

**SZENT ISTVÁN
EGYETEM**

GÖDÖLLŐ

SZENT ISTVÁN EGYETEM

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

Doktori (PhD) értekezés

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

.....

Dr. Helyes Lajos

Az iskolavezető jóváhagyása

.....

Prof. Dr. Dudits Dénes

A témavezető jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK.....	3
JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	6
1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS.....	8
1.1. Bevezetés.....	8
1.1.2. A téma aktualitása és jelentősége: A megújuló energianövények szerepe az Európai Unió és Magyarország energiagazdálkodásában.....	8
1.2. Célkitűzés	11
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	12
2.1. A fűz, mint rövid vágásfordulójú fás szárú energianövény taxonómiai jellemzése, botanikája, ökológiai igénye, Magyarországon termesztett fajtái és klónjai	12
2.1.1 A <i>Salix</i> nemzetség taxonómiája	12
2.1.2. A fűz (<i>Salix sp.</i>) fajok botanikai jellemzői	13
2.1.3. A fűz (<i>Salix sp.</i>) fajok ökológiai igénye	14
2.1.4. A rövid vágásfordulójú fűz, mint fás szárú energianövény Magyarországon termesztett fajtái és klónjai	15
2.2. A rövid vágásfordulójú fás szárú energianövények termesztéstechnológiája .	15
2.3. A rövid vágásfordulójú fás szárú energianövények biomassza hozama.....	18
2.4. A fás szárú fajok nemesítése klasszikus módszerekkel	19
2.4.1. Keresztezés, heterózis és szelekció	19
2.4.2. A genomméret megsokszorozásának típusai, módszerei és hatása a rövid vágásfordulójú fás szárú fajok esetében (nyár, császárfűz, akác).....	20
2.4.2.1. A természetes kereszteződésekkel származó allopoloid változatok....	20
2.4.2.2. Az autotetraploidizáció módszerei a rövid vágásfordulójú fajok esetében.....	22
2.4.2.3. A rövid vágásfordulójú fajok autotetraploid változatainak főbb morfológiai és produkciós jellemzői	23
2.4.3. A hagyományos és irányított mutagenézissel létrehozott genetikai variabilitás hasznosítása a fajok nemesítésében	24
2.5. Molekuláris módszerek a kutatás és nemesítés szolgálatában	25
2.5.1. A fás szárú energianövények nemesítése molekuláris markerekkel	26
2.5.2. Transzgenikus módszerek alkalmazása a fás szárú energianövények nemesítésében	27
2.5.3. A genomszerkesztési módszerekkel végzett célzott mutagenézis és precíziós nemesítés.....	30
2.5.4. A rövid vágásfordulójú fás szárú fajok molekuláris citogenetikai vizsgálata FISH módszerrel	32

2.5.5. A <i>Salix viminalis</i> L. molekuláris citogenetikai vizsgálata során alkalmazott marker DNS próbák jellemzése	33
3. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	34
3.1. A kísérleti alapanyag és fajta kiválasztása	34
3.2. A dugványok tárolása, előkészítése és üvegházi kísérleti körülmények beállítása	34
3.3. Tetraploid fűz vonalak előállítása az oldalhajtások rügyeinek kolchicin kezelésével	34
3.3.1. A genomméret meghatározása különböző módszerekkel	35
3.3.1.1. Ploidszint meghatározása áramlási citometria alkalmazásával	35
3.3.1.2. A tetraploid jelleg meghatározása citogenetikai vizsgálattal	36
3.4. A tetraploid genotípusok üvegházi és szántóföldi körülményekhez történő adaptálása és felszaporítása.....	36
3.5. Az autotetraploid genotípusok szár-és gyökérnövekedésének fenotipizálása.	37
3.6. A tetraploid genotípusok CO ₂ fixációjának mérése.....	39
3.7. Az alkalmazott statisztikai módszerek.....	39
3.8. A <i>Salix viminalis</i> L. molekuláris citogenetikai vizsgálata	40
3.8.1. Citológiai preparátumkészítés.....	40
3.8.2. A <i>Salix viminalis</i> L. kromoszómák kariotipizálása FISH módszerrel	41
3.8.2.1. Az alkalmazott DNS próbák jelölése	41
3.8.2.2. A fluoreszcens <i>in situ</i> hibridizáció (FISH).....	42
4. EREDMÉNYEK.....	44
4.1 A <i>Salix viminalis</i> „ENERGO” fajta autotetraploid változatainak előállítása ..	44
4.1.1. A diploid és tetraploid fűz genotípusok azonosítása a gyökérsejtek áramlási citometria görbéinek kiértékelésével	45
4.1.2. Az energiafűz növények genomméretének meghatározása a metafázisos kromoszómák száma alapján.....	46
4.1.3. Az előállított autotetraploid fűz genotípusok főbb morfológiai bélyegeinek jellemzése	49
4.1.3.1. A genomméret megduplázásnak hatásai a levél fejlődésére	49
4.1.3.2. A genomméret megduplázásának hatásai a szár fejlődésére.....	53
4.1.3.3. A genomméret megduplázásának hatásai a gyökérrendszer fejlődésére	57
4.2. A <i>Salix viminalis</i> L. kromoszómáinak kariotipizálása molekuláris citogenetikai módszerrel.....	60
4.2.1. A <i>Salix viminalis</i> L. kromoszómák részleges kariotípus meghatározása a fluoreszcens <i>in situ</i> hibridizáció (FISH) során alkalmazott heterológ DNS próbákkal.....	61
5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK.....	66

5.1. A megduplázott genommérettel rendelkező energiafűz változatok azonosítása	66
5.1.1. Az autotetraploidia hatása az elsődleges és másodlagos növekedésre	66
5.1.2. A fűz genom megduplázásának közvetlen hatása a levélzetre és a biomassza hozam növelésére	68
5.1.3. Az autotetraploid energiafűz genommérete és a megnövekedett gyökérrendszer kapcsolata.....	69
5.2. Az energiafűz molekuláris citológiai jellemzése és részleges kariotipizálása	69
6. ÖSSZEFOGLALÁS.....	71
7. SUMMARY.....	73
8. MELLÉKLETEK.....	75
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	90

JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism

ARGOS – Auxin-Regulated Gene Involved in Organ Size

BAC – Bacterial Artificial Chromosome

bp – bázispár

biotin – biotin-11-dUTP

Cas9 – CRISPR associated protein 9

cDNS – kópia DNS

CO₂ – szén-dioxid

CRISPR – Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

DAPI – 4',6'-diamidino-2-fenilindol

digoxigenin – digoxigenin-16-dUTP

DNS – Deoxyribonucleic acid, dezoxiribonukleinsav

DREB – Dehydration-Responsive Element Binding

EEA – European Environment Agency

EMS – etil-metán-szulfonát

ETS – External Transcribed Spacer

FISH – fluoreszcens *in situ* hibridizáció

FITC – fluoreszcein-5-izotiocianát

GM – génmódosított

GMO – génmódosított organizmus

GOP – Gazdasági Operatív Program

GSH – glutation

het-ITSs – heterokromatikus intrakromoszómális telomerikus szekvenciák
(heterochromatic Intrachromosomal or interstitial Telomeric Sequences)

HSD – honestly significant difference

ITSs – intrakromoszómális telomerikus szekvenciák (Intrachromosomal or interstitial
Telomeric Sequences)

Kb – kilobázis

LBD1 – LOB domain-containing protein 1

MAB – markerekre alapozott visszakeresztezés (Marker Assisted Backcrossing)

MAS – markerekre alapozott szelekció (Marker Assisted Selection)

MJ – mega Joule

Mt – millió tonna

PJ– peta Joule
PnARGOS-LIKE – *Populus nigra* auxin-regulated gene involved in organ size
PP-E – PoliPlusz ENERGO
PVC – poli-vinil-klorid (poly-vinil-chloride)
QTL – mennyiségi jelleget meghatározó lókuszok (quantitative trait loci)
RAPD – Randomly Amplified Polymorphic DNA
rbcL – Ribulose biphosphate carboxylase large chain
rDNS – riboszómális DNS
RNS – ribonukleinsav
SCAR – Sequence Characterized Amplified Region
SDS – nátrium-dodecil-szulfát
SNP – egyetlen nukleotid polimorfizmus (Single Nucleotide Polymorphism)
SSC – trinátrium-citrát és nátrium-klorid oldat keveréke (saline-sodium citrate)
SSR – egyszerű szekvenciaismétlődés (Simple Sequence Repeats)
SRAP – Sequence Related Amplified Polymorphism
TALENs – Transcription Activator-Like Effector Nucleases
TILLING – Targeting Induced Local Lesion in Genomes
TNB – trisz-NaCl blokkoló puffer
TRIS – trisz -(hidroxi-metil)-amino-metán
t_{sza} – tonna szárazanyag
TWEEN – polioxietilén-szorbitán-monolaurát
U – egység (unit)
UV – ultraviola
ZAR1 – *Zea mays* ARGOS
ZFN – Zinc-finger nucleases, cink-ujj nukleáz
4CL – 4-coumarate:CoA ligase

