (*Ophrys scolopax*) gyökeréről izolált *Morchella* (*Ascomycota*) fajt használtunk (ILLYÉS et al. 2006b). A skála a nukleotidcserék számát jelöli. Az elágazásoknál feltüntetett számok 1000 véletlenszerű ismétléssel generált bootstrap támogatottsági értékek. A referencia szekvenciák EMBL adatbázisban található hivatkozási számai a következők: *Ceratobasidium albasitensis* – AJ427398, *Ceratobasidiaceae* – AY634128, *Epulorhiza* sp. – AJ313458, orchidea szimbionta1 – AJ313458, orchidea szimbionta2 – AJ549130, *Sebacina vermifera* – AF202728, *Sebacinaceae* – AY634117, *Tulasnella calospora* – AY373298, *Tulasnellaceae* – AY634130

Figure 1. Maximum parsimony phylogram based on fungal nrITS sequences originated from orchid roots and protocorms. Outgroup is a *Morchella* sp. strain isolated from *Ophrys scolopax* root (ILLYÉS et al. 2006b). Scale bar indicates number of substitutions per site. Bootstrap values (% of 1000 replications) are indicated by the nodes. Reference ITS sequences used for identification of clades are accessible in EMBL at the following numbers: *Ceratobasidium albasitensis* – AJ427398, *Ceratobasidiaceae* – AY634128, *Epulorhiza* sp. – AJ313458, orchidea szimbionta1 – AJ549121, orchidea szimbionta2 – AJ549130, *Sebacina vermifera* – AF202728, *Sebacinaceae* – AY634117, *Tulasnella calospora* – AY373298, *Tulasnellaceae* – AY634130



A vizsgált élőhelyek szimbiota gomba közösségeinek összetétele

Az üde és száraz élőhelyek szimbiota gombáit összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy a száraz élőhelyeken egy kivétellel csak *Epulorhiza* II. szimbiota gombák fordulnak elő, míg az üde élőhelyeken sokkal több szimbiota gomba előfordul (1. táblázat): az *Epulorhiza* II. szimbioták mellett több *Ceratobasidium*-ot és *Sebacina*-t is ki tudtunk mutatni. A természetközeli és másodlagos élőhelyek szimbiotáit összevetve szintén markáns különbségek figyelhetők meg a két élőhelytípus között. Természetközeli élőhelyeken viszonylag diverz szimbiota közösséget tudtunk megfigyelni (*Epulorhiza* II., *Ceratobasidium* és *Sebacina* szimbiotákat), ezzel szemben másodlagos élőhelyekről döntő többségében *Epulorhiza* II. szimbiotákat, és egy-egy *Epulorhiza* I. és *Sebacina* gombát tudtunk kimutatni.

1. táblázat. A különböző élőhelytípusokról kimutatott szimbiota gomba izolátumok száma

Table 2. Orchid mycorrhizal fungal isolates detected at different types of habitats

Természetközeli, üde		Másodlagos, üde	
Kunpeszér	<i>Ceratobasidium</i> (1) <i>Sebacina</i> (1) <i>Epulorhiza</i> II. (1)	Tokodaltáró	<i>Epulorhiza</i> II. (2) <i>Sebacina</i> (1)
Ócsa	<i>Ceratobasidium</i> (2)		
Természetközeli, száraz		Másodlagos, száraz	
Érd	<i>Epulorhiza</i> II. (2)	Mogyorósbánya	<i>Epulorhiza</i> I. (1) <i>Epulorhiza</i> II. (5)
		Pusztavám	<i>Epulorhiza</i> II. (2)
		Sárisáp	<i>Epulorhiza</i> II. (1)
		Tokodaltáró	<i>Epulorhiza</i> II. (2)

Eredményeinket összegezve látható, hogy mind a természetközeli és másodlagos, mind az üde és száraz élőhelyek elkülönülnek szimbiota gomba közösségeik összetételét tekintve. A legnagyobb szimbiota diverzitást a természetközeli, üde élőhelyeken tapasztaltuk, hiszen a két vizsgált láprétről három szimbiota gomba nemzetség képviselőit is ki tudtuk mutatni (*Epulorhiza* II., *Ceratobasidium* és *Sebacina*). Ezt a megfigyelést, miszerint a lápréteken sokféle szimbiota gomba megtalálható, megerősítik ILLYÉS et al. (2006b) adatai is, ahol több láprétet megvizsgálva mindenütt (így Ócsán is) nagy szimbiota diverzitást tapasztaltak.

