



SZENT ISTVÁN EGYETEM

**AZ ENERGIAFŰZ KARIOTIPIZÁLÁSA ÉS AZ AUTOTETRAPLOID
NÖVÉNYEK CITOLÓGIAI ÉS MORFOLÓGIAI JELLEMZÉSE**

Doktori (PhD) értekezés tézisei

NAGY ANNA VIKTÓRIA

GÖDÖLLŐ

2019

A doktori iskola

- Megnevezése:** Növénytudományi Doktori Iskola
- Tudomány ága:** Kertészeti és növénytermesztési tudományok
- Vezetője:** Dr. Helyes Lajos
egyetemi tanár, az MTA doktora
SZIE, Mezőgazdaság-és Környezettudományi Kar
Kertészeti és Technológiai Intézet
- Témavezető:** Prof. Dr. Dudits Dénes
Emeritus kutatóprofesszor,
az MTA rendes tagja
Szegedi Biológiai Kutatóközpont,
Növénybiológiai Intézet

.....

Az iskolavezető jóváhagyása

.....

A témavezető jóváhagyása

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, A KITŰZÖTT CÉLOK

Az elmúlt évtizedekben világszerte és hazánkban is a megújuló energiaforrások iránti növekvő igényeknek köszönhetően egyre jobban előtérbe került az energianövények így a rövid vágásfordulójú fafajok termesztése is. Az energetikai céllal telepített ültetvények biomasszája akár zöld, akár fa alapanyagként energia forrásként szolgálhat a különböző iparágak számára. Az energianövények jó alkalmazkodóképességüknek, gyors növekedési ütemüknek és a gyengébb minőségű talajjal szembeni toleranciájuknak köszönhetően sikerrel termesztethetők a szélsőséges adottságú területeken is. A fás szárú energetikai ültetvényekkel megvalósítható a nehézfémekkel szennyezett területek rekultivációja, fitoremediációja, a talajok növényi fémakkumuláció segítségével történő javítása, felhasználhatók a szennyvíziszap illetve szennyvíz tisztítására is. A zöldenergia hasznosítása a fokozatosan kimerülő, nem megújuló energiaforrások kiváltásában kaphat szerepet. Gazdaságosan és könnyen előállíthatók, ugyanakkor környezetterhelésük minimális.

Hazánkban a hasznosításra kerülő megújuló energiaforrások közül a legnagyobb jelentősége a biomasszának van, amely 65-80%-os aránnyal bír. A fás szárú energiaültetvényeken megtermelt biomassza felhasználása alapvetően a hő-és villamosenergia előállítására irányul, de bioetanol és biogáz előállítására is alkalmasak (Csipkés 2011). Magyarországon napjainkban közel 5,3 millió hektáron folyik mezőgazdasági termelés, ebből hozzávetőlegesen 4,3 millió hektáron szántóföldi növénytermesztés. A kedvezőtlen termőhelyek aránya a több százezer hektárt is eléri, amelyeken azonban megvalósítható a fás energia ültetvények telepítése (Gyuricza et al. 2012). Hazánk összes biomassza készlete 350-360 millió tonna. A biomassza nagy részét a faalapú biomassza képezi, ami magában foglalja a fás energiaültetvények mellett az erdőgazdálkodásból származó szilárd biomasszát is (Vágvolgyi 2013). Magyarországon az energiatermelés céljából létrehozott ültetvényekben elsődlegesen használt fafajok a nyár, az akác és a fűz. Az elmúlt évtizedben a zöldenergiák iránti egyre növekvő igényeknek köszönhetően megnőtt az energianövények, - mint megújuló energiaforrások - hasznosítása következtében a természetes erdők, valamint a marginális termőhelyeken létesített fás szárú energetikai ültetvények jelentősége is (Dudits és Nagy 2017).

A doktori munkám során a következő célkitűzéseket határoztuk meg:

1. Az „ENERGO” energiafűz (*Salix viminalis* L. $2n=38$) poliploidizációja és az így előállított autotetraploid egyedek felszaporítása, citológiai és élettani jellemzése.

A poliploidizáció előnyeinek kiaknázása új utakat nyithat a magas biomassa produktummal, és jobb agronómiai és energetikai jellemzőkkel rendelkező populációk energiaültetvényekben történő hasznosításában, valamint értékes alapanyagot szolgáltatathat a további nemesítési célok meghatározásában és elérésében.

2. Az „ENERGO” energiafűz fajta (*Salix viminalis* L. $2n=38$) molekuláris citogenetikai jellemzése fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) alkalmazásával.

A fűz kariotípusa, a genom részletes szerkezete, az ismétlődő DNS szekvenciák fizikai elhelyezkedése még nem ismert. A faj részletes molekuláris citogenetikai elemzése, a kromoszómális jellemzők átfogó vizsgálata elősegíti, és hasznos információkat nyújthat a fűz további nemesítésében és felhasználásában. A citogenetikai vizsgálathoz a lehető legnagyobb mitotikus index elérésére törekedtünk a kísérleti körülmények optimalizálásával. A DNS próbákat különböző kombinációban teszteltük és az így kapott *in situ* hibridizációs mintázat alapján állítottuk össze a *Salix viminalis* L. kariotípusának főbb elemeit.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. A kísérleti alapanyag és a fajta kiválasztása, a dugványok tárolása, előkészítése és az üvegházi kísérleti körülmények beállítása

Kísérleteinket a Kreátor 2005. Kft. által nemesített és szaporított „ENERGO” (*Salix viminalis* L., $2n=2x=38$) energiafűz fajtával végeztük. A kísérletünkben felhasznált szaporítóanyagok 20 cm-es fűzdugványok, amelyek azonos genetikai háttérrel rendelkező klónok. A dugványokat a szántóföldi betakarítástól a kísérleti felhasználásig hidegszobában 4°C-on tároltuk. A kiültetés előtt csapvízben áztattuk 48 órán át szobahőmérsékleten. A kiültetést a szántóföldi termesztéstechnológia figyelembevételével végeztük. A növényeket üvegházban, 16 óra mesterséges megvilágítás és 8 óra sötét periódus, illetve 400 μmol foton/ m^2/s fényintenzitás mellett neveltük, 18-22°C hőmérsékleten optimális vízellátottsággal. A poliploidizációs kísérletünkhöz a rügyfakadást követően izoláltuk a friss fiatal hajtásokat, majd laboratóriumi körülmények között az előzetes felszínsterilizációt követően steril tenyészeteket hoztunk létre.

2.2. Tetraploid fűz vonalak előállítása az oldalhajtások rügyeinek kolhicin kezelésével

Az üvegházból származó 2-4 cm-es hajtás darabok felszínsterilizálását lamináris boxban, 10 perces steril vízben történő áztatást követően kezdtük meg az alábbi lépések szerint. Steril Erlenmeyer-lombikban 10 percig 0,2%-os HgCl_2 oldatban lassan rázattuk, majd a HgCl_2 leöntését követően szintén lassú rázatás mellett 10 percre 70%-os etanol oldatban áztattuk tovább az explantumokat. Az etanolos áztatás után steril vízzel 3×10 perces mosást végeztünk, majd a hajtás darabokat steril szűrőpapírra téve rövid szárítást követően félszeres koncentrációjú hormonmentes Murashige and Skoog (MS) táptalajra (Murashige és Skoog, 1962) helyeztük. Fényszobában 25°C-on előbb petricsészében, majd steril dunsztos üvegben neveltük. A regenerált 8-10 cm-es hajtások csúcsi merisztémáját eltávolítottuk, és 48 óra elteltével kolhicin kezelésnek vettettük alá. A feldarabolt oldalrügyeket 0,05% és 0,1%-os koncentrációjú kolhicin oldatban, sötétben inkubáltuk 48 órán keresztül. A kolhicin kezelés után az explantumokat háromszor öblítettük steril desztillált vízzel, majd ezt követően 0,6%-os agaróz tartalmú kolhicin és hormonmentes Murashige and Skoog (MS) táptalajra helyeztük. A kezelt csúcsi rügyekből 2-3 cm hosszú szárú hajtások növekedtek, amelyeket levágtunk és megkezdtük az *in vitro* mikroszaporításukat. Az így regenerált növénykékek differenciálódott gyökereit a ploidszint meghatározáshoz használtuk fel.

Egy év alatt a szár dugványokból *in vitro* körülmények között felszaporított, 8-10 cm magas, gyökeres tetraploid növényállomány egyedeit földbe ültettük és üvegházi körülmények között neveltük tovább. Az üvegházba kiültetett gyorsan növekedő fűz növények szára elfásodott, így alkalmassá váltak szaporítóanyag előállításra a további üvegházi és szántóföldi kísérleteinkhez.

2.2.1. A genoméret meghatározása különböző módszerekkel

A kezelt rügyekből származó növények tesztelését áramlási citometriával, illetve egy a fűzre optimalizált protokoll segítségével kromoszómaszámolással végeztük.

Az áramlási citometria vizsgálat során Galbraith *et al.* (1983) protokollját alkalmaztuk. Megsebzett, agaron vagy vízben gyökeresített, két hetes dugványok gyökercsúcsából vettünk mintát. Az áramlási citometria vizsgálatot egy BD FACSCalibur típusú flow citométerrel végeztük 532 nm-es zöld szilárd félvezető áramkörű lézerrel 30mV-on. Az elemzett relatív fluoreszcens intenzitás értékek alapján összehasonlíthatók, valamint azonosíthatók a diploid és tetraploid minták. Az áramlási citometria alkalmas volt a tetraploid jelölt egyedek előszelekciójára, így a kiválasztott növényeken további vizsgálatokat végeztünk. A tetraploid jelölt egyedek kromoszómaszám meghatározását az általunk kidolgozott molekuláris citogenetikai protokoll alkalmazásával végeztük el.

2.2.2 Az autotetraploid genotípusok szár-és gyökérnövekedésének fenotípezálása

A digitális képalkotásra alapozott fenotípezálás lehetővé tette, hogy a zöld és fehér pixelek számával jellemezzük a növényenkénti föld feletti illetve gyökér biomassza tömeget. A módszer részletes leírását a közleményünk adja (Dudits et al. 2016) Így lehetővé vált a növekedési ütem összehasonlítása az egyes genotípusok esetében.

2.3. A *Salix viminalis* L. molekuláris citogenetikai vizsgálata

2.3.1. Citológiai preparátumkészítés

A mitózis metafázisában történő kromoszóma vizsgálatához a fű explantumokat fényszobában 25°C-on hormonmentes MS táptalajon gyökeresítettük. A friss, 1-1,5 cm-es gyökerekkel rendelkező növénykéket 4°C-on 4 napig hidegszobában tároltuk. Ezt követően szobahőmérsékleten fényszobába helyeztük 22 órára. A fű növénykékről ekkor 1-1,5 cm hosszúságú gyökereket izoláltunk, majd Carnoy oldatban (etil alkohol és ecetsav 3:1 arányú keveréke) fixáltuk. A gyökerek sejtfalának emésztése során 1%-os sejtfalbontó enzimbombinációt alkalmaztunk, amely 0,33% pektináz, 0,33% pektoláz és 0,33% citohelikáz enzimet tartalmazott. Az emésztést követően az enzimet steril vizes mosás után a gyökércsúcsot levágtuk és 45%-os ecetsavban, tárgylemezen fedőlemez alatt szétnyomtuk. A fedőlemez folyékony nitrogénben történő fagyasztás után eltávolítottuk. A citológiai preparátumon lévő kromoszómákat DAPI festést követően Olympus FV1000 konfokális mikroszkóppal detektáltuk.

2.3.2. A *Salix viminalis* L. kromoszómák kariotipizálása FISH módszerrel és az alkalmazott DNS próbák jelölése

Kísérleteink során elsősorban *Triticeae* specifikus repetitív DNS szekvenciákat tartalmazó próbákat alkalmaztunk. A FISH során alkalmazott 9 repetitív DNS próba a következő volt: Afa family, GAA, HT100.3, pA11, pAs1, pSc119.2 pTa71, pTa794 és a ZCF1 DNS próba.

A DNS próbákat DIG-és Biotin Nick Transzlációs keverékkel jelöltük, majd anti-dig-rodamin és streptavidin-FITC antitesteket használtunk a jelek vizualizálásához. A különböző próbákat digoxigenin-16-dUTP-vel (Roche), biotin-11-dUTP-vel (Roche), illetve 50% biotin-11-dUTP-vel és 50% digoxigenin-16-dUTP-vel jelöltük nick transzlációval.

Az energiafüzre optimalizálva kisebb módosításokkal Linc *et al.* (1999; 2012) módszerét alkalmaztuk a fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) során.

2.4. Az alkalmazott statisztikai módszerek

A statisztikai elemzésekhez az R statisztikai elemző szoftvert (R Core Team; <https://www.R-project.org/>) használtuk. Az adatok eloszlását box-plot-tal (doboz ábra) és whisker plot-tal szemléltettük (Spitzer et al. 2014). Az ábrákat webes eszközzel a BoxPlotR (<http://boxplot.tyerslab.com/>) és a CorelDraw Graphics Suite X7 programok segítségével készítettük el.

3. AZ EREDMÉNYEK

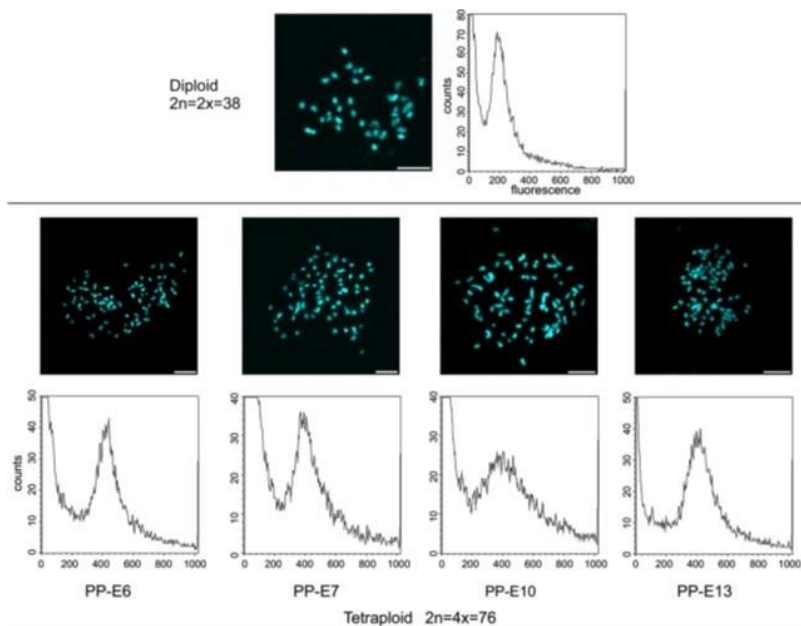
3.1. A *Salix viminalis* „ENERGO” fajta autotetraploid változatainak előállítására és azonosítása a gyökérszövetek áramlási citometria görbéinek kiértékelésével, illetve a metafázisos kromoszómák száma alapján

Az axilláris merisztémák sejtjeinek mitózist a kolhicin vegyület gátolta, ami a kromoszómák számának megduplázódásához vezetett. A kezelt rügyekből kinőtt hajtásokat visszavágtuk és újra gyökeresítettük.

A kétszeres DNS tartalmú PP-E (Poli Plusz „ENERGO”) növényeket először flow citometriával válogattuk ki, majd a kromoszómák tényleges számát a füzre optimalizált citológiai protokoll alkalmazásával határoztuk meg (1. ábra).

A korai fejlődési stádiumban lévő tetraploid jelölt növények gyökérszövetéből áramlási citometria alkalmazásával elvégeztük az egyedek ploidszintjének vizsgálatát. Az áramlási citometria hisztogramja szignifikáns eltérést mutatott a kontrol (diploid) és a tetraploid jelölt növények eredményében. Az eljárás során a görbe csúcsának eltolódásával összehasonlíthatóvá vált a különböző vizsgált egyedek DNS tartalma és a sejtmag mérete. A görbe csúcsának a horizontális tengelyen a magasabb érték felé történő elmozdulása a megnövekedett DNS tartalmat és a nagyobb sejtmag méretet mutatja, amely alapján kiszűrhetők a poliploid növényanyagok. Az áramlási citometria eredményeit megerősítette a kromoszómaszámolás eredménye is, amelyhez fluoreszcens mikroszkópot használtunk.

A diploid „ENERGO” növények gyökérszövetjeiben $2n=2x=38$, míg a tetraploid növények sejtjeiben $2n=4x=76$ kromoszómát lehetett megszámolni. Tizenhat különböző autotetraploid vonalat sikerült azonosítanunk a füzre optimalizált és kidolgozott eljárással.



1. ábra: A diploid ($2n=2x=38$) és PP-E ($2n=4x=76$) autotetraploid fű genotípusok azonosítása kromoszómaszám meghatározással (DAPI festés alkalmazásával) és relatív DNS tartalmuk analízise áramlási citometria méréssel (propidium-jodid alkalmazásával).

3.1.2. Az előállított autotetraploid fű genotípusok főbb morfológiai bélyegeinek jellemzése

A poliploidizáció hatására bekövetkezett jelentős funkcionális és alakítási változások között említhetők a nagyobb levélméret, továbbá a szár megvastagodása, valamint a gyökér rendszer megnagyobbodása.

3.1.2.1. A genom méret megduplázásának hatása a levél fejlődésére

A több független autotetraploid energiafűz vonal átfogó jellemzése során megállapítható, hogy a genom méret megduplázása következményeként nagymértékben megváltozott a levelek szerkezete és funkciója is. A Poli Plusz (PP) autotetraploid fűz növények levelei a diploid növények leveleinél szélesebbek, és levélfelületük is nagyobb, azonban a levelek hosszúsága az egyes genotípusokban igen változatos, néhol mérsékelt csökkenést is mutatott a diploid vonalhoz képest. A PP-E tetraploid genotípusok nagyobb méretű levelei jobb fényhasznosítási hatékonyságuknak köszönhetően hozzávetőlegesen kétszeres mennyiségben fixálták a széndioxidot egységnyi levélfelületen.

Ezzel együtt a megnövekedett fotoszintetikus asszimiláció során nagyobb a szerves anyag felhalmozódás mértéke is, amely kedvező hatással van a biomaszra hozam növelésére, például a fahozamra. A levelek citológiai analízise során sejtszintű módosulások is kimutathatók voltak. A tetraploid paliszád parenchima sejtek 50%-kal haladták meg a diploid sejtek méretét, amelyeket a keresztmetszet területének mérése alapján sikerült azonosítani. A megnövekedett sejt méret miatt kevesebb sejt található egységnyi távolságra (100 μm) a parenchima réteg mentén.

3.1.2.2. A genom méret megduplázásának hatásai a szár fejlődésére

A hajtások növekedésének intenzitását az elsődleges és másodlagos növekedés vizsgálatával jellemeztük. A tetraploid genotípusok növekedési erélye különböző mértékű volt a diploid genotípushoz képest. A PP-E2 vonal növényei gyorsabb, míg a PPE-13 vonal növényei lassabb zöld tömeg növekedést produkáltak, mint a diploid „ENERGO” növények. A diploidok szárhosszúságának magasabb átlaga jelentős különbséget mutatott a tetraploidok alacsonyabb átlag eredményeivel szemben. A szár átmérőjének megvastagodása mindazonáltal szembetűnő volt a tetraploid genotípusok esetében.

A tetraploid fűz növények megvastagodott szár átmérője egy olyan anatómiai változás, amely feltehetően a megduplázódott genom méret következményeként alakult ki. A tetraploid fűz genotípusok vesszőinek keresztmetszeteiben kimutatható az elsődleges és másodlagos xilem gyűrűk szignifikáns növekedése és a vastagabb kéreg fejlesztése a diploid genotípushoz képest.

3.1.2.3. A genom méret megduplázásának hatásai a gyökérrendszer fejlődésére

A diploid és tetraploid genotípus közti különbségeket az összegzett fehér pixelek számának kiértékelésével határoztuk meg. Az alkalmazott fenotípzálási technológia, amikor a plexi hengerekben nevelt növények gyökereiről csak külső digitális képeket tudunk készíteni a növekvő fehér pixel számokkal nem fejezhető ki az egész gyökér biomaszra mennyisége. Azonban ez a megközelítés a genotípusok gyökérnövekedési rátája közti különbségek kimutatására sikerrel alkalmazható. A gyökérfejlődés első három hetében a rügyes tetraploid genotípusú dugványok jelentősen magasabb gyökér denzitással rendelkeztek diploid társaikénál. A gyökér denzitásának mérési eredményei részleges információt adnak a gyökér biomaszra hozamról a fejlődés korai időszakában.

A hét hetes növekedési időszak után az autotetraploid fűz növények fejlettebb gyökérrendszerüknek köszönhetően nagyobb nedves gyökértömeggel rendelkeztek a diploid növényekkel szemben.

Azonban a száraz gyökértömeg mérési eredményéből megállapítható, hogy a diploid és tetraploid genotípusok közötti szignifikáns differencia kevésbé hangsúlyos, amelyet feltehetően a különböző nedvességtartalom okozott. A gyökerek keresztmetszetének vizsgálatakor szintén kimutatható volt a szignifikáns differencia a diploid és tetraploid gyökerek anatómiájában. A megduplázódott genommérettel rendelkező növényekben nagyobb gyökérkortex sejtek találhatók.

3.2. A *Salix viminalis* L. kromoszómáinak kariotipizálása molekuláris citogenetikai módszerrel

A fűz genomjának genetikai térképezése mellett a faj kromoszóma készletének jellemzése, az egyes kromoszómák citológiai azonosítása még nem történt meg. Ezért a jelen munkánkban az általánosan használt FISH protokollt fűzre optimalizáltuk és alkalmaztuk a különböző kromoszómák elkülönítésére.

3.2.1. A *Salix viminalis* L. kromoszómák részleges kariotípus meghatározása a fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) során alkalmazott heterológ DNS próbákkal

A fluoreszcens *in situ* hibridizációs (FISH) protokoll alkalmazásával egy új megközelítés került bemutatásra, amely lehetővé tette az energiafűz genom részleges kariotipizálását a heterológ DNS klónok felhasználásával. A különböző, alkalmazott DNS próbák a pSc119.2, a pTa71, a pTa794, a pAs1, az Afa-family, a pA11, a HT100.3, a ZCF1 és a GAA mikroszatellit markerek voltak. A kilenc próbából három mutatott egyértelműen detektálható jelet a fűz metafázisos kromoszómáin. A pTa71 próba FISH mintázata egy nagyobb 18S-5.8S-26S rDNS lókuszt az egyik kromoszómapárjának rövid karján volt felfedezhető, azonban a pTa794 rDNS jel nem volt látható. A HT100.3 teloméra specifikus DNS klón jól kivehető jelet mutatott a centroméra régiójában. A pAs1 FISH jelet két kromoszómapáron azonosítottuk. A jelen kutatásunk az első olyan tanulmány, amelyben bemutathatjuk két kromoszómapár pAs1 FISH mintázatát a fásszárú fajok között.

3.3. Új tudományos eredmények

1. A fűz aktivált oldalrügyeinek kolhicin kezelését követően flow citometriával, illetve kromoszómaszámlálással azonosítottunk 16 független autotetraploid vonalat (Poli Plusz „ENERGO” variánsok). Ezek felszaporítása először *in vitro* történt, majd a részletes jellemzésüket talajba történő kiültetés után üvegházi körülmények között végeztük.
2. Digitális fenotipizálási rendszer segítségével jellemeztük az egyes genotípusok növekedési paramétereit és azonosítottunk nagyobb növekedési rátával rendelkező tetraploid vonalakat a diploid változathoz viszonyítva.
3. Kimutattuk, hogy az autotetraploid növények nagyobb levelekkel és parenchima sejtekkel rendelkeznek, valamint egységnyi levélfelületen több CO₂-ot fixálnak, mint a diploid növények.
4. A tetraploid genotípusok növényeinek mind a zöld hajtásai, mind a fás szárai alacsonyabbak, de nagyobb hajtás és szár átmérővel rendelkeznek a diploid kiindulási fajta növényeihez viszonyítva.
5. A Poli Plusz genotípusok gyökérszete nagyobb, mint a diploid fajta növényei esetében.
6. Egy új citológiai módszert dolgoztunk ki az energiafűz (*Salix viminalis* L.) kromoszómaszámának meghatározásához.
7. Heterológ, nem specifikus DNS próbák alkalmazásával meghatároztuk a *Salix viminalis* L. „ENERGO” fajta kromoszómáinak részleges kariotípusát, és leírtunk két feltételezett kromoszómapárt.

4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

4.1. A megduplázott genommérettel rendelkező energiafűz változatok azonosítása

A kolhicinnel kezelt rügyekből regenerált magoncok jól jellemezhető változást mutattak a levél és a gyökér morfológiájában már az *in vitro* tenyészetekben is. A szélesebb, kerekded levelek és a vastagabb gyökérzet korai markerként szolgálhat a poliploid egyedek szelekciójában, amelyet a kromoszómaszám meghatározás és az áramlási citometria eredményei is megerősítettek.

A jelenlegi EU direktíva szerint a kromoszómaszám megsokszorozási technikája nem minősül GMO eljárásnak. Ezért ez a biomassa hozamot növelő módszer alkalmazható minden olyan országban vagy régióban, ahol a transzgénikus növények termesztését törvénnyel tiltják, annak ellenére, hogy génbeépítéssel biztonságosan javíthatók a növények biológiai teljesítőképessége.

4.2. Az autotetraploidia hatása az elsődleges és másodlagos növekedésre

Az autopoliploidizáció következményeként több tetraploid fűz genotípus mutatta a szárátmérő megvastagodásával együtt járó szárhosszúság csökkenést. A nagyobb levéltömeg következtében a tetraploidok zöld biomassa hozama nagyobb, mint a diploid változatoké. A fás hajtások tömegének további növelése érdekében indokolt a triploid változatok előállítása. Az itt bemutatott tetraploid változatok nemesítési értékét az adja, hogy keresztezési partnerként szolgálnak a diploid \times tetraploid kombinációkban.

A tetraploid genotípusok várható hasznosítása nem a rövid vágásfordulójú ültetvényekben lesz, hanem inkább közvetlenül hasznosíthatók a hengeres fa előállításban.

4.3. A fűz genom megduplázásának közvetlen hatása a levélzetre és a biomassza hozam növelésére

A több független autotetraploid energiafűz vonal átfogó jellemzése során megállapítható, hogy a genomméret változásának következményeként lényegesen megváltozott a levelek szerkezete és funkciója.

Az autotetraploid fűz növények nagyobb levélfelülete kétszerannyi CO₂-ot képes megkötni. A megemelkedett széndioxid fixáció, és a tökéletesített fotoszintetikus hatékonyság felhívhatja a figyelmet arra, hogy a poliploid energiafűz variánsokra alapozott rövid vágásfordulójú energia ültetvények jelentős szereppel bírhatnak a klímaváltozás negatív hatásainak csökkentésében. Az ilyen ültetvények kedvező hatásait növeli, hogy mind a zöld mind a fás fűz biomassza alkalmas biogáz előállítására.

4.4. Az autotetraploid energiafűz genommérete és a megnövekedett gyökérrendszer kapcsolata

A megnövekedett gyökértömeg figyelemre méltó, amely a méregtelenítési hatékonyságot javíthatja, ezáltal a tetraploid genotípusok alkalmasabbak lehetnek a nehézfémekkel szennyezett talajok bioremediációjára.

A Poli Plusz „ENERGO” tenyésztésanyagok hasznosítása azonban csak abban az esetben lehetséges, ha az egyes változatok a felszaporításuk és értékelésük után bekerülnek a fajtaminősítési rendszerbe. A tetraploid vonalak DUS vizsgálata megkezdődött.

4.5. Az energiafűz molekuláris citológiai jellemzése és részleges kariotipizálása

A magas biomassza hozam elérésére irányuló nemesítésben a fűz molekuláris genetikáját illetően kevés a rendelkezésre álló ismeretanyag, amely kombinálható lehet a genetikai kapcsoltsági térképezéssel. A jelen értekezésben a fluoreszcens *in situ* hibridizációs (FISH) protokoll alkalmazásával egy új megközelítés került bemutatásra, amely lehetővé tette az energiafűz genom összetételének citogenetikai vizsgálatát a heterológ DNS klónok felhasználásával.

A további kísérletek során a fűz kromoszómakészlet FISH mintázatának jellemzése lehet az alapja a fűz fajok kariotipizálásának és szükségessé válik a *S. viminalis* genomjából fajspecifikus DNS klónok izolálása, valamint ezek felhasználása, amely miatt fontos lesz a FISH technológia ismételt optimalizálása is.

5. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓS TEVÉKENYSÉG

Nemzetközi lapokban megjelent, impakt faktoral rendelkező tudományos cikkek (IF, angol nyelvű):

Dénes Dudits, Katalin Török, András Cseri, Kenny Paul, **Anna V. Nagy**, Bettina Nagy, László Sass, Györgyi Ferenc, Radomira Vankova, Petre Dobrev, Imre Vass and Ferhan Ayaydin (2016): Response of organ structure and physiology to autotetraploidization in early development of energy willow *Salix viminalis* L. Plant Physiology 2016, Vol. 170, pp.1504-1523, Impact Factor: 6.456

Németh A.V., Dudits D., Molnár-Láng M., Linc G. (2013): Molecular cytogenetic characterisation of *Salix viminalis* L. using repetitive DNA sequences. Journal of Applied Genetics. 2013 Aug;54(3):265-9. doi: 10.1007/s13353-013-0153-1. Epub 2013 May 30. Impact Factor: 2.03

Hazai tudományos lapokban megjelent, impakt faktoral nem rendelkező tudományos cikkek (nem IF, magyar nyelvű):

Dudits Dénes és **Nagy Anna Viktória** (2017): A fás szárú energianövények nemesítése hagyományos és géntechnológiai módszerekkel. Növénytermelés. Crop Production. 66. évfolyam, 1. szám (2017 március), 97-118

Egyéb:

Konferencia kiadványok (magyar nyelvű):

Németh Anna Viktória, Linc Gabriella, Lángné Molnár Márta, Dudits Dénes: A *Salix viminalis* L. molekuláris citogenetikai elemzése fluoreszcens *in situ* hibridizációval. p:112, XVIII. Növénytermelési Tudományos Napok, 2012. március 6. Budapest (Szerk.: Veisz Ottó), ISBN: 978-963-8351-38-8

Poszter (magyar nyelvű):

Németh Anna Viktória, Linc Gabriella, Lángné Molnár Márta, Dudits Dénes: A *Salix viminalis* L. molekuláris citogenetikai elemzése fluoreszcens *in situ* hibridizációval. p:20, MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont Srtaub Napok, 2012. május 23-24. Szeged (Felelős kiadó: Páy Anikó), TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0012 projekt

6. IRODALOMJEGYZÉK

CSIPKÉS M. (2011): Egyes energia-növények gazdasági elemzése, valamint hatásuk a föld használatra. In: *Doktori (PhD) értekezés. Debreceni Egyetem Agrár- és Gazdálkodás tudományok Centruma Gazdálkodástudományi és Vidékfejlesztési Kar. Debrecen.*

DUDITS, D., TÖRÖK, K., CSERI, A., PAUL, K., NAGY, A. V., NAGY, B., SASS, L., FERENC, G., VANKOVA, R., DOBREV, P., VASS, I., AYAYDIN, F. (2016): Response of Organ Structure and Physiology to Autotetraploidization in Early Development of Energy Willow *Salix viminalis*. In: *Plant Physiology* (170) 3: 1504–1523. p.

DUDITS D. ÉS NAGY A.V. (2017): A fás szárú energianövények nemesítése hagyományos és géntechnológiai módszerekkel. In: *Növénytermelés. Crop Production*. 66. évfolyam, 1. szám (2017 március), 97-118

FRANSZ, P.F., ALONSO-BLANCO, C., LIHARSKA, T.B., PEETERS, A.J.M., ZABEL, P., DE JONG, J.H. (1996): High-resolution physical mapping in *Arabidopsis thaliana* and tomato by fluorescence *in situ* hybridization to extended DNA fibres. In: *Plant J.* 9:421–430

GALBRAITH, D.W., HARKINS, K.R., MADDOX, J.M., AYRES, N.M., SHARMA, D.P., FIROOZABADY, E. (1983): Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. In: *Science*. 220: 1049–1051

GYURICZA CS., KOVÁCS G. P., BALLA I., JUNEK, N. (2012): Fás szárú energianövények termesztése és ökológiai hatásai. In: *Tudomány – Megújuló energiaforrások. Mezőgazdasági Technika.* (12) 2–5.

LINC, G., FRIEBE, B.R., KYNAST, R.G., MOLNÁR-LÁNG, M., KÖSZEGI, B., SUTKA, J., GILL, B.S. (1999): Molecular cytogenetic analysis of *Aegilops cylindrica* host. In: *Genome*. 42:497–503

LINC, G., SEPSI, A., MOLNÁR-LÁNG, M. (2012): A FISH karyotype to study chromosome polymorphisms for the *Elytrigia elongata* E genome. In: *Cytogenet Genome Res.* 136:138–144

NÉMETH, A.V., DUDITS, D., MOLNÁR-LÁNG M., LINC, G. (2013): Molecular cytogenetic characterisation of *Salix viminalis* L. using repetitive DNA sequences. In: *Journal of Applied Genetics*. 2013 Aug;54(3):265-9. doi: 10.1007/s13353-013-0153-1. Epub 2013 May 30.

SASAKI, T., MATSUMOTO, T., YAMAMOTO, K. SAKATA, K., BABA, T., KATAYOSE, Y., WU, J., NIIMURA, Y., CHENG, Z., NAGAMURA, Y., ANTONIO, B.A., KANAMORI, H., HOSOKAWA, S., MASUKAWA, M., ARIKAWA, K., CHIDEN, Y., HAYASHI, M., OKAMOTO, M., ANDO, T., AOKI, H., ARITA, K., HAMADA, M., HARADA, C., HIJISHITA, S., HONDA, M., ICHIKAWA, Y., IDONUMA, A., IJIMA, M., IKEDA, M., IKENO, M., ITO, S., ITO, T., ITO, Y., ITO Y, IWABUCHI, A., KAMIYA, K., KARASAWA, W., KATAGIRI, S., KIKUTA, A., KOBAYASHI, N., KONO, I., MACHITA, K., MAEHARA, T., MIZUNO, H., MIZUBAYASHI, T., MUKAI, Y., NAGASAKI, H., NAKASHIMA, M., NAKAMA, Y., NAKAMICHI, Y., NAKAMURA, M., NAMIKI, N., NEGISHI, M., OHTA, I., ONO, N., SAJI, S., SAKAI, K., SHIBATA, M., SHIMOKAWA, T., SHOMURA, A., SONG, J., TAKAZAKI, Y., TERASAWA, K., TSUJI, K., WAKI, K., YAMAGATA, H., YAMANE, H., YOSHIKI, S., YOSHIHARA, R., YUKAWA, K., ZHONG, H., IWAMA, H., ENDO, T., ITO, H., HAHN, J.H., KIM, H.I., EUN, M.Y., YANO, M., JIANG, J., GOJOBORI, T. (2002): The genome sequence and structure of rice chromosome 1. In: *Nature*. 420:312–316

SPITZER, M., WILDENHAIN, J., RAPPSILBER, J., TYERS M. (2014): BoxPlotR: a web tool for generation of box plots. In: *Nat Methods*. 11: 121–122

VÁGVÖLGYI A. (2013): Fás szárú energetikai ültetvények helyzete Magyarországon napjainkig; üzemeltetésük, hasznosításuk alternatívái. In: *Doktori (PhD) értekezés. Nyugat-Magyarországi Egyetem Kitaibel Pál Környezettudományi Doktori Iskola*.

ZHONG X.B., FRANZ P.F., WENNEKES VAN EDEN, J., RAMANNA, M.S., VAN KAMMEN, A., ZABEL, P., DE JONG, H. (1998): FISH studies reveal the molecular and chromosomal organization of individual telomere domains in tomato. In: *Plant J*. 13:507–517