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

1.1. Bevezetés

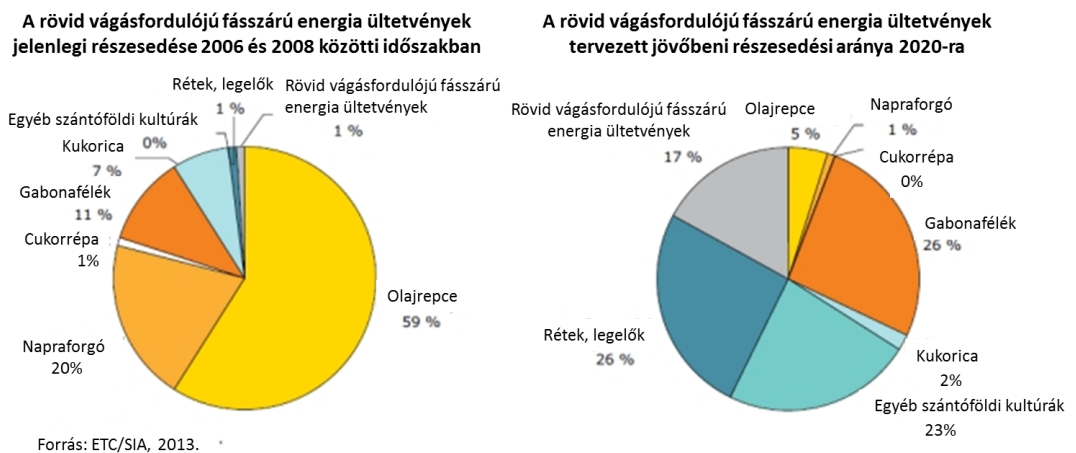
Az elmúlt évtizedekben világszerte és hazánkban is a megújuló energiaforrások iránti növekvő igényeknek köszönhetően egyre jobban előtérbe került az energianövények, így a rövid vágásfordulójú fafajok termesztése is. Az energetikai céllal telepített ültetvények biomasszája akár zöld, akár fa alapanyagként energia forrásként szolgálhat a különböző iparágak számára. Az energianövények jó alkalmazkodóképességüknek, gyors növekedési ütemüknek és a gyengébb minőségű talajjal szembeni toleranciájuknak köszönhetően sikerrel termeszthetők 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.

1.1.2. A téma aktualitása és jelentősége: A megújuló energianövények szerepe az Európai Unió és Magyarország energiagazdálkodásában

Az Európai Unióban a biomassza és a megújuló energiaforrások iránti egyre növekvő igények az Európai Energia Unió stratégiájában megfogalmazott energiahatékonysági célkitűzésekkel és a megújuló energiaforrások európai részesedésének növelésével elégíthetők ki hosszú távon (Lizakova 2018). Az EU-ban a mezőgazdaság és az erdőgazdálkodás mellett a hulladék, halászat és akvakultúra a legfontosabb biomassza források (Lizakova 2018). Az EU földterületének felét a mezőgazdasági területek adják, amelyből az éves teljes biomassza hozam 2006-2015 között elérte a 956 millió tonna szárazanyag tartalmat (García-Condado et al. 2017). Ebből az elsődleges termékek formájában előállított biomassza 54%-ot, a másodlagos, vagyis fennmaradó 46%-ot tett ki, utóbbi aránya enyhe növekedést mutatott az 1998 és 2015 közötti időszakban (Lizakova 2018). Az EU erdőterülete 2015-ben a teljes földterületének 34%-át fedte le, vagyis 161 millió hektárt, amelynek 84%-án folyt erdőgazdálkodás (Camia et al. 2018). Az erdők becsült teljes biomassza hozama 2013-ban 18600 Mt szárazanyag volt, de ha csak a föld feletti

részét tekintjük, úgy 16000 Mt, amelyet 10900 Mt a szálfa és 5100 Mt egyéb fás rész teszi ki (Camia et al. 2018). A legtöbb erdőgazdálkodásból származó biomasszát Közép-Nyugat-Európa (36%), Észak-Európa és Közép-Kelet-Európa régiói adják. 2000 óta a föld feletti biomassza készlet az EU erdőiben átlagosan 223 millió tonnával emelkedett évente, amely aránya évi 1,3%-os növekedést jelent. Ez a növekedés kulcsfontosságú a klímaváltozás mérséklése érdekében, mivel az erdők jelentős mennyiségű széndioxid megkötésére képesek (Camia et al. 2018). Az EU-ban a teljes fa hozamból származó biomassza termelés közel fele (48%) hasznosul energia felhasználás céljából (Lizakova 2018).

Az EU 2007-ben elfogadott klímapolitikájának egyik fő törekvése, hogy a tagállamok 2020-ig 20%-kal csökkentsék az üvegházhatású gázok kibocsátását és ugyanilyen arányban növeljék a megújuló energiaforrások felhasználását. Az Európai Energia Ügynökség (EEA) 2008-as jelentése szerint a termesztett energianövények közül a rövid vágásfordulójú fás szárú energiaültetvények aránya elenyésző, amit 2020-ig 1%-ról 17 %-ra terveznek növelni, míg bizonyos más energianövények részesedési arányát jelentősen csökkenteni (1. ábra) (EEA 2013).



1. ábra: A rövid vágásfordulójú fás szárú energia ültetvények részesedési aránya az EU múlt (2006 és 2008 közötti időszakban) és a tervezett, jövőbeni (2020) klímapolitikai stratégiájában (ETC/SIA, 2013)

Magyarországon a fosszilis tüzelőanyagok kimerülésével párhuzamosan egyre inkább előtérbe kerülnek a földgáz (14,2%), a nukleáris (40,4%) és a megújuló energiahordozók (21,5%) iránti megnövekedett igények. 2015-ös adatok szerint hazánk energiatermelése 472,7 PJ (peta Joule) volt, ezzel szemben az ország teljes

energiafelhasználása 1000-1100 PJ között alakult, melynek következtében a megnövekedett energiaigények kielégítésére 756,3 PJ energia importálása vált szükségessé. A 2016-os évben a rendelkezésre álló energia 30,5%-át a lakosság, 26,5%-át a közlekedés, 24,9%-át az ipar, 14,3%-át a kereskedelem és egyéb közcélú szolgáltatások, 3,7%-át pedig a mezőgazdaság, erdőgazdálkodás és a halászat használta fel (Antal 2018). A 2013. évi adatok szerint Magyarország összes energiafelhasználásának 9,8%-át biztosították megújuló energiahordozókból, azonban a kormányzat klímapolitikai szándékai szerint a 2020-ig az elérendő célérték 13%.

Hazánkban a hasznosításra kerülő megújuló energiaforrások közül a legnagyobb jelentősége a biomasszának van, amely 65-80%-os aránnyal bír. A fás szárú energiaültvényeken megtermelt biomassa 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 ültvények telepítése (Gyuricza et al. 2012).

Hazánk összes biomassa készlete 350-360 millió tonna. A biomassa nagy részét a faalapú biomassa képezi, ami magában foglalja a fás energiaültvények mellett az erdőgazdálkodásból származó szilárd biomasszát is (Vágvölgyi 2013). Magyarországon az energiatermelés céljából létrehozott ültvényekben 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 ültvények jelentősége is (Dudits és Nagy 2017).

1.2. Célkitűzés

Célkitűzéseink között szerepelt:

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 biomassza produktummal és a jobb agronómiai, illetve energetikai jellemzőkkel rendelkező populációk energiaültetvényekben történő hasznosításában. Emellett értékes alapanyagot szolgáltat 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 és a genom részletes szerkezete, illetve az ismétlődő DNS szekvenciák fizikai elhelyezkedése még nem ismert. A faj részletes molekuláris citogenetikai elemzése és a kromoszómális jellemzők átfogó vizsgálata elősegíti, valamint 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 kombinációkban teszteltük és az így kapott *in situ* hibridizációs mintázat alapján összeállítottuk a *Salix viminalis* L. kariotípusának főbb elemeit.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A fűz, mint rövid vágásfordulójú fás szárú energianövény taxonómiai jellemzése, botanikája, ökológiai igénye, Magyarországon termesztett fajtái és klónjai

2.1.1 A *Salix* nemzetség taxonómiája

A *Salix* nemzetség taxonómiájára különböző megközelítések és rendszerek már korábban leírásra kerültek, amelyeket Treerné Windisch (2014) tanulmányában foglalt össze. A hagyományos taxonómiai besorolás a *Salix* nemzetséget Ehrendorfer (1991) rendszere szerint Borhidi (1998) után a zárvatermők törzsén (*Angiospermatophyta*) belül a kétszikűek osztályába (*Dicotyledonopsida*), a dilléniaalkatúak alosztályba (*Dilleniidae*), és a fűzvirágúak (*Salicales*) rendjébe tartozónak tekinti. A fűzfafélék családja (*Salicaceae*) a rend egyetlen családja, amelybe a *Salix* nemzetség mellett még a *Populus* (nyár) és a *Chosenia* nemzetség tartozik (Rehder 1951). A *Salicaceae* családba Frank (2008) szerint 350-400 faj tartozik, és közel 40 *Populus* faj ismert. Más források 200, 300 és 500 fa- és cserjefajt említenek, amelyek többsége az északi mérsékelt övön Európa, Kanada, Japán, Amerikai Egyesült Államok területén terjedt el (Treerné Windisch, 2014). A nagyfokú hibridizáció miatt a fűz fajok elhatárolása nehéz, a család evolúciós értelemben még kevésbé stabilizálódott (Podani 2003). Az evolúció során a fás szárú növények közül a mérsékelt égövön a *Salix* nemzetségben alakult ki a legtöbb különböző életforma a törpecserjéjtől a nagy fáig. Az inter-és intraspecifikus hibridizáció az egyes fajok kialakulásában jelentős szerepet játszott, ahogy a kromoszómaszám-módosulás és a poliploidia is. A *Salix* nemzetségben az alap kromoszómaszám $n=19$, de az egyes fajok kromoszómaszámai a diploid genotípusoktól ($2n=2x=38$) a különböző poliploid genotípusokig, ($2n=4x=76$, $2n=6x=114$, $2n=8x=152$ vagy $2n=10x=190$) eltérőek lehetnek. A faji szintű taxonok elhatárolása a rendkívül diverz fűz nemzetségben a számos hibrid miatt nehéz. A nemzetséget 3 alnemzetségre és közel 30 szekcióra lehet bontani (Gencsi és Vancsura 1992). Az egy szekcióba tartozó fajok egymással gyakrabban hibridizálódnak, de előfordul különböző szekciókba tartozó fajok kereszteződése is. Számos megközelítést írtak le a fűzek csoportosítására, amelyek közül az egyszerűbb rendszerek az Európában honos fűzeket 3 fő csoportba, míg más rendszerek 4

csoporthoz osztva írják le, mely csoportokban akár rendszertanilag különböző szintű taxonok is keveredhetnek. (Treerné Windisch 2014).

Napjainkban is folyik a fűz fajok filogenetikai kutatása, amelyről különböző publikációk is megjelentek. Wu et al. (2015) 4648 bp-os szekvencia adatokból álló filogenetikai elemzéseket végzett négy kloroplasztiszból (*rbcL*, *trnD* –T, *matK* és *atpB–rbcL*), és két nukleáris markert (ETS és ITS) alkalmazott a kísérlete során. Megállapította a *Salix* alnemzetség para- és polifilogenetikai természetét a nukleáris és a kloroplasztisz DNS törzsfák alapján. Huang et al. (2017) a fűz és fűzfélék kloroplasztisz genomjával végzett molekuláris analízis segítségével végezte a fűzfélék filogenetikai vizsgálatát. Ez a megközelítés lehetővé tette a fűzfélék sikeres klímaadaptációjának mélyebb megértését.

2.1.2. A fűz (*Salix* sp.) fajok botanikai jellemzői

A *Salix* nemzetség levelei keskenyek, ép szélűek, szórt állásban helyezkednek el. A levélnyél rövid, sokszor pálhalevél is található. A pálhalevél lehet kicsi és lehulló, de nagy és maradó is. Rügyeik porzós vagy termős virágrügyeek, illetve levélrügyeek lehetnek. A hajtásrügyeek kisebb méretűek és az egyes fajokra kevésbé jellemzők (Treerné Windisch 2014). Egyivarú, kétlaki virágai vannak, amelyek barkaszerű virágzatba tömörülnek. A porzós virágzatban sok sűrűn elhelyezkedő virág található, míg a termős barkában a kevesebb virág ritkásabban helyezkedik el (Frank, 2008). A virágok a leveles vagy levél nélküli generatív törpehajtásokon, az előző évi vesszők középső rügyeiből fejlődnek. Lombfakadás előtt nyíló tömött felálló, vagy lombfakadás után nyíló laza bókoló füzérekben helyezkednek el. A *Salix* fajok részben rovar-, részben szélmegporzásúak lehetnek. A felsőállású termőben a placentáció parietális. A magvak a toktermésben 4-6 hét alatt érnek be. Általában szél útján terjednek (anemochoria), de vízközeli fajok esetében a víz is jelentősen hozzájárulhat a magvak terjesztéséhez (hydrochoria). A magokban hiányzik az endospermium, így csak néhány napig csíráképesek. A magok nedves körülmények között és fényen képesek csírázni (Treerné Windisch 2014). A természetes populációkban általában 4:1 a porzós- és termős egyedek aránya (Frank 2008). A fa kéreg eleinte sima, színe zöld vagy vöröses-zöld, amely később felrepedezik és hosszanti barázdák alakulnak ki rajta (Gyuricza 2010).

2.1.3. A fűz (*Salix sp.*) fajok ökológiai igénye

A *Salix* nemzetség a holarktikus flórabirodalom egyik jellemző fás nemzetsége. A fűz fajok többsége a Föld északi felén él. Pionír fajok, csak Új-Zélandon és Ausztráliában nem őshonosak, de a déli féltekén is található néhány fűz faj, főleg a tengerszint feletti magasabb területeken. Többségük jól tűri a magas vízállást és a nehéz öntéstalajokat, ezért főként folyók árterében alkotnak erdőket, cserjéseket (Treerné Windish 2014). Azonban nem tolerálja a hosszú időn keresztül pangó vizet, illetve az oxigénhiányos állapotot sem, ami miatt az állomány rövid idő után megritkul, majd kipusztul (Gyuricza 2014). A laza szerkezetű oxigéndús talajokat kedvelik, a tömör záróréteget viszont nem tolerálják. Telepítése rövid vágásfordulójú ültetvényként a mély fekvésű öntés, réti, kotu talajokra javasolt (Gyuricza 2010). Igényének azok a talajok felelnek meg elsősorban, ahol a talajvíz 1-3 méter mélységben található. Kedvezőek számára a mély termőrétegű mezőségi talajok is, azonban ezek a termőhelyek elsősorban az élelmiszer- és takarmánynövények termesztésére alkalmasak. A jó vízellátottságú barna erdőtalaj közepesen jó termőhely, de 6-8 %-nál nagyobb lejtésű területekre nem javasolt az állomány telepítése. Továbbá speciális igénye, hogy 400 méter tengerszint feletti magasság fölé ne kerüljön az ültetvény (Gyuricza 2014). Olyan talajokon is kerülendő a telepítése, amelyekben 1-2 méter mélységben, vagy fölötté mészkőpad, illetve egyéb áttörhetetlen záróréteg található. A humuszos homoktalajokon a kedvezőtlen vízellátottság gyenge állományok kialakulásához, illetve kipusztulásához vezet (Gyuricza 2010). A megfelelő vízellátottság és a kedvező fényviszonyok megteremtése tehát kiemelkedően fontos, mivel a fűz nem tolerálja a félárnyékos-árnyékos területeket, emiatt közvetlen erdőállományok közelébe nem javasolt az ültetése. A melegkedvelő fatermetű fajok (*Salix alba*) jól növekednek a mérsékelt égöv enyhébb tájain, a mérsékelt melegkedvelő bokorfűzek fajtáit, illetve klónjait Európában a skandináv országok déli részein termesztik (Gyuricza 2014).

2.1.4. A rövid vágásfordulójú fűz, mint fás szárú energianövény Magyarországon termesztett fajtái és klónjai

Az energetikai ültetvények létrehozására alkalmas fajokból az ültetési alapanyagot kizárólag a fajtatulajdonostól vagy olyan engedéllyel rendelkező termelőtől lehet beszerezni, aki központi vagy üzemi törzsültetvényeken előállított szaporítóanyaggal rendelkezik. Ennek megfelelően csak bizonyos fajták telepítésére van lehetőség, amelyet rendeletben is szabályoznak (Gyuricza 2010). A fűznek a trópusoktól a mérsékelt égövig hozzávetőlegesen 400 faja él. Őshonos Európában is, ahol 60 különböző faja van nyilvántartva. Mintegy 23 faja tekinthető Magyarországon honosnak, sok keresztezett változattal együtt (Gyuricza 2010). A hibridizáció és a kromoszómaszám-módosulás fontos szerepet játszott a különböző fajok kialakulásában, amelynek köszönhetően létrejöttek az energetikai célra alkalmas, gyors növekedésű, széles termőhelyi tűrőképességű fajták és klónok. A faji szintű elhatárolást jelentősen megnehezíti a fűzek rendkívüli változatossága és a hibridek nagy száma (Gyuricza 2010). A természetes populációkban létrejövő nemzetség hibridizáció a genetikai variabilitás növelésének egyik fontos forrása (Dudits és Nagy, 2017). Fontosabb fajok a kosárfonófűz (*Salix viminalis*), szép barkájú fűz (*Salix* × *smithiana*), molyhoságú fűz (*Salix* × *dasyclados*), a mandulafűz (*Salix triandra*) és a fehér fűz (*Salix alba*) (Gyuricza 2014). Az energetikai faültetvények létrehozására alkalmas néhány fontosabb hazai nemesítésű fajta: a Bédai Egyenes (*S. alba* „Bédai Egyenes”), Csertai (*S. alba* „Csertai”), Drávamenti (*S. alba* „Drávamenti”), Express (*S. alba* „Express”), és a Pörböly (*S. alba* „Pörböly”). A fontosabb külföldi fajták: a Gudrun (*S. dasyclados* „Gudrun”), Inger (*S. triandra* × *S. viminalis* „Inger”), Sven (*S. schwerenii* × *S. viminalis* „Sven”), Tora (*S. schwerenii* × *S. viminalis* „Tora”), Tordis (*S. schwerenii* × *S. viminalis* „Tordis”) és Torhild (*S. schwerenii* × *S. viminalis* „Torhild”) (Gyuricza 2010).

2.2. A rövid vágásfordulójú fás szárú energianövények termesztéstechnológiája

A rövid vágásfordulójú fás szárú energianövények termesztésének környezeti feltételei közé tartozik, hogy az adott termőhely hosszútávon kevésbé legyen alkalmas a hagyományos növénytermesztésre, de megfelelően valamelyik fás szárú energianövény igényeinek. Ilyen területek lehetnek a gyakran vízjárta, belvizes

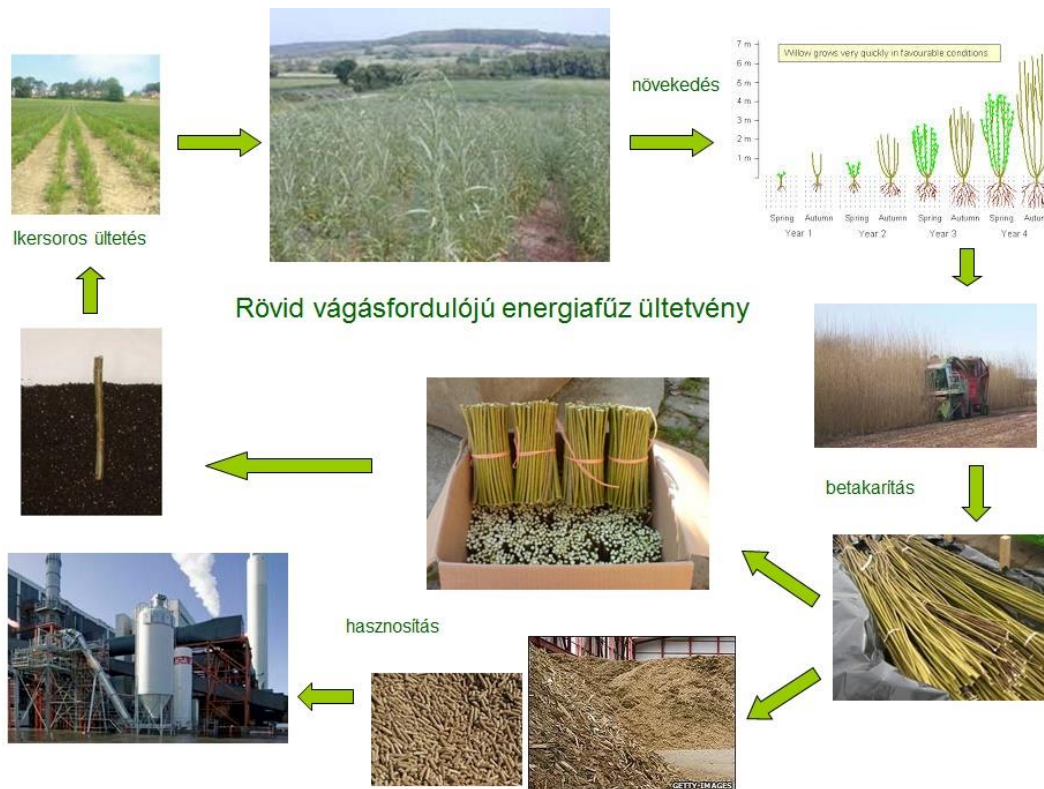
területek, szélsőséges víz-és tápanyag-gazdálkodású területek, homokos vályog vagy homoktalajok (Gyuricza 2014).

Hazánkban a fás szárú energiaültetvények termesztését több rendelet is szabályozza. Magyarország klimatikus adottsága leginkább a fűznek (*Salix* sp.), a nyárnak (*Populus* sp.) és a fehérahácának (*Robinia pseudoacacia* L.) kedvez, azonban a rövid vágásfordulóban termesztett energia növényeknek sok kritériumnak kell megfelelniük, így a gyakorlatban csak kevesebb faj és fajta választható (Gyuricza 2014). A behozott és honosított külföldi fajták egy része a gyenge klímaadaptációs képességük miatt hazánkban nem képesek a származási helyükön elért biomassza produkcióra, így a 90-es évek óta elindult hazai adaptációs kísérletekkel és az intenzív nemesítói munkával eredményesen állítottak elő a külföldi klónokkal versenyképes hazai fajtákat (Gyuricza 2010.). Az intenzív növekedés, jó fagyűrő képesség, gazdaságos és egyszerű szaporíthatóság, jó alkalmazkodó képesség, betegségekkel és kártevőkkel szembeni ellenállóság, valamint a könnyű betakarítás mind fontos szempont. Emellett a kiváló újrasarjadzó képesség a visszavágás után, hosszú vegetációs időszak, nagy nettó asszimilációs ráta, konkurenciatűrő képesség sűrű állományban, tág termőhely-tolerancia (amely a legváltozatosabb környezeti feltételek melletti termeszthetőséget teszi lehetővé), komplementer jelleg, átmeneti aszálytűrés, jó vadkár tűrés, ne okozzon allergiát, kis nedvesség és hamutartalom, kedvező kémiai összetétel, intenzív nedvességleadó képesség, valamint a nagy térfogattömeg ugyanúgy meghatározó elvárások (Gyuricza 2014). Természetesen minden egyes feltételnek egyetlen növényfaj és fajta sem képes megfelelni, de a rövid vágásfordulójú ültetvények telepítésénél törekedni kell arra, hogy a választott növény a lehető legtöbb elvárásnak eleget tegyen (Gyuricza 2014).

A területválasztás során figyelembe kell venni az ökológiai és műszaki adottságokat is. Így kerülni kell a pangóvizet vagy folyamatosan árnyékolt területeket. A talaj kémhatása pH 5.5-7.5 között ideális, a csapadék mennyisége pedig érje el a minimum 400 mm-t. Továbbá kerülni kell a 15%-nál nagyobb lejtésű területeket, legalább 2 hektáros táblamérettel kell tervezni és lehetőleg burkolt út melletti területet választani. A termőhelyi tényezők közül megkülönböztetünk állandó és változó termőhelyi tényezőket. Állandó tényezők a lejtésviszony, humusztartalom, kémhatás, talajtípus, termőréteg vastagsága és a talajművelés minőségét befolyásoló tulajdonságok. A változó tényezők közé soroljuk a meteorológiai tényezőket, a talaj biológiai állapotát, tömör réteg jelenlétét illetve

vastagságát, agronómiai szerkezetét, nem elbomlott növényi maradványok állapotát, valamint a művelés hatására változó tényezőket (Gyuricza 2014.).

Az ültetvények 10-20 évig maradnak ugyanazon a területen, így a precízen elvégzett talajelőkészítés és talajművelés kiemelten fontos. A talajművelési rendszer megválasztása függ attól, hogy korán vagy későn lekerülő szántóföldi elővetemény helyére kerül-e az ültetvény, vagy egy nem művelt (rét, legelő, gyenge termőhelyi adottságú parlagterület vagy elhanyagolt csaltos cserjés) területre. Fontos, hogy az ültetőágyat közvetlenül a dugványok telepítése előtt kell elkészíteni (Gyuricza et al. 2012). A telepítés kora tavasszal a legideálisabb, szimpla vagy ikersoros technológiával (Gyuricza 2014.). A fűz és nyár esetében rövid dugványokat (20-22 cm), az akác esetében egyéves gyökeres magági csemetéket alkalmaznak. Az első éves hajtásokból származó rövid dugványokat az ültetésig hűvös, párás helyen kell tárolni, majd a telepítés előtt 2 napig vízben kell áztatni. Az ültetést speciális energetikai ültetőgéppel, faiskolai csemete ültetőgéppel, vagy kézzel végzik. A tőtáv mindkét technológia esetében 0,4-0,5 m, a sortávolság a szimplasorosnál 0,7-2 m az ikersorosnál az ikersoron belül 0,6-0,7 m ahol 1,5-3 m széles művelőutat kell hagyni (Gyuricza et al. 2012.). A tőszám a technológiától, fajtától és a termőhely ökológiai adottságától függően 10-15 ezer tő/ha, de bizonyos fajták esetében akár magasabb tőszám is beállítható (Dudits és Nagy 2017). A szakszerű növényápolás, mechanika és vegyszeres gyomszabályozás elengedhetetlen a sikeres telepítéshez. A fás szárú energianövények tápanyag igénye hasonló a többi szántóföldi kultúrákéhoz, így a nagy hozam eléréséhez fontos a megfelelő tápanyag visszapótlás is (Gyuricza et al. 2012). A véghasználati hálózatban történő telepítést követően 10-15 éves vágásfordulóval hengeres faáru előállítására kerül sor, míg a sarjzattatásos, rövid vágásfordulójú ültetvényekben a 2-4 éves vágásfordulóban fás hajtások betakaríthatók (Dudits és Nagy 2017). A betakarítást januárban és februárban végzik egy vagy két menetes gépi illetve kézi betakarítással. Az első év után a sarjzadás elősegítésére a bokor alakú fűzet a talajfelszín felett visszavágják, a betakarítása pedig a harmadik évben történik. A fatermetű fűz esetében az első év után - a bokorfűzékkel ellentétben - nincs visszavágás, a betakarítás a második évben történik (Gyuricza 2010). A betakarított és előkészített faanyagot fűtőanyagként hő- és villamosenergia előállítására az erőművek hasznosítják, míg az elsőéves vesszők szaporítóanyagként szolgálnak. További fontos hasznosítási terület a fermentációra alapozott bioetanol és biogáz előállítás is (Dudits és Nagy 2017). A fűz telepítésétől a betakarításáig történő folyamatot a 2. ábra szemlélteti.



2. ábra: A rövid vágásfordulójú energiafűz ültetvények telepítése, fenntartása, a vesszők betakarítása és hasznosítási lehetőségei (Dudits és Nagy 2017)

2.3. A rövid vágásfordulójú fás szárú energianövények biomassza hozama

A különböző fajok terméshozama fajtánként és termőhelyenként jelentős különbséget mutathat. A rövid vágásfordulójú sarjzatatatos energiaültetvények telepítésekor fontos a termőhelyi adottságokhoz legmegfelelőbb faj, illetve fajta kiválasztása. A természetstechnológiai szempontok pontos betartásával akár 40-50%-os többlethozam is elérhető (Bai 1999). A megfelelően létesített és kezelt ültetvényeket általában 5-6 betakarításra tervezik, de a megfelelő ápolás és tápanyagpótlás mellett ennél hosszabb élettartam is megvalósítható. Az ültetvény fenntartási idejét elsősorban a 4-5. betakarítást követő hozam csökkenésének mértéke határozza meg. Egy bizonyos érték alatt javasolt az ültetvény felújítása, mint az egyre csökkenő hozamok melletti fenntartása. A várható hozam betakarításonként el kell, hogy érje a minimum 25 tonna nedves állapotú (35% nedvesség tartalom) aprítékot, amely évi 12 t/ha fa megtermelését jelenti. Ennek nagyobb része a ciklus második évében keletkezik. Az első betakarítás adja a legkisebb eredményt, mivel az első vegetációs év fele a gyökeresedésre fordítódik. Ezután áll majd be az ültetvény

termelékenysége magasabb szintre (Meggyes 2013). Magyarországon a sarjzattatos rövid vágásfordulóban elérhető hozama a fűznek 12-17 t_{szá}/ha/év, a nyárnak 12-15 t_{szá}/ha/év, az akácnak pedig 5-12 t_{szá}/ha/év (Szalay et al. 2013).

A fűz biomassza hozamának alakulásában jelentős szerepet játszanak a különböző fenotípusos paraméterek is, mint a szár elsődleges és másodlagos növekedése (a szár hossza és átmérője), a levelek mérete, illetve az abiotikus és biotikus stressz tolerancia, rezisztencia kialakítása, valamint a jobb vízhasznosítás is (Karp et al. 2011).

2.4. A fás szárú fajok nemesítése klasszikus módszerekkel

2.4.1. Keresztezés, heterózis és szelekció

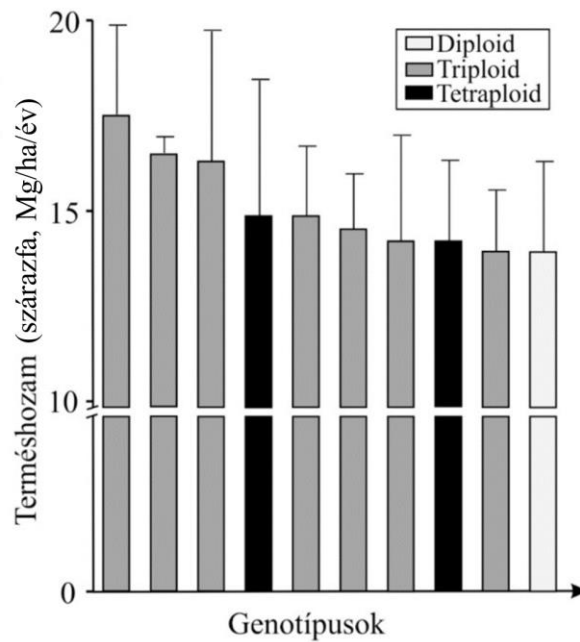
Európában a rövid vágásfordulójú energetikai faültetvények létesítésére a nagy biomassza produktummal rendelkező, magas növésű, tág tűrőképességű cserje vagy bokor (*Salix viminalis*), és fatermetű (*Salix alba*) fajokat, illetve fajtákat termesztik (Gyuricza 2010). Fontos forrásai a genetikai variabilitás növelésének a természetes populációkban lezajló nemzetség hibridizációk. A nemesítői munka során az irányított keresztezéseket követően a reciprok rekurrens szelekció a leggyakrabban alkalmazott módszer, amelyet klón szelekcióval egészítenek ki. Több tanulmány foglalja össze az energetikai céllal termesztett fafajok nemesítési stratégiáit a nyár (Stanton et al. 2010), az akác (Rédei et al. 2008) és a fűz esetében (Karp et al. 2011). A fajok közötti keresztezés elvégzése után az utódnemzedékben heterózishatás figyelhető meg, amelynek köszönhetően az utódnemzedék biomassza hozama felülmúlhatja a szülők produktivitását. A nem kívánt tulajdonságok eltávolítására a visszakeresztezés módszerét alkalmazzák. A nemesítői munka fajtaminósítással zárul a szaporítóanyag minőségének biztosítása érdekében. A rövid vágásfordulójú fás szárú energianövények közül számos fajtat állítottak elő hagyományos nemesítési módszerekkel, elsősorban szelekcióval és keresztezéssel (Dudits és Nagy 2017).

2.4.2. A genoméret megsokszorozásának típusai, módszerei és hatása a rövid vágásfordulójú fás szárú fajok esetében (nyár, császárfafa, fűz, akác)

A genetikai variabilitás jelentős növekedését leginkább a faj és nemzetség hibridizációval lehet elérni, ami klón szelekcióval hasznosítható. Az alap kromoszómakészlet többszörösével rendelkező poliploid változatok fellelhetők a természetes populációkban is, azonban a mesterséges úton létrehozott poliploid növények szintén értékes nemesítési alapanyagot adhatnak. Különösképpen a triploid növények fahozama a heterózishatás érvényesülése révén kiemelkedően jó lehet. Az autotetraploid vonalak nagyobb levéltömege, megnövekedett CO₂ fixációs képessége mérsékelheti a klímaproblémákat (Dudits és Nagy 2017).

2.4.2.1. A természetes kereszteződésekből származó allopoliploid változatok

A természetben gyakran játszódnak le a *Salix* nemzetségben interspecifikus és intraspecifikus hibridizációk, amelyek allopoliploid utódokat eredményeznek (Dorn 1976, Barcaccia et al. 2003). A *Salix* nemzetségben található 300 faj között jelentős számban található poliploid változatok, amelyek a fajok közötti keresztezések során alakulhatnak ki. A nemesítés során a bokorfűzek biomassza hozamának növelése a keresztezési programokon alapul, amelyekkel szintén létre lehet hozni allopoliploid genotípusokat. Hetvenöt féle fűz genotípusból álló populáció fahozamát összehasonlítva – amelyek között diploid, tetraploid és triploid vonalakat vizsgáltak – megállapították, hogy a legkisebb hozamot a diploid genotípusok, míg a legmagasabbat a triploid vonalak érték el. A triploidok fölénye a szár vastagságában is megfigyelhető volt a diploid genotípusokhoz képest (Serapiglia et al. 2014). Az eltérő eredményeket a 3. ábra szemlélteti.



3. ábra: A legjobb diploid, triploid és tetraploid fűz genotípusok fahozamainak összehasonlítása (Serapiglia et al. 2014)

A fűz mellett egy másik igen fontos fafajban, az akácban is fellelhetők allopoliploid változatok. A Kóréában őshonos allopoliploid fehér akác (*Robinia pseudoacacia* L.) külső morfológiai megjelenésére szintén jellemző a szélesebb, nagyobb levélméret és levélvastagság is a diploid társaikéhoz képest. A ploid szint emelkedésével a morfológiai tulajdonságok mellett a fiziológiai tulajdonságok is megváltoztak. A tetraploid akácfák abiotikus és biotikus stresszel szembeni toleranciája, mint a szárazságtűrés, hidegtűrés, sótűrés, vírusok, gombák, rovarkártevőkkel szembeni ellenállóság esetében kiemelkedő eredményt mutatott a diploidokkal összehasonlítva. A környezeti stressz faktorokkal szembeni magasabb tolerancia elérése kulcsszerepet játszik a mezőgazdasági és erdészeti növények nemesítésben. A tetraploid fehér akác felhasználási köre igen széles, tekintve a gyors növekedését és a kiváló faanyagát. Ez a tetraploid pionír fafaj tágtűrésének köszönhetően nagy gazdasági és ökológiai értékkel bír (Wang Z et al. 2013).

A poliploid nemesítés során a tetraploid és diploid növények közötti keresztezéssel triploid növények is előállíthatók, amelyek fokozott növekedési eréllyel rendelkeznek. Az első triploid nyárfát Svédországban fedezték fel, amely egyedülállónak számított a gyors növekedési erélyével és a hatalmas levélméreteivel. Számos megközelítés van arról, hogy a triploid nyár spontán kereszteződésből is származhat (Wang J et al. 2013).

2.4.2.2. Az autotetraploidizáció módszerei a rövid vágásfordulójú fajok esetében

A nemesítési céllal végzett poliploidizáció során különböző sejtosztódást gátló vegyületeket alkalmaznak. A kolhicin a mitózis metafázisában fejt ki hatását. A tubulin monomerekhez kötődve meggátolja a mikrotubulusok és a magorsók kialakulását, amelynek eredményeképpen a kromoszómák magi pólusokra történő vándorlása nem tud bekövetkezni. Ennek köszönhetően a sejtosztódás leáll. Ez a folyamat vezet a genom duplikálásához (Levan 1938). A kromoszómakészlet megduplázódását leggyakrabban merisztéma szövetek kolhicin kezelésével idézik elő. Már több poliploidizációs programról számoltak be a rövid vágásfordulójú energiaültetvények telepítésére alkalmas nyár (Cai és Kang 2011) és akác (Wang et al. 2011) esetében is. Elterjedt technika az *in vitro* tenyésztett szövetekből történő regeneráció során végzett kolhicin kezelés.

A nyárfa esetében többféle poliploidizációs módszert is alkalmaztak a ploidfok növelésére, mint a magok, a hajtásesúcs és a kallusz kolhicinnel történő kezelése. Egy újabb eljárás során a zigotikus kromoszómák megduplázását magas hőmérsékleten történő kolhicin kezeléssel végezték, melynek eredményeként szintén sikeresen állítottak elő tetraploid nyár vonalakat (Wang J et al. 2013).

Az akác magok, illetve a csíranövények kolhicin kezelése szintén poliploid genotípusok előállítását tette lehetővé (Dudits és Nagy 2017). Magyarországon elsőként Kopecky Ferenc állított elő tetraploid akácot kolchicines kezelés útján, valamint haploid fehérszárakat virágor indukációs módszer alkalmazásával, amelyet Nemky Ernő (1965) publikációja foglal össze. Az *in vitro* szaporított fűz (*Salix viminalis*) növények oldalrügyein a kolhicin kezelést követően, sikerrel állítottunk elő és neveltünk fel tetraploid ($2n=4x=76$) vonalakat. A poliploidizáció hatására jelentős funkcionális változások is kimutathatók voltak, amelyek a biomassza hozamot is jelentős mértékben befolyásolják (Dudits et al. 2016).

A császárfa (*Paulownia australis*) Kínában őshonos fafaj, de számos országban megtalálható a telepített erdészeti kultúrákban és energiültetvényeken. Gyors növekedésének, a környezeti feltételekhez való jó alkalmazkodóképességének köszönhetően igen elterjedt. Faanyagának minősége kiváló alapanyagot biztosít az ipar számára, gazdasági és ökológiai szempontból is értékes. Az *in vitro* szövetkultúrából nevelt diploid *Paulownia australis* magoncok kolhicin kezelésével

tetraploid egyedeket állítottak elő, amelyeket áramlási citometriával és kromoszómaszám meghatározással azonosítottak (Wang et al. 2017).

2.4.2.3. A rövid vágásfordulójú fajok autotetraploid változatainak főbb morfológiai és produkciós jellemzői

A poliploidizáció a teljes génállomány, illetve a genom megsokszorozásán alapuló nemesítési módszer. A poliploidizáció történhet spontán vagy mesterségesen indukálva is. A diploid egyedek genomjának megkettőződése során autotetraploid egyedeket hozhatunk létre, melyek minden homológ kromoszómából négy példányt tartalmaznak. A diploidokhoz képest a nagyobb géndózis nagyobb mennyiségű génterméket állít elő, így a tetraploid növények méretei (sejt, szár, virág, termés, gyökér, levél, stb.) jóval nagyobbak, mint diploid társaiké, amely a legtöbb esetben gazdasági előnyökkel is párosul.

Ezek a jellemző fenotípusos tulajdonságok más autotetraploid fásszárúakban is megjelentek. A poliploidizáció a növénynemesítés egyik fontos eszközévé vált. A triploid és tetraploid nyárfa levelei szélesebbek és vastagabbak lettek diploid társaikénál. Biomassza hozamuk is kiemelkedő eredményeket mutatott (Wang J et al. 2013).

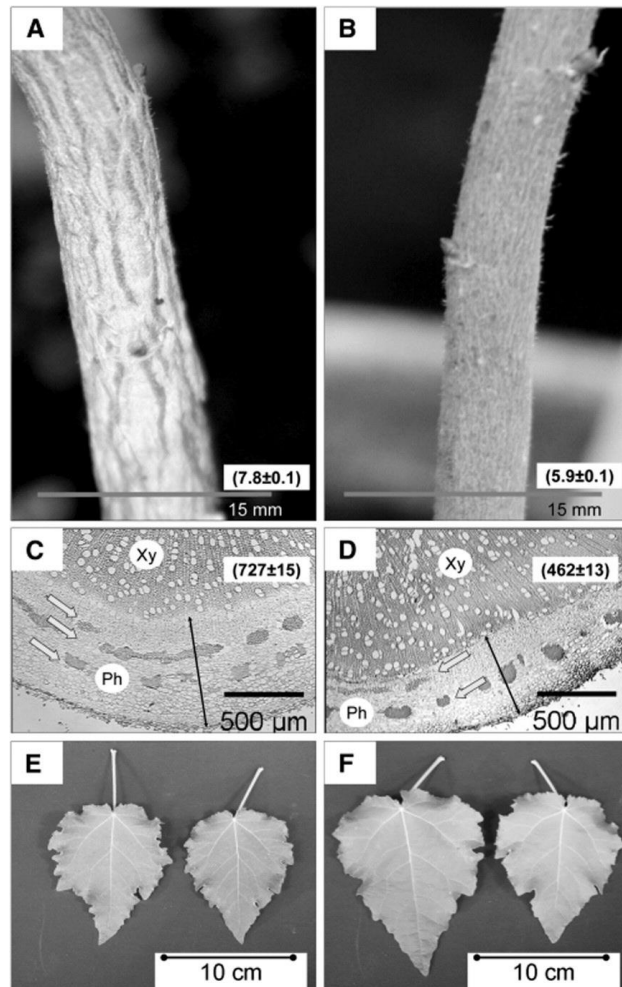
A tetraploid császárfafa (*P. australis*) ugyancsak megnövekedett levélméretet és levélvastagságot mutatott a diploidokhoz képest. A sejtek száma csökkent, de a sejtméret növekedett. A klorofill tartalom szintén nagyobbak bizonyult a tetraploid levekben, amelyek több kloroplasztiszt tartalmaztak. Ezáltal nagyobb fontosintetikus ráta volt kimutatható a tetraploid növényekben (Wang et al. 2017).

Általánosságban megfigyelhető tehát, hogy a rövid vágásfordulójú poliploid fajokra egységesen jellemző a nagyobb és vastagabb levélméret mellett a kiemelkedő biomasszahozam is. A poliploidizációval további előnyös tulajdonságok is előtérbe kerültek, mint a biotikus és abiotikus stressz tolerancia fokozódása, amely tovább növeli a poliploid energianövények gazdasági értékét és jelentőségét.

2.4.3. A hagyományos és irányított mutagenézissel létrehozott genetikai variabilitás hasznosítása a fafajok nemesítésében

A mutációs nemesítés egy hagyományos nemesítési módszer, melynek során a DNS molekulák szerkezetét besugárzással vagy kémiai anyagokkal teljesen véletlenszerűen megváltoztatják. Ezek a hirtelen fellépő örökletes megváltozások a mutációk, melynek következményeként a gének felépítése vagy működése módosul. A nemesítés során az utódokon értékelni kell a megváltozott tulajdonságokat, és kiválasztani a hasznos mutáns egyedeket a fajtaelőállításához. A véletlenszerű mutáció előidézhető fizikai mutagénekkel (UV, gamma és X-sugárzás), továbbá kémiai vegyületekkel (pl: EMS) is (Dudits és Nagy 2017).

A heterozigóta állapot gyakorisága, a nagy növényi testméret vagy a késői virágzás gátolják a hagyományos mutációs technikák és megközelítések sikerességét a fásszárú fafajok esetében. Azonban az idegen szekvencia beépüléséhez kötött inszerciós mutagenézis alkalmas a fás szárú növények örökletes tulajdonságainak megváltoztatására, amely megközelítést a nyár estében a beltenyésztéssel előállított homozigóta vonalakon sikerrel alkalmazták (Busov et al. 2005). Egy másik eljárás lehetővé teszi az aktív szabályzó elem, a promóter szekvencia beépítését mutációs vektor konstrukciók alkalmazásával. Amennyiben a promóter valamely belső gén közelében épül be, úgy megnövelheti annak kifejeződését. Ezzel a módszerrel nyárfában felfedeztek és azonosítottak Activation-Tagged mutánsokat, amelyek fokozott másodlagos növekedést és a kéregállományukban is módosulást mutattak. A mutáns növényekben a másodlagos növekedési zónában a szár átmérője megnövekedett és közel 50%-kal haladta meg a vad típus kéregvastagságát. A kéreg mélyen barázdálttá vált. A mutánsok levelei ellenben kisebbek voltak a vad típusénál. Ezek a morfológiai változások a mutánsokban az LBD1 transzkriptum magasabb szintjének köszönhetőek (4. ábra) (Yordanov et al. 2010).



4. ábra: Morfológiai változások az Activation-Tagged nyár mutáns növényekben. A mutáns (A, C, E) és a vad típus (B, D, F) összehasonlítása (Yordanov et al. 2010)

A TILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomes) eljárással a géneket érintő mutációk DNS szinten azonosíthatók. Nyárfa kísérletekben már sikerrel alkalmazták kisebb módosításokkal a TILLING módszert, amellyel az EMS-sel kezelt nyárfa populáció mutáns egyedeinek szűrését végezték (Riyal 2011).

2.5. Molekuláris módszerek a kutatás és nemesítés szolgálatában

A fajok biológiai teljesítőképességének növelésében nagy szerepet kapnak a géntechnológiai módszerek is. A DNS markerekkel történő szelekcióval, illetve fahozamot javító gének izolálásával és a génbeépítéssel lehetővé vált a kedvező tulajdonságok kialakítása. Az így előállított GM változatokat zárt rendszerekben értékelik világszerte. A kedvezőbb növekedési paraméterek, a stressz tolerancia, illetve a faanyag jobb fermentálhatósága mind hozzájárulhatnak a nemesítés sikerességéhez. A genomszerkesztési stratégiák lehetővé teszik az irányított

mutagenezist, új korszakot nyitva a precíziós nemesítés számára, amellyel a növények tulajdonságainak tervezett kialakítása akár gén beépítése nélkül is megvalósulhat (Dudits és Nagy 2017).

2.5.1. A fás szárú energianövények nemesítése molekuláris markerekkel

A fás szárú növények kiemelt nemesítési céljai a biomassza hozam növelése, a biotikus és abiotikus stressz tolerancia fokozása. A markerekre alapozott szelekció segítségével ezeknek a tulajdonságoknak a genetikai hátterét fel lehet deríteni és azonosítani lehet a különböző hasznos géneket és kapcsoltsági csoportokat is. A nyárfa esetében számos publikáció jelent meg és több nemesítési program is indult, melynek során QTL (Quantitative Trait Locus) térképezéssel, sikerrel azonosítottak rezisztenciagéneket. Emellett SNP (Single-Nucleotide Polymorphism) markereket is alkalmaztak, továbbá szintén markerekkel szelektálnak a hasznos, jelölt génekre is (Stanton et al. 2010).

A különböző nyárfa és fűzfa fajokon és hibridjeiken az eltérő, egyedi klónok azonosításához használják a RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) analízist, amely alkalmas lehet a különböző biomassza hozamú klónok megkülönböztetésére is. Fűzben tanulmányoztak és használtak mikroszetellit SSR (Simple Sequence Repeat) markereket. A fűz genomi DNS-éből magas SSR tartalmú kis inszert könyvtárat hoztak létre. A mikroszetellitek magas fokú polimorfizmust mutattak az összes tesztelt fűz klónnal, ezáltal alkalmazhatók az AFLP alapú genom térképezéshez (Lindgaard et al. 1996).

Fehér akácban sikeresen izoláltak mikroszetellit markereket, ahol 11 mikroszetellit lókusznál egyértelműen polimorfizmus volt megfigyelhető. Ezek hasznos genetikai adatot szolgáltatnak az erdők ökológiai tanulmányozásához az akác esetében is (Mishima et al. 2009). Továbbá SSR és SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism) marker rendszerek alkalmazásával vizsgálták a mutáns fehér akác populációban a különböző, megváltozott morfológiai paramétereket. A mutáns növényekben az SSR és SRAP analízis magasabb genetikai diverzitást mutatott ki (Yuan et al. 2012).

A kétszikű növényekben számos faj esetében alkalmazható az ivarhoz kapcsolt DNS markerek használata. Kimutatható volt, hogy a hím ivarú, különböző nyár és fűz fajok magasabb fotoszintetikus aktivitással és CO₂ megkötő képességgel rendelkeztek nőivarú társaikhoz képest a növekedési időszakban,

továbbá a szárazsággal és hideggel szemben is toleránsabbnak bizonyultak. A nyár esetében a RAPD és az SSR, míg a fűz esetében a RAPD, RAPD-SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) és AFLP-SCAR analízist alkalmazták az ivarhoz kapcsolt DNS markerek kimutatására (Gyulai et al. 2015).

2.5.2. Transzgenikus módszerek alkalmazása a fás szárú energianövények nemesítésében

A biomassa hozam növelése kulcsfontosságú az energianövények esetében, így az erre irányuló transzgenikus stratégiák kidolgozása rendkívül nagy jelentőséggel bír. A GM technológiák nagyban hozzájárultak már a növények méretének megváltoztatásához. A hormontermelést és hormonhatást, valamint a sejtosztódást irányító gének működésének szabályozásával jelentős növekedést sikerült elérni. Az *ARGOS* gén túltermeltetésével megnövelhető a lignocellulóz aránya a növényekben, amely a zöld tömeget és a növény föld feletti szerveinek erőteljesebb növekedését is előidézi. Az *ARGOS* fehérje fokozza az auxin hormon hatását, mellyel stimulálja a sejtosztódást (Dudits és Györgyey 2013). *Arabidopsis*-ban és kukoricában is sikerrel alkalmazták a nagyobb zöldtömeg elérése érdekében. A kukorica *ARGOS1* (*ZARI*) génjének túltermeltetése nemcsak a zöldhozamot növelte a hibrid kukoricákban, hanem a termés mennyiségét és a szárazságtűrést is jelentősen fokozta (Guo et al. 2014). Kuluev *et al.* (2016) fekete nyárban (*P. nigra*) azonosították a (*PnARGOS*)-*LIKE* auxin szabályozó gént, amely a kezdeti levélfejlődést, a levéllemez felületét és hosszát, a sejtek méretét is megnövelte a transzgenikus dohányban és nyárban (*P. tremula*).

A fás szárú energianövények esetében a magas biomassa hozam elérése mellett fontos a klónok, fajták, hibridek betegség és kártevőkkel szembeni ellenállóságának a növelése is. Ezeknek a feltételeknek sajnos csak kevés, gazdaságosan termesztethető fajta képes megfelelni. A nemesítési munka során szelekcióval, keresztezésekkel és interspecifikus hibridizációval is előállítottak toleráns fajtákat (Lindegaard et al. 1996). A fás szárú növények transzformációja sok nehézségbe ütközik. A nyár- és fenyőfélék esetében már számos publikáció megjelent a sikeres *Agrobacterium*-közvetítte transzformációs technikákról.

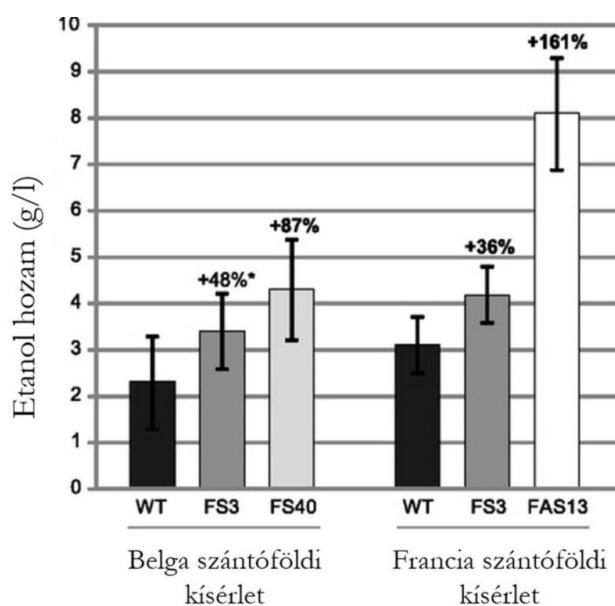
Az energetikai célú ültetvényekben használt fafajok (nyár, fűz vagy akác genotípusok) nemesítését segíthetik a biomassa hozamot befolyásoló gének azonosítása és meghatározása. Ezek a gének izolálhatók, átalakíthatók, és

visszaépíthetők az adott fafaj genetikai képességeinek fejlesztése érdekében, kiemelten a rövid vágásforduló termesztéstechnológiai követelményeire való tekintettel. A genom szekvenálási programoknak kulcsszerepe van, amelyek teljességében vagy részlegesen feltárják egy adott fafaj DNS-ét alkotó nukleotidok bázisainak sorrendjét. A nyár (*Populus trichocarpa*) DNS szekvenciája több mint tíz éve ismert. Napjainkban lehetőség van a mintegy 41 ezer gént tartalmazó funkcionális génhálózat megszerkesztésére, amellyel azonosítható akár a 100 legfontosabb farész/ xilem fejlődési gén, illetve fontos stressz gének is (Liu et al. 2016). A nyár DNS szekvenciájának ismerete segítséget nyújt a fűz részleges szekvencia adatainak bioinformatikai feldolgozásában. A *Salix suchowensis* DNS-ének nukleotid sorrendje alapján sikerrel azonosítottak 26 ezer fehérjét kódoló gént, amelyek közül 20 ezer esetében nyár gén homológot találtak (Dai et al. 2014). Habár az akác teljes genomi DNS-re kiterjedő szekvenálási eredménye még nem ismert, azonban a cDNS-ek szekvenálását követően sikerült 36 ezer gént azonosítani (Wang et al. 2015).

Nincs alapvető különbség a gazdasági növények genetikai transzformációjához használt módszerek (Dudits és Györgyey 2013) és a fafajok genomjába történő génbeépítés módszerei között. A fás szárú növények biomassza hozamának növelésére irányuló génbeépítések a tulajdonságok széles körét érintették. Ilyen tulajdonságok a hajtás és lombkorona felépítése (fatörzs magasság, elágazás, levél méret, xilem képződés): 24 gén; gyökérrendszer, vízhasznosítás, tápanyagfelvétel: 14 gén; fotoszintézis: 13 gén; lignin anyagcsere: 4 gén; reproduktív szervek, virágzás: 7 gén; hideg stressz: 7 gén; szárazság stressz: 7 gén; biotikus stressz: 24 gén. Kiemelkedő figyelmet érdemelnek azok a kísérletek, amelyekben egyidejűleg több tulajdonságot is érintett a transzgenézis. A fás szárúak modell növényeként ismert nyár központi faj a transzformáns változatok előállításában és jellemzésében (Dubouzet et al. 2013). A rovar kártevőkkel, illetve a gombabetegséggel szembeni rezisztencia kialakítása különböző génbeépítési stratégiával is sikeresnek bizonyult (Ye et al. 2011). Su et al. (2011) öt gén egyidejű beépítésével többféle rezisztenciát alakítottak ki a hibrid nyárban (*Populus × euramericana* „Guariento”).

A megújuló zöld energiaforrások hasznosítása során fontos szempont, hogy a bioetanol vagy biogáz termeléshez az élelmiszerként is hasznosítható alapanyagokat ne használjuk fel, mert az élelmiszerigény folyamatos növekedésével kell számolni. Ez az elvárás a fa biomassza jelentőségét megnöveli, mivel a cellulózalapú

fermentációs technológiák gazdaságos energia előállítását tesznek lehetővé. Azonban a fás szövetek lignin tartalma kedvezőtlenül befolyásolja a hozamokat. A géntechnológiai beavatkozásoknak köszönhetően a kiválasztott gének működése mérsékelhető. Előállítottak olyan nyár (*Populus tremula* × *Populus alba*) transzformánsokat, amelyekben a lignin bioszintézis egyik kulcs enzimét kódoló gént elcsendesítették (Van Acker et al. 2014). A szabadföldi kísérletből betakarított GM faminták az egyidejű cukrosítás és élesztő fermentáció során szignifikánsan több bioetanol előállítását tették lehetővé (5. ábra).



5. ábra: A GM nyár növények (FS3, FS40 és FAS13) alacsony lignin tartalmú fájának fermentációja során több etanol nyerhető mind a belgiumi, mind a francia termőhelyen nevelt fák esetében (Van Acker et al. 2014)

Az akác transzgenikus változatait az *Agrobacterium* fertőzést követően a szövettenyészetekben történő regenerációval állítják elő. Az akác rendelkezik bizonyos mértékű természetes szárazságtűrési képességgel, azonban adódhatnak olyan klimatikus viszonyok, amikor hosszabb periódusú vízhiány alakul ki. A stressz tolerancia javítása ezért kulcsfontosságú lehet. A stresszválaszokban szerepet játszó gének működését transzkripciós faktorok szabályozzák, amelyek közé tartoznak a *DREB* fehérjék is. Ezek egyik változatát transzgen beépítéssel túltermeltették egy steril akác változatban (*Robinia pseudoacacia* „Idaho”). A GM növények mélyebbre hatoló gyökérzettel rendelkeztek, és vízmegvonás utáni túlélési arányuk is jobb volt (Xiu et al. 2016). A fűz transzformációs módszerének kidolgozaskor jelentős akadályt jelent, hogy a tenyésztett szövetekből történő növény regeneráció nehéz.

Yang et al. (2013) embrió eredetű kallusz-szöveteket fertőztek meg *Agrobacterium*-mal, melynek során sikerült GM fűz növényeket előállítani. A transzgenikus genotípusokból létesített energetikai faültetvényekkel szemben alapvető elvárás, hogy a nemesített változatok a természetes populációk egyedeivel ne kereszteződhetnek. A biztonságos termesztés egyik lehetősége a steril GM változatok alkalmazása (Häggman et al. 2016). Xiu et al. (2016) steril akác (*Robinia pseudoacacia* „Idaho”) genotípust használták a transzformációs programjukban. Változó hatékonysággal, több gén beépítésével is sikerült indukálni a fás növények sterilitását (Häggman et al. 2016). A hosszú élettartamú fajok esetében a nemesítés hatékonyságát javíthatja a vegetatív fázis lerövidítése, illetve a korábban virágzó tenyésztési anyagok használata. A *FLOWERING LOCUS T* gén működtetése hőszabályzó elemmel indította el a nyárfák virágzását (Zhang et al. 2010). A *Populus* fajok az erdészeti és energetikai felhasználásuk mellett kiválóan alkalmasak a szennyezett talajok megtisztítására, remediálására. A fitoextrakció során a nyár a talajszennyező anyