

***EUPHORBIA* TAXONOK ÉS
EUPHORBIA CYPARISSIAS L. POPULÁCIÓK
ÖSSZEHASONLÍTÓ MORFOFIZIOLÓGIAI
JELLEMZÉSE**

Ph.D. ÉRTEKEZÉS

Készült a Pécsi Tudományegyetem
Természettudományi Kar Biológia Doktoriskola
Botanika Program Taxonómia alprogram keretében

Papp Nóra

Témavezető : Dr. Szabó László Gy.

MTA doktora, egyetemi tanár



PÉCS

2005.

Papp Nóra

PTE TTK Növénytani Tanszék, Pécs 7624 Ifjúság u. 6.

Tel.: 72 503 600 / 4861, 4865 mellék. Fax: 72 501 520

E-mail: nora4595@gamma.ttk.pte.hu, nora4595@freemail.hu

Rövidítésjegyzék

HPLC: high performance liquid chromatography (nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia)

TLC: thin layer chromatography (vékonyréteg-kromatográfia)

PAGE: polyacrilamid gel electrophoresis (poliakrilamid gélelektroforézis)

PCR: polymerization chain reaction (polimerizációs lánreakció)

RAPD: random amplified polymorphic DNA (random módon sokszorosított polimorfikus DNS)

SEM: scanning elektron microscop (pásztázó elektron mikroszkóp)

GPS: Global Positioning System

R_f: retenció faktor

BSA: bovin serum albumin

DAB: 3,3-diamino-benzidin-tetrahidroklorid

PMSF: fenil-metil-szulfonil-fluorid

1. BEVEZETÉS

A növényvilág rendszerezésére különböző taxonómiai rendszereket állítottak fel. Ezek a rendszerek képet adnak a növények diverzitásáról, valamint törekszenek a változatosság okainak feltárására. Egy-egy taxon leírásakor számos szempontot vesznek figyelembe; a rokon taxonokéhoz hasonló illetve azokétól elkülönítő bélyegek egyaránt nagy jelentőséget kapnak az osztályozás során.

A ma elfogadott fő taxonómiai kategóriák a következők: világ, törzs, osztály, főrend, rend, család, tribusz, nemzetség, szekció, faj, alfaj, változat és forma (BORHIDI 1995). Elkülönítésükben ma már a külső morfológiai és hisztológiai vizsgálatok mellett a kémiai tulajdonságok jellemzése is fontos szerepet kap. Kialakult a többé-kevésbé speciális növényi metabolitok rendszertani bélyegként való értékelése és az ezekre épülő kemotaxonómia, ami a rendszerezést még sokoldalúbbá, meggyőzőbbé teszi.

Populációk vizsgálatokor felmerülő általános kérdés: vajon az egyes csoportok eltérnek-e olyan mértékben egymástól morfológiai szempontból, hogy fajalatti kategóriákról beszélhessünk? Avagy rendszertani egységnek nem nevezhető „ökotípus” vagy „biotípus” körbe sorolhatók, utalva a környezeti tényezők illetve metabolikus sajátosságok döntő szerepére. Ilyen esetekben számos ökológiai faktor vizsgálatának igénye merülhet fel, hogy a probléma megközelítése minél sokoldalúbb és célravezető legyen.

Konkrét célkitűzéseim előtt bevezetőként néhány szót ejtenék témaválasztásomról. Érdeklődésemet az igen változatos és sokszínű *Euphorbiaceae* család keltette fel. Ez a növény család mintegy 8000 taxont számlál, amelyek előfordulnak a trópusi és mérsékelt övben egyaránt. Előbbiek főként fák és pozsgások, utóbbiak többségükben lágyszárú fajok. Köztük számos gyógy- és mérgező növényt ismerünk. Már a névadó *Euphorbia* nemzetségről is állíthatjuk, hogy igen változatos morfológiai és fitokémiai szempontból egyaránt. Ezt jelzi, hogy a legkorszerűbb rendszerek már 4 nemzetségre tagolják: *Euphorbia*, *Chamaesyce*, *Euphorbiodendron* és *Tithymalus* néven. Ezen beosztás szerint a hazai lágyszárú fajok a *Tithymalus* nemzetségbe tartoznának. A kutatás során a fajokat a hagyományos nevezéktan szerint (SIMON 1992) tárgyalom.

A fentiek alapján vizsgálataink során hét Magyarországon előforduló és jellegzetes ökológiai igényű *Euphorbia* taxont választottunk ki összehasonlító botanikai

vizsgálatokhoz. A cél olyan új jellemző tulajdonságok elemzése, amelyek szorosan kapcsolódnak életstratégiájukhoz. Ilyen tulajdonságokat főleg a virágbiológia köréből választottunk ki.

Kiemelve az igen gyakori *Euphorbia cyparissias* L. fajt, részletesebben tanulmányoztuk néhány életstratégiai jellemzőjét. Ebből a célból kijelöltük a faj 11 populációját a Mecsekben és környékén. Kérdés volt, vajon a különböző élőhelyeken előforduló, morfológiai szempontból változatos populációk fitokémiai és genetikai szempontból is eltérőek-e egymástól; a megfigyelt és vizsgált eltérések indokolják-e ökotípusok vagy biotípusok megkülönböztetését, vagy inkább ökofiziológiai tulajdonságai teszik lehetővé fenotípusos plaszticitását, és emiatt változékony faj.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Kutatásaink során a következő célokat tűztük ki:

- ⌘ 8 *Euphorbia* taxon (*E. amygdaloides*, *E. cyparissias*, *E. esula*, *E. helioscopia*, *E. myrsinites*, *E. palustris*, *E. polychroma*, *E. virgata*) összehasonlító morfofiziológiai jellemzése virágmorfológiai jellemzők és a nektár cukorkomponensei alapján
- ⌘ az *Euphorbia cyparissias* L. életstratégiai jellemzőinek részletes vizsgálata morfológiai és virágbiológiai szempontból
- ⌘ összesen 11 *Euphorbia cyparissias* L. populáció összehasonlító morfofiziológiai és molekuláris genetikai jellemzése az alábbiak szerint:
 - az élőhelyek földrajzi-ökológiai adottságai és társulásai;
 - a populációkra jellemző morfológiai tulajdonságok;
 - a populációkra jellemző flavonoidok (TLC, HPLC);
 - a populációkra jellemző peroxidáz-enzimek mintázata (PAGE);
 - a populációra jellemző DNS-mintázatok (RAPD-PCR).