Másodlagos és száraz élőhelyeken egyaránt azt tapasztaltuk, hogy az *Epulorhiza* II. csoport szimbiota gombái dominálnak a vizsgált élőhelyeken. Az *Orchis militaris* mellett *Dactylorhiza incarnata*-ból és *Epipactis palustris*-ből is sikerült kimutatnunk ezt a gombacsoportot; feltételezzük, hogy az *Epulorhiza* II. csoport olyan élőhelyeken jellemző, melyek valamilyen stresszhatásnak vannak kitéve (például szárazság, bolygatás). Emellett Érden és Kunpeszéren is találtunk *Epulorhiza* II. szimbiota gombákat, ami arra utal, hogy ez a gombacsoport nem csak bolygatott élőhelyeken él, de valószínű, hogy a természetközeli élőhelyeken háttérbe szorul a többi gombacsoporttal szemben.

Az említett dominancia viszonyokra hatással lehetnek a természetvédelmi célú kezelések is (Ócsán kaszálás, Kunpeszéren legeltetés), melyeknek a természetközeli

élőhelyek kismértékű bolygatásán keresztül akár a magas orchidea szimbionta diverzitás kialakításában és fenntartásában is szerepük lehet.

Csíránövények és kifejlett *Orchis militaris* egyedek szimbiontáinak vizsgálata

In situ csíráztatott protokormokból csak *Epulorhiza* II. szimbiontákat tudtunk kimutatni, míg kifejlett egyedek esetén az előbbi szimbionta csoport mellett más gomba taxonokat, így *Epulorhiza* I., *Ceratobasidium* és *Sebacina* gombákat is ki tudtunk mutatni. Öt protokorm vizsgálata alapján úgy tűnik, hogy az *Orchis militaris* egyedfejlődésének kezdeti, obligát szakaszában elsősorban *Epulorhiza* II. szimbionta gombákkal mikorhizálódik, míg később az elfogadható szimbionták sora bővül. Az irodalmi adatok mellett (ZETTLER et al. 2005) az is alátámasztja eredményeinket, hogy bár Kunpeszéről tudtuk kimutatni a legtöbb szimbionta nemzetséget, a csíránövényekből ezen az élőhelyen is csak *Epulorhiza* II. szimbiontákat kaptunk.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton mondunk köszönetet Barina Zoltánnak, az MTM Növénytár munkatársának és Máté Andrásnak, a Kiskunsági Nemzeti Park munkatársának a terepi munkánk során nyújtott segítségükért.

Irodalom – References

- BARINA Z. 2000: Felhagyott homokbányák florisztikai vizsgálata I. *Kitaibelia* 5: 313–318.
- BIDARTONDO M. I., BURGHARDT B., GEBAUER G., BRUNS T. D., READ D. J. 2004: Changing partners in the dark: isotopic and molecular evidence of ectomycorrhizal liaisons between forest orchids and trees. *Proceedings of the Royal Society* 271: 1799–1806.
- BRATEK Z., ILLYÉS Z., SZEGŐ D., VÉRTÉNYI G. 2001: Az orchidea-típusú mikorrhiza képződésének és működésének egyes kérdései. *Botanikai Közlemények* 88: 185–193.
- GARDES M., BRUNS T. D. 1993: ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113–118
- GARDES M., WHITE T. J., FORTIN J. A., BRUNS T. D., TAYLOR J. W. 1991: Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. *Canadian Journal of Botany* 69: 180–190.
- ILLYÉS Z., ESZÉKI E., OUANPHANIVANH N., GARAY T., HALÁSZ K., GEÖSEL A., LUKÁCS N., BRATEK Z. 2006a: 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., GARAY T., OUANPHANIVANH N., BRATEK Z. 2006b: Orchidea-szimbionta gombák ökológiai diverzitása vizes élőhelyeken. 7. Magyar Ökológus Kongresszus, Budapest, 2006. szeptember 4–6. Előadások és poszterek összefoglalói. p. 91.
- KÁRÉN O., HÖGBERG N., DAHLBERG A., JONSSON L., NYLUND J. E. 1997: Inter- and intra-specific variation in the ITS region of rDNA of ectomycorrhizal fungi in Fennoscandia as detected by endonuclease analysis. *New Phytologist* 136: 313–325.
- MA M., TAN T. K., WONG S. M. 2003: Identification and molecular phylogeny of *Epulorhiza* isolates from tropical orchids. *Mycological Research* 107: 1041–1049.
- MASUHARA G., KATSUYA K., YAMAGUCHI K. 1993: Potential for symbiosis of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia* with seeds of *Spiranthes sinensis* var. *amoena* *in vitro*. *Mycological Research* 97: 746–752.
- MCCORMICK M. K., WIGHAM D. F., O'NEILL J. 2004: Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. *New Phytologist* 163: 425–438.

- MOLNÁR V. A. 1999: *Orchis militaris* L. In: FARKAS S. (szerk.): Magyarország védett növényei . Mezőgazda Kiadó, Budapest, p. 309.
- PERKINS A. J., MASUHARA G., MCGEE P. A. 1995: Specificity of the associations between *Microtis parviflora* (*Orchidaceae*) and its mycorrhizal fungi. *Australian Journal of Botany* 43: 85–91.
- RASMUSSEN H. N. 2002: Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant and Soil* 244: 149–163.
- VÉRTÉNYI G., BRATEK Z. 1996: Talajlakó orchideák mikorrhizaképző gombáinak izolálása és annak nehézségei. *Mikológiai Közlemények* 35: 31–36.
- TAYLOR D. L., BRUNS T. D. 1999: Population, habitat and genetic correlates of mycorrhizal specialization in the 'cheating' orchids *Corallorhiza maculata* and *C. mertensiana*. *Molecular Ecology* 8: 1719–1732.
- WARCUP J. H. 1971: Specificity of mycorrhizal association in some Australian terrestrial orchids. *New Phytologist* 70: 41–46.
- WHITE T. J., BRUNS T. D., LEE S., TAYLOR J. W. 1990: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS M. A., GELFAND D. H., BRINSKY J. J., WHITE T. J. (szerk.): *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, USA, pp. 315–322.
- ZETTLER L. W., PISKIN K. A., STEWART S. L., HARTSOCK J. J., BOWLES M. L., BELL T. J. 2005: Protocorm mycobionts of the Federally threatened eastern prairie fringed orchid, *Platanthera leucophaea* (Nutt.) Lindley, and a technique to prompt leaf elongation in seedlings. *Studies in Mycology* 53: 163–171.

ORCHID MYCORRHIZAL FUNGAL DIVERSITY OF *ORCHIS MILITARIS* HABITATS

N. OUANPHANIVANH, Z. ILLYÉS, S. RUDNÓY, Z. BRATEK

Eötvös Loránd University Faculty of Science, Institute of Biology
Department of Plant Physiology and Molecular Plant Biology
1117 Budapest, Pázmány Péter lane 1/C
e-mail: ouanoe@freemail.hu

Keywords: orchid mycorrhiza, specificity, *Epulorhiza*, protocorm

We have investigated the symbionts of *Orchis militaris* and the fungal communities at some of the habitats of *Orchis militaris*. Symbiotic fungi were identified from orchid roots and from *in situ* germinated protocorms by molecular methods, based on the sequence of nrITS region. Four genus-like taxa of orchid mycorrhizal fungi could be identified from *Orchis militaris*: *Epulorhiza* I, *Epulorhiza* II, *Ceratobasidium* and *Sebacina*. This high fungal diversity can be in connection with *Orchis militaris* ability to live at diverse habitats.

Assaying the fungi at some of the *Orchis militaris* habitats, the highest symbiotic fungal diversity was found at wetlands while dry and/or disturbed habitats showed the poorest diversity, only or mainly with *Epulorhiza* II symbionts.

Comparing the symbionts of adult *Orchis militaris* plants and protocorms, we discovered, that the protocorms were infected only with *Epulorhiza* II fungi, while adult plants lived in symbiosis with more genera of orchid mycorrhizal fungi.