1. ANYAG ÉS MÓDSZER

1.0. *Euphorbia* fajok virágbiológiai jellemzőinek vizsgálata

3.1.1. Mintagyűjtés

A vizsgált taxonokból élőhelyenként 10 egyed zöld, virágos hajtásrendszerét gyűjtöttük (2002-2003). A növényeket szobahőmérsékleten szárítottuk, vagy egyes részeit (pl. ciátiumok) fixálóban tartósítottuk (3.1.3. pont). A vizsgált fajok és élőhelyeik a következők voltak: *E. amygdaloides* L. (gyertyános-tölgyes, Árpádtető), *E. esula* L. (útszegélyi gyomtársulás, Pellérd), *E. helioscopia* L. (szántófield szegélye, Csarnóta), *E. myrsinites* L. (sziklakert, PTE Botanikus Kert), *E. palustris* L. (mocsárrét, Pellérd), *E. polychroma* Kern. (gyertyános-tölgyes, Tettye) és *E. virgata* W. et K. (útszegélyi gyomtársulás, Pellérd).

3.1.2. A nektáriumok morfológiai jellemzői

A vizsgált fajok ciátiumait etanol:glicerin:víz (1:1:1) elegyében fixáltuk. Desztillált vizes mosás és alkoholos dehidráció után a minták izo-amil-acetátban álltak, majd kritikus ponton szárítás következett. Az aranyárnyékolás Yeol vákuumgőzölőben, a mikrofelvelelek készítése Yeol 100 C-hez adaptált ASID-4 SEM segítségével történt a PTE ÁOK Központi EM-laboratóriumában. A mikrofelveleleken meghatároztuk a nektáriumok kutikularedőinek lefutási irányát, alakját és elágazásait. A morfológiai paramétereket Image Tool 1.27 program segítségével mértük (fajonként 15 mérés). Vizsgáltuk a nektáriumok szélességét, hosszát (μm) és területét (μm^2), a nektáriumnyúlványok hosszát, alapi és csúcsi szélességét (μm), a sztómák és kutikularedők számát/sejt/10 000 μm^2 , a kutikularedők távolságát (μm) és a sztómák melléksejtjeinek számát.

3.1.3. A virágzatok hisztológiai vizsgálata

Az etanol : glicerin : víz (1:1:1) elegyében fixált virágzatokat paraplasztban fixáltuk, majd rotációs mikrotommal 10 μm vastagságú metszeteket készítettünk. A festést toluidinkékkel, a lefedést kanadabalzsammal végeztük. A kész preparátumok vizsgálata NIKON ECLIPSE 80i típusú mikroszkóppal és SPOT BASIC v4.0 programmal történt. A morfológiai paramétereket Image Tool 1.27 program segítségével mértük (fajonként 10 mérés). Vizsgáltuk a nektárium-kutikula vastagságát (μm), a nektárium epidermiszsejtjeinek magasságát és szélességét (μm), a glanduláris szövet sejtjeinek számát, sejtjeinek és a nektáriumparenchyma sejtjeinek magasságát és szélességét (μm).

3.1.4. A nektár cukorösszetételének meghatározása

A vizsgált növények igen kis mennyiségű nektára miatt a virágzatokat metanolban áztattuk. A vékonyréteg-kromatográfiás módszer során tesztvegyületként fruktóz, glükóz, szacharóz, raffinóz, arabinóz, galaktóz, xilóz és maltóz szerepelt. A teszteket és mintákat mikropapilláris segítségével vittük fel szilikagél-rétegekre. A kifejlesztést etilacetát : etanol : 60 %-os ecetsav : bórsavval hidegen telített víz (5:2:1:1) elegyében végeztük. Az előhívás Thymol-reagenssel történt. Az előhívott rétegeket UV=366 nm alatt vizsgáltuk. A mennyiségi mérés során (CAMAG TLC Scanner II, Svájc) a fő cukorkomponensek arányát számoltuk ki: szacharóz/glükóz+fruktóz. A következő kategóriák alapján jellemtük a vizsgált fajok nektárkivonatait: szacharózdomináns, szacharózgazdag, hexózgazdag és hexózdomináns.

3.2. *Euphorbia cyparissias* L. populációk vizsgálata

3.2.1. Élőhelyek és mintagyűjtés

A farkas-kutyatej populációit a következő élőhelyeken jelöltük ki: gyertyános-tölgyes szegélye és irtásrét (Árpádtető 1-2.), kaszált útszegély és mészkő sziklagyep (Csarnóta 1-2.), pionír száraz gyep (Kővágószőlős), degradált száraz gyep (Cserkút), mocsárrét (Pellérd), degradált mészkő-sziklagyep (Tettye 1.), mészkő-sziklagyep erős antropogén hatással (Tettye 2.), fekete fenyves tisztása (Tettye 3.) és a PTE Botanikus Kertje. A területek földrajzi koordinátáit (földrajzi szélesség és hosszúság, tengerszintfeletti magasság, kitettség) GARMIN GPS 76 műszer segítségével határoztuk meg. Alapközetek között szerepelt triász kori mészkő (Tettye, Árpádtető, Botanikus Kert), jura mészkő (Csarnóta) és permiai homokkő (Cserkút, Kővágószőlős). A területek lejtőszöge 0-60° között változott. Élőhelyenként a populációkat 2-3 m² területen vizsgáltuk, cönológiai felvételek 1x1 m területéről készültek. 2002-2004 között a populációk 10-15 példányának teljes herbááját gyűjtöttük. A növényeket a vizsgálat további módjától függően szobahőmérsékleten szárítottuk 14 napig, vagy fagyasztva tároltuk -20 °C-on.

3.2.2. Talajvizsgálatok

A mintavétel a talaj felső 10 cm-es rétegéből történt, mivel a faj gyökérzete nagyrészt itt terül el. A szemcseméreték %-os eloszlását Fritsch analysette (22-32) lézeres szemcsemeghatározó műszerrel mértük. A minták kémiai vizsgálatait során meghatároztuk az oldott sókoncentrációt (%), a pH-t, a humusz- és mésztartalmat (%), valamint a nitrát és nitrit mennyiségét (mg/l).

3.2.3. A populációk külső morfológiai megfigyelésének szempontjai

A populációk vizsgált morfológiai bélyegei a következők voltak: a főhajtás magassága és kerülete (mm), hajtáselágazások száma és hossza (mm), bogernyő magassága (mm), elágazásainak száma és hossza (mm), virágzatok száma egy bogernyőelágazáson, fellevelek hossza és szélessége (mm), valamint a kifejlett lomblevelek hossza (mm).

3.2.4. Flavonoidok vizsgálata

3.2.4.1. Vékonyréteg-kromatográfia (TLC)

A szobahőmérsékleten megszáritott növények főhajtásának, lomblevelének és ciátiumának etanolos kivonataiban vizsgáltuk a flavonoidok komponenseket. Flavonoid-aglikonként kempferol és kvercetin, glikozidként rutin és hiperozid, a fenolsavak közül klorogénsav, kávéssav és ferulasav szerepelt tesztként. A teszteket és mintákat mikrokapilláris segítségével vittük fel szilikagél-rétegekre. Mozgófázisként etilacetát : hangyasav : jégcet : víz (100:11:11:27) elegyét alkalmaztuk. Kifejlesztés után szárítás, majd előhívás következett Naturstoff-reagenssel. A kiértékelés UV=366 nm-nél, a mennyiségi mérés CAMAG TLC Scanner II (Svájc) típusú készülékkel történt.

3.2.4.2. Nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC)

A szobahőmérsékleten megszáritott növények herbájának metanolos kivonatait Waters Millipore típusú HPLC készülékkel vizsgáltuk az SZTE Farmakognózia Intézetében. Az alkalmazott HPLC mérőműszer adatai: 600 Controller, 600 Pump, 2487 Dual λ Absorbance Detector, In-line degasser AF – keverő, LiChrospher RP-18 oszlop (5 μ m, 200 \times 4 mm). Eluensként acetonitril : víz (5:95) + 0,5% foszforsav elegyét alkalmaztuk; az áramlási sebesség 0,8 ml/perc volt. A detektálás 254 és 329 nm hullámhosszon történt.

3.2.5. Peroxidáz vizsgálata

A populációk leveléből foszfátpufferrel (pH=7.0) és PMSF mint proteáz-inhibitor hozzáadásával kivonatokat készítettünk, melyeket fehérjeméréshez és gélelektroforézishez használtunk. A minták fehérjetartalmát (mg/l) fotometriás módszerrel határoztuk meg 596 nm-en, Bradford reagens hozzáadásával; standardként BSA szerepelt (1 μ g/ml). A poliakrilamid-gélelektroforézist Mini Protean 3 Cell (BioRad, USA) készülékben végeztük (gélelegy: 7.5 %-os). Standardként torma peroxidázt alkalmaztunk. A futtatás 80, majd 125 V-on és 50 mA-en történt egy órán át. Ezután a gélt NiDAB-előhívóba helyeztük, melyhez

szubsztrátként H₂O₂-t adtunk; végül Na-acetát-oldatban leállítottuk a reakciót. Festés (CBB) és ecetsavas differenciálás után a géleket vizuálisan értékeltük.

3.2.6. DNS-mintázat vizsgálata

3.2.6.1. DNS izolálás

A szobahőmérsékleten szárított növények herbáját folyékony nitrogénben homogenizáltuk. A DNS-izolálás Dneasy Plant Mini Kit (Quiagen) segítségével történt, majd a mintákat alkoholos kicsapással tisztítottuk. Az *E. cyparissias* populációk előzetesen tesztelt hígításai (5x, 10x, 20x, 30x) közül hígítás nélkül vizsgáltuk az árpádtetői, pellérdi és 2 tettyei mintát, 5x hígításban a kővágószőlősi, csarnótai, 3. tettyei, mecseki irtásréti, cserkúti és a botanikus kerti növények DNS-ét. Kontrollként erdei kutyatej DNS-ét vizsgáltuk, 30-szoros hígításban.

3.2.6.2. PCR – RAPD

A PCR során felszaporítottuk a minták DNS-ének egy tetszőleges szakaszát. Az analízist 42 dekamer primerrel végeztük (Operon Technologies, Alameda, CA.), melyek az OPN, OPO, OPT és OPW primercsoportok tagjai. A polimerizációt PTC-200 típusú PCR-készülékkel végeztük (Perkin Elmer, USA). Ez a program a következő ciklusokból áll: 1. ciklus 94 °C (2 perc), 2. ciklus 94 °C (10 másodperc), 3. ciklus 36 °C (30 másodperc), 4. ciklus 72 °C (1 perc), 5. ciklus 35x a 2-4 ciklusok, 6. ciklus 72 °C (2 perc).

3.2.6.3. Agaróz gélelektroforézis

A 1.5 %-os agaróz gélhez etidium-bromidot adtunk, hogy a DNS-sávok jól láthatóak legyenek. A RAPD program során felsokszorosított növényi DNS-hez a PCR-csővekbe 5 µl 2x STOP festéket mértünk, majd felvittük a mintákat a gélzsebekbe. Markerként minden esetben 3 µl 100 bp DNA Ladder Plus-t alkalmaztunk (Fermentas). A futtatás 110 V-on és 55 mA-en történt.

3.2.6.4. A géleképek megőrzése

A géleket BioDoc-It™ System UV Transilluminator készülékbe helyezve (UVP Inc., Kalifornia) fényképeztük le UV-fényben. A képek nyomtatása SONY UP-895CE típusú nyomtatóval történt.

3.2.6.5. Értékelési módszerek

A növényi minták kapott DNS-sávjait SYN-TAX 5.0 programmal, UPGMA cluster analízissel elemeztük (unweighted pair-group method with arithmetic averages), hasonlósági mátrix és dendrogram készítésével. A kapott polimorf mintázatok sávjait egy bináris prezencia – abszencia típusú adatmátrixban dolgoztuk fel, ahol az adott bázispár-

hosszúságnál jelenlévő sáv jele „1”, a hiányzó sáv jele „0”. Ez a program a DNS mintázatok %-os különbségét veszi alapul, megadva a taxonok egymáshoz viszonyított genetikai távolságát. Ha két genom egymástól való eltérése 10 % feletti értéket ad, az eredmény fajalatti kategóriákat jelez. Ez az analízis tehát alkalmas egy faj populációinak, illetve morfológiai szempontból hasonló taxonok genetikai távolságának megállapítására.

2. EREDMÉNYEK

4.1. *Euphorbia* fajok virágbiológiai jellemzői

4.1.1. Nektáriummorfológia

Félhold alakú, nyúlványos mirigyek jellemzők az *E. amygdaloides*, *E. esula*, *E. cyparissias*, *E. myrsinites* és *E. virgata* virágzatára. Az *E. palustris* és *E. helioscopia* ovális és az *E. polychroma* kerek nektáriumain nyúlványok nem figyelhetők meg. A szélesség és hosszúság aránya a vizsgált mirigyek esetében 1:2 vagy 1:3 volt, mely alól az *E. polychroma* képez kivételt kerek nektáriumával (1:1).

Az *E. amygdaloides* mirigyein a mezomorf sztómák körüli vékony kutikula nem rendeződik redőkbe. Az *E. esula* kutikulamintázata elágazásmentes, ívelt redőkből áll, melyek gyakran „H” vagy fésű alakban rajzolódnak a xeromorf sztómák körül. Az *E. myrsinites* kutikulája vastag rétegben borítja a mirigyet; xeromorf sztómái között a kutikularedők sejtenként „O”, „E”, „W”, „Y” és „Z” formájúak. Az *E. palustris* mirigyének vékony kutikulája „F” és „H” alakú redőkből áll, mezomorf sztómáit 5-6 melléksejt határolja. Tömör és rövid, elágazásmentes gyűrődések tagolják az *E. polychroma* nektáriumának vékony kutikuláját. A sztómák mezomorf helyzetűek, 7-8 melléksejttel határolva. Az *E. virgata* mirigyén a kutikulagyűrődések erősen hullámos lefutásúak. Xeromorf sztómáit 5-6 sejt veszi körül.

4.1.2. Hisztológiai jellemzés

A nektáriumepidermisz sejtjei minden vizsgált faj esetében paliszádok, a glanduláris szövetet és a parenchymát izodiametrikus sejtek alkotják. A mirigyek 2 edénynyalábjában a tracheák sejtfalvastagodása spirális. A porzószalakban centrálisan egyetlen kollaterális, zárt edénynyaláb található. A portokok epidermiszét paliszád sejtek alkotják. A pollenszemek hexakolpátok.

Az *Euphorbia amygdaloides* nektárium-epidermiszsejtjeinek magvai általában a sejtek alsó pólusán találhatóak. A glanduláris szövet sejtjei 4-5 sorba rendeződnek. Az *E.*

esula mirigyében az epidermiszsejtek magvai a sejtek alsó és középső részén helyezkednek el. A glanduláris szövet 3-4 sejtsoros. Az *E. helioscopia* nektáriumának megnyúlt epidermiszsejtjeiben a magvak a sejtek középső részén láthatók, a glanduláris szövet sejtjei 4 sorba rendeződnek. Az *E. myrsinites* esetében mértük a legvastagabb nektáriumkutikulát, mely utal a faj mediterrán eredetére. A mirigy epidermiszsejtjei kevésbé megnyúltak, a glanduláris szövet 2-3 sejtsoros. Számos intercelluláris és lakúna látható a szövetben, hasonlóan a parenchymához. Az *E. palustris* lapított mirigyén az epidermiszsejtek erősen megnyúltak, a vizsgált fajok nektáriumainak legmagasabb bórszöveti sejtjei. A sejtmagok a sejtek alsó részén helyezkednek el. A glanduláris szövet sejtjei 6-7 sorba rendeződnek, kitöltve a mirigy nagy részét. Az *E. polychroma* nektáriumának glanduláris szövete 2-3 sejtsoros; sejtjei magasabbak szélességüknél. Az *E. virgata* nektáriumának epidermiszsejtjeiben a magvak a sejtek közepén láthatók; a glanduláris szövet 3 sejtsoros.

4.1.3. A nektár cukorösszetétele

A vékonyréteg-kromatográfiás módszerrel vizsgált nektárkivonatokból minden faj esetében fruktózt, glükózt és szacharózt mutattunk ki, különböző arányban. A fő cukrok mellett azonosítatlan komponenseket is találtunk az *E. cyparissias*, *E. esula* és *E. virgata* nektárában. Denzitometriás mérés alapján a kivonatok legnagyobb mennyiségben glükózt tartalmaznak (7.5–23.7 %). A fruktóz mennyisége 1.2–14.7 %, a szacharóz 6.8–19.4 % között változott. Szacharózgazdag típusú az *E. amygdaloides*, *E. esula* és *E. virgata*, hexózgazdag az *E. cyparissias*, *E. myrsinites*, *E. palustris* és *E. polychroma* nektára.

4.2. Az *Euphorbia cyparissias* L. életstratégiai jellemzői

Virágbiológiai témakörben a növény nektáriumának ívelt kutikularedőit, xeromorf sztómáit és a faj késői, december havi másodvirágzását emelem ki új eredményként.

Morfológiai szempontból a bogernyő szerkezetében 9 féle típust különítettünk el az elágazások (elágazásmentes, elsőrendű vagy másodrendű elágazásokkal tagolt) és a ciátiumok száma alapján. A vegetatív szaporodásban fontos rizóma sarjai a fő rizómaágon szakaszosan, egymástól 8-10 cm távolságra helyezkednek el.

A növény mikrogomba-parazitája, a borsórozsdá (*Uromyces* sp.) megjelenésekor az irodalomban leírt, egészséges növényekhez képest megnyúlt fertőzött növényekkel szemben vastagabb hajtásúakat és kisebb termetűeket is találtunk Érmihályfalván (Románia). A farkas-kutyatejet gyertyános-tölgyesben szürke tölcsérgomba (*Lepista nebularis* Fr.) mellett találtuk meg, de ez az előfordulás nem tekinthető mikorrhizás kapcsolatnak.

Növénykéimiai szempontból a tejnedvben előforduló flavonoidokat vizsgáltuk, melyek közül két komponens fordul elő nagy mennyiségben. Ezek a kvercetin-3-glükuronid ($R_f=0.57$) és kempferol-3-glükuronid ($R_f=0.7$). A kisebb mennyiségben előforduló mellékkomponensek között kimutattunk a ciátiumokra és lomblevelekre együttesen jellemző 4 komponenst ($R_f=0.2$, $R_f=0.3$, $R_f=0.38$, $R_f=0.81$), melyek a növény főhajtásából hiányoztak. Legnagyobb arányban flavonoidokat a ciátiumokban mutattunk ki, amely bizonyítja a komponensek virágzásban és rovarvonzásban betöltött fontos szerepét. Ezt követi a kifejlett lomblevelek, majd a főhajtás flavonoidtartalma. A növény egy vegetációs periódusa alatt az említett 2 fő komponens jelentős mennyiségi változása is zajlik az egyes szervekben. A ciátiumok flavonoidtartalma a virágzás kezdetekor emelkedik; legnagyobb mennyiségben áprilisban vannak jelen, majd májustól mennyiségük egyre csökken. A lomblevelekben a növény kezdeti fejlődése során tapasztalható a legtöbb flavonoid komponens; mennyiségük a virágzás végére erőteljesen lecsökken, majd lassú gyarapodás figyelhető meg az őszi időszakig. A főhajtásban márciusban és áprilisban tapasztaltuk a legkevesebb flavonoid komponenst; a virágzás után - hasonlóan a lomblevelekhez - lassan emelkedik a mennyiségük, majd ősszel csökkenés figyelhető meg.

4.3. *Euphorbia cyparissias* populációk összehasonlító vizsgálata

4.3.1. A vizsgált élőhelyek talajtani jellemzői

Az *Euphorbia cyparissias* a vizsgált területeken sekély termőrétű vázталajokon (köves-sziklás és földes-kopár vázталaj), lithomorf barna rendzinákon, réti talajon, valamint mély termőrétű klímazonális barna erdőtalajon fordult elő. Minden vizsgált talajtípusnál legkisebb arányban a 2-4 mm méretű szemcsék fordultak elő. A pH 6.14-7.56 közötti (gyengén savanyú, semleges és gyengén lúgos). A humusz- (1.45–6.4%) és a nitráttartalom (0-60 mg/l) széles határok között változott. Nitrit nem fordult elő, néhány szélsőségtől eltekintve (1,3 mg/l). Az összsótartalom alacsony (0-0.12%). A növény mészben gazdag és szegény területeken egyaránt előfordult (0-20.776%).

4.3.2. A vizsgált élőhelyek társulásai

Árpádtetőn egy gyertyános-tölgyes szegély-társulásában a farkas-kutyatej 15 % borítási értéket ért el. A gyertyános-tölgyes melletti irtásréten a növény borítása 50 %; itt jellemzőek a mezofil lombdők és az irtások növényfajai is. A cserkúti élőhely egy erősen degradált száraz gyeptársulás, Kővágószőlőson egy pionír száraz gyepon él az *Euphorbia cyparissias* (borítása 45 %). A PTE Botanikus Kertjében a növény borítása 15 %. A

pellérdi mocsárréten az összborítás 100 %-os volt, melyből az *Euphorbia cyparissias* 50%-ot foglalt el. Csarnóta mellett a faj kaszált útszegélyen fordult elő, mindössze 10% borítással. A társulás fajai száraz és félszáraz gyepi növények. A Nagykopasz-hegy mészkő-sziklagyepén a farkas-kutyatej 15%-ot képviselt a különböző száraz gyepi és mediterrán növényfajok között. A Tettye degradált mészkő-sziklagyepén 20%-ot, az építési törmelékkel szennyezett sziklagyepen 15%-ot borított a vizsgált faj. A telepített fekete fenyves tisztására a fenyők laza lombkoronája viszonylag sok napfényt enged; a farkas-kutyatej itt 25%-ot foglalt el.

4.3.3. A populációk morfológiai jellemzői

Az *Euphorbia cyparissias* makromorfológiai bélyegei a vizsgált két vegetációs periódus alatt közel állandónak tekinthetők a 11 termőhelyen.

Az árpádtetői gyertyános-tölgyes szegélyén és az irtásréten élő növények nagy termetűek (276 és 390 mm), magas bogernyővel. Az irtásréti növényeknél találtunk kizárólag elágazásmentes bogernyőt. A legnagyobb termetű egyedeket (450.5 mm) a csarnótai útszegélyen mértük. A vizsgált populációk között itt volt a legtöbb elsőrendű bogernyőelágazás (13 db) és a legnagyobb a bogernyő hajtásmagassághoz viszonyított aránya (1:8.8). A Nagykopasz-hegy sziklagyepén élő növények főhajtása gazdagon elágazó, főhajtásonként átlagosan 11 elágazással. A főhajtás gyakran 5-10 cm magasságig elfásodik. Ezt a jelenséget kizárólag ennél a populációnál figyelhettük meg. Nagy termetű növények fordultak elő a cserkúti és kővágószőlősi száraz gyepen, valamint a pellérdi mocsárréten. A mocsárréti egyedeknél mértük a bogernyőmagasság legkisebb arányát a főhajtás magasságához viszonyítva (1:2.8). A tettyei degradált mészkő-sziklagyep növényei a vizsgált morfológiai bélyegek tekintetében a legalacsonyabb értékeket képviselik (pl. hajtásmagasság: 130 mm; a levélhossz: 9 mm, hajtástő kerülete: 4 mm). Az építési törmelékkel szennyezett sziklagyepen robusztus (439 mm magas), dús elágazású növények élnek. A bogernyőben kizárólag itt fordultak elő másodrendű elágazások. A lombszelevek a vizsgált populációk között a leghosszabbak (47 mm), a fellevelek a legszélesebbek (12 mm). A tettyei fekete fenyves tisztásán előforduló növényeknél számoltuk a legkevesebb ciátiumot (10 ciátium/bogernyő). Alacsony termetű növények (150 mm) élnek a PTE Botanikus Kertjében.

Néhány összefüggést figyeltünk meg az egyes morfológiai bélyegek között. A főhajtás magasságával az elágazások és lombszelevek hossza, a virágzati fellevelek hossza és szélessége, valamint a főhajtás kerülete is egyenes arányossággal változik. A hajtáselágazások száma egyenesen arányos a bogernyő elsőrendű elágazásainak számával.

A kapott adatok alapján a populációkat 4 csoportba soroltuk: legnagyobb arányban a II. és III. kategóriába sorolhatók (150-350 és 350–400 mm hajtásmagassággal). A szélsőségesen alacsony (I. csoport: < 150 mm) és a robusztus egyedek (4. csoport: > 400 mm) mindössze 3 populációban fordultak elő.

4.3.4. A populációk flavonoidmintázata

Vékonyréteg-kromatográfias módszerrel a populációk flavonoidjai között a ciátiumok komponenseinél kiugróan a csarnótai és a botanikus kerti populációk eltérését figyeltük meg. A lomblevelek tekintetében jelentős eltérést a kővágószőlősi száraz gyeper, az árpádtetői irtásrét és a Tettye túlevelű erdejének populációja, a csarnótai útszegély mentén, a Botanikus Kertben és a tettyei szennyezett sziklagyepen előforduló növények mintázata mutatott. A populációk főhajtásainak flavonoid-mintázatánál mindössze az irtásréti populáció mutatott eltéréseket, két mellékkomponens jelenlétével. Tehát jelentős eltérést a 11 kijelölt populáció flavonoid-mintázatában összesen 8 esetben tapasztaltunk. A különbségek főként az eltérő kitettséggel magyarázhatók, utalva a flavonoidok fényre való képződésére. Fényben gazdagabb területeken a növények flavonoidösszetétele is gazdagabb, mely eredményt a HPLC-vizsgálatok is megerősítettek. A HPLC-vel végzett vizsgálatok során 18 különböző flavonoid komponens mutatott ki a populációk hajtásrendszeréből. Legkevesebb 4, maximum 16 komponens fordult elő egyszerre egy populáció növényeinél. A komponensek tekintetében mind minőségi, mind mennyiségi eltérést is tapasztaltunk, melyek utalnak az élőhelyi sajátosságokra. Fényben szegényebb területeken a növények flavonoid-mintázata is szegényebb. A naposabb területek populációi jóval gazdagabbak flavonoid komponensekben.

4.3.5. A populációk peroxidáz mintázata

A vizsgált *Euphorbia cyparissias* populációk magas fehérjetartalma miatt vizsgáltuk a populációk peroxidáz-mintázatát. A kontroll peroxidáz 3 sávot tartalmazott, melyhez viszonyítva a populációk peroxidáz-mintázatában 1-4 sáv jelent meg. A mintázatokban 5 féle közös és 5 féle egyedi sávot figyeltünk meg. Összesen a populációkban 10 féle polimorf peroxidáz-sáv volt jelen.

4.3.6. A populációk DNS mintázata

A DNS-mintázat vizsgálata során 16 primer mutatott értékelhető mintázatot, melyekkel összesen 441 db polimorf sávot kaptunk. A legértékesebb eredményeket az OPT-20, OPW-17, OPN-5, OPO-7, OPO-10, OPO-12, OPO-13 és OPO-14 primerekkel értük el. Minden vizsgált populáció DNS-mintája tartalmazott egyedi sávokat valamely

primerrel. A SYN-TAX 5.0 program segítségével készített dendrogram alapján a 11 populáció DNS-mintázata között igen magas, 51.7 – 81.9 %-os eltéréseket találtunk. A PCR–RAPD módszer tehát alkalmas fajon belüli változatosság jellemzésére, mivel az analízis során jelentős genetikai eltéréseket mutattunk ki a farkas-kutyatej eltérő ökológiai körülmények között élő populációinak DNS-mintázatában.

3. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

Munkánk során az *Euphorbiaceae* család névadó nemzetségében, az *Euphorbia* nemzetségben végeztünk összehasonlító morfofiziológiai és molekuláris biológiai vizsgálatokat különböző taxonok, valamint egy kiválasztott faj, az *Euphorbia cyparissias* 11 populációja között. Ez utóbbi taxont részletesen is jellemeztük új életstratégiai megfigyelésekkel.

I. Összehasonlító vizsgálataink során 8 *Euphorbia* taxont jellemeztünk virágbiológiai szempontból.

☞ Meghatároztuk a vizsgált fajok esetében a nektáriumok alakját (félhold alakú vagy lekerekített, nyúlványok nélküli mirigyek), a nektáriumok felszínét borító kutikula mintázatát és vastagságát. Ez utóbbi a sztómák helyzetével együtt a fajok életstratégiai típusára utal vastag kutikula és xeromorf sztómák jellemzők a szárazabb körülmények között élő fajok (*E. cyparissias*, *E. esula*, *E. helioscopia*, *E. myrsinites*, *E. virgata*), vékonyabb kutikularéteg és mezomorf sztómák az erdős és lápos területek növényeinek nektáriumára (*E. amygdaloides*, *E. palustris*, *E. polychroma*).

☞ Hisztológiai szempontból a vizsgált *Euphorbia* fajok nektárium-epidermiszsejtjei paliszádok. A glanduláris szövetet és a parenchymát izodiametrikus sejtek alkotják. A mirigyekben edénynyalábjában a tracheák sejtfalai spirálisan vastagodnak. A porzószámban kollaterális zárt edénynyaláb található. A portokok epidermiszsejtjei paliszádok, a pollenszemek hexakolpátok.

☞ A nektárkivonatokban 7 faj esetében fruktózt, glükózt és szacharózt mutattunk ki. Azonosítatlan komponenseket találtunk az *E. cyparissias*, *E. esula* és *E. virgata* nektárjában. A vizsgált fajok nektára szacharózgazdag (*E. amygdaloides*, *E. esula*, *E. virgata*) vagy hexózgazdag (*E. cyparissias*, *E. myrsinites*, *E. palustris*, *E. polychroma*) típusba sorolható.

II. A fenti taxonok közül az *Euphorbia cyparissias*-t választottuk ki részletesebb életstratégiai jellemzés céljából.

☞ Virágbiológiai témakörben a fent említett ívelt nektárium-kutikularedők és xeromorf sztómák mellett a faj késői, december havi másodvirágzásának megfigyelését emeljük ki új eredményként.

☞ Morfológiai szempontból a bogernyő szerkezetének vizsgálatakor 9 féle elágazási típust különítettünk el, melyeket a faj esetében elsőként illusztráltunk. A vegetatív szaporodásban fontos rizóma sarjai a fő rizómaágon szakaszosan helyezkednek el.

☞ A növény mikrogomba-parazitája, a borsórozsa (*Uromyces* sp.) megjelenésekor az irodalomban leírt, megnyúlt fertőzött egyedek mellett vastagabb hajtásúakat és kisebb termetűeket is találtunk.

☞ Növénykémiailag szempontból a tejnedv flavonoidjai közül két komponens fordul elő nagy mennyiségben (kvercetin-3-glükuronid: $R_f=0.57$) és kempferol-3-glükuronid: $R_f=0.7$). A kisebb mennyiségben előforduló mellékkomponensek között kimutattunk a ciátiumokra és lomblevelekre együttesen jellemző 4 komponenset, melyek a növény főhajtásából hiányoztak. Legnagyobb mennyiségben flavonoidokat a ciátiumokban mutattunk ki; ezt követi a kifejlett lomblevelek, majd a főhajtás flavonoidtartalma. A növény egy vegetációs periódusa alatt a ciátiumok flavonoidtartalma a virágzás kezdetekor emelkedik, májustól mennyiségük csökken. A lomblevelekben a növény kezdeti fejlődése során tapasztalható a legtöbb flavonoid komponens; mennyiségük a virágzás végére erőteljesen lecsökken, majd az őszi időszakig gyarapodás figyelhető meg. A főhajtásban márciusban és áprilisban tapasztaltuk a legkevesebb flavonoid komponenset; a virágzás végére mennyiségük emelkedik, majd ősszel csökkenés figyelhető meg.

III. A farkas-kutyatej 11 kijelölt populációja között összehasonlító vizsgálatokat végeztünk.

☞ A kijelölt populációk termőhelyei között szerepelt sziklagyep, túlevelű erdő tisztása, gyertyános-tölgyes szegélye, irtásrét, mocsárrét és útszegélyi gyomtársulás.

☞ A növény leggyakrabban a gyepekre jellemző vázталajon, valamint barna erdőtalajon és rendzinán fordul elő. A termőhelyek vizsgált talajparamétereit tekintve a faj tág tűrésű a humusz-, mész- és nitráttartalom, valamint szűk tűrésű a pH, az oldott sók és nitrittartalom szempontjából.

- ☞ A 11 termőhely társulásában azt tapasztaltuk, hogy a növény a humuszban gazdagabb élőhelyeken nagyobb borítást ért el. A mért mésztartalom szempontjából a faj szintén szélsőséges értékek mellett is előfordul, de a legnagyobb borítást a mészben közepesen gazdag talajú területeken ért el.
- ☞ Morfológiai szempontból a populációk fő bélyegei a vizsgált két vegetációs periódus során közel állandónak tekinthetők az egyes területeken, de a populációk között nagy eltéréseket tapasztaltunk. Szélsőségesen alacsony és robusztus egyedek mindössze 3 populáció esetében voltak jellemzők. Megfigyeltük továbbá, hogy a főhajtások magasságával az elágazások és lomblevelek hossza, a fellevelek hossza és szélessége, valamint a főhajtás kerülete egyenes arányossággal változik. A hajtáselágazások száma minden populációnál egyenesen arányos a bogernyő elsőrendű elágazásainak számával.
- ☞ A populációk flavonoidjai között a ciátiumok és a lomblevelek tekintetében mutattak eltérést a populációk. HPLC-vel 18 különböző flavonoid komponenst mutattunk ki a populációk hajtásrendszeréből. A komponensek tekintetében mind minőségi, mind mennyiségi eltérést is tapasztaltunk. Fényben szegényebb területeken a növények flavonoid-mintázata is szegényebb, a naposabb területek populációi pedig jóval gazdagabbak flavonoid komponensekben.
- ☞ A vizsgált *Euphorbia cyparissias* populációk peroxidáz-mintázatában 1-4 sáv volt jelen. 5 féle közös sávot találtunk összesen 9 populáció, egyedi sávokat (5 db) pedig 4 populáció esetében. Összesen a populációkban 10 féle polimorf peroxidáz-sávot figyeltünk meg.
- ☞ A DNS-mintázat vizsgálata során összesen 441 db polimorf sávot kaptunk. A legértékkelhetőbb eredményeket OPN és OPO-primer-család tagjaival kaptuk; az ezek alapján készített dendrogram a 11 populáció között 51.7 – 81.9%-os eltéréseket mutat, utalva a fajon belüli változatosságra és genetikai eltérésekre.

Munkánk során a következő új eredményeket értük el:

1. Összehasonlító vizsgálataink során 8 *Euphorbia* taxont jellemeztünk virágbiológiai szempontból: meghatároztuk a nektáriumok alakját és szövettani szerkezetét, kutikulamintázatát, a nektáriumsztómák helyzetét és a nektárkivonatok cukorkomponenseit.
2. Az *Euphorbia cyparissias*t részletesen jellemeztük néhány életstratégiai szempontból: virágbiológiai témakörben jellemeztük a nektáriumokat morfológiai és szövettani szempontból, leírtuk a faj késői, decemberi másodvirágzását, morfológiai szempontból a bogernyő 9-féle elágazási típusát, a növény főbb flavonoid komponenseit és azoknak egy vegetációs perióduson belüli mennyiségi változását.
3. Az *Euphorbia cyparissias* 11 kijelölt, eltérő ökológiai körülmények között élő populációja esetében jelentős eltérést tapasztaltunk a fő morfológiai bélyegek, flavonoid-komponensek, peroxidáz- valamint DNS-mintázat tekintetében, melyek bizonyítják a faj polimorf jellegét.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Az értekezés témájához kapcsolódó publikációk

PAPP N.: *Euphorbia cyparissias* L. morfológiai, szaporodásbiológiai és fitokémiai jellemzői. In Press: in *Kitaibelia*

PAPP N.: Antimicrobial activity of extracts of five Hungarian *Euphorbia* species and some plant metabolites (2004). *Acta Botanica Hungarica* : 46(3-4): 363-371.

PAPP N.: Nectar and nectary studies on seven *Euphorbia* species (2004). *Acta Botanica Hungarica* : 46(1-2): 225-234.

PAPP N.: Nektáriumvizsgálatok *Euphorbia* fajokon (2003). *Botanikai közlemények* : 90(1-2): 162.

PAPP N., SZABÓ L. GY. : *Euphorbia cyparissias* L. ökotípusok fitokémiai jellemzői (2002). *Botanikai Közlemények* : 88(1-2): 205.

SZABÓ L. GY., BOTZ L., OROSZ-KOVÁCS ZS., DEZSŐ GY., FARKAS Á., HORVÁTH GY., PAPP N., POZSONYI K., BALOGH L. (2002): Fitokémiai habitus és életstratégia. In: Salamon-Albert, É.: Magyar botanikai kutatások az ezredfordulón. Tanulmányok Borhidi Attila 70. születésnapja tiszteletére. PTE Növénytan Tanszék Pécs. pp. 235-253. (könyvfejezet)

PAPP N., SZABÓ L. GY., HOHMANN J. : Néhány *Euphorbia* taxon fitokémiai és magélettani tulajdonságainak előzetes értékelése (2001). *Gyógyszerészet* : 262-263.

Az értekezés témájához kapcsolódó konferencia poszterek és közlemények

PAPP N., KOCSIS M., SZENTPÉTERI L. J., STRANCZINGER SZ.: Molecular biological studies on *Euphorbia cyparissias* L. populations (2004). 14th Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology. The Franciszek Gorski Institute of Plant Physiology, Polish Academy of Sciences, Cracow, Poland. In Przemyslaw, W. (ed): *Acta Physiologiae Plantarum* : 26(3): 62. (poster)

PAPP N., KŐSZEI T., OROSZ I., SZILÁGYI S.: Life strategy characteristics of *Euphorbia cyparissias* L. (2003). In: Simon, G. (szerk., ed.): Összefoglalók. Abstracts Horticultural Science. Lippay János-Ormos Imre-Vas Károly Tudományos Ülésszak, Budapest. pp. 162-163. (poster)

PAPP N.: Antimicrobial activity of *Euphorbia* species against some microorganisms / Efectos de *Euphorbia* especies en microbios (2003). In: Aguirre, C. (ed.): Book of Abstracts. 5th European Ethnopharmacological Congress, University of Valencia, Spain. pp. 106-107. (poster)

PAPP N., KŐSZEGI T., OROSZ I., SZABÓ L. GY. : Life strategy examinations and special metabolites of some *Euphorbia cyparissias* L. populations (2002). In: Roubelakis-Angelakis, K. A. (ed): Book of Abstracts. 13th Congress of the Federation of European Societies of Plant Physiology, University of Crete, Hersonissos Heraklion Crete, Greece. p. 606. (poster)

PAPP N., SZABÓ L. GY.: Some phytochemical and morphophysiological characteristics of *Euphorbia cyparissias* L. populations (2002). In: Gulya, K. – Bakota, L. (eds): *Acta Biologica Szegediensis* : 46 (3-4): 251-252. (poster)

Más témában megjelent publikációk:

JANDA T., SZALAI G., PAPP N., PÁL M., PÁLDI E.: Effects of Freezing on Thermoluminescence in Various Plant Species (2004). *Photochemistry and Photobiology*: 80:525-530.

Az értekezés témájában tartott előadások:

PAPP N.: *Euphorbia cyparissias* biotípusok morfológiai és fitokémiai jellemzése (2003). MTA Pécsi Területi Bizottsága Biológiai Szakbizottsága ünnepi ülése, Prof. Dr. Rácz Gábor 75. születésnapja alkalmából. Pécs, 2003. nov. 21.

PAPP N.: Nektáriumvizsgálatok *Euphorbia* fajokon (2003). Magyar Biológiai Társaság Budapesti Csoportjának 1390. szakülése Budapest, 2003. ápr. 7.

PAPP N.: *Euphorbia cyparissias* L. populációk morfofiziológiai és fitokémiai jellemzői (2002). Magyar Tudomány Napja Pécs, Pécsi Akadémiai Bizottság Székháza, 2002. nov. 8.

PAPP N. : Pécs környéki *Euphorbia cyparissias* L. populációk néhány fitokémiai jellemzője (2002). Magyar Biológiai Társaság Pécsi Csoportjának 158. szakülése Pécs, 2002. máj. 23.

PAPP N.: Az *Euphorbia cyparissias* L. életstratégiája (2001). Magyar Biológiai Társaság Pécsi Csoportjának 147. szakülése Pécs, 2001. jún. 6.

PAPP N.: *Euphorbia cyparissias* L. ökotípusok fitokémiai jellemzői (2001). Magyar Biológiai Társaság Budapesti Csoportjának 1372. szakülése Budapest, 2001. máj. 7.

PAPP N., SZABÓ L. GY.: *Euphorbia* fajok magélettana (2000). Magyar Biológiai Társaság Pécsi Csoportjának 136. szakülése Pécs, 2000. márc. 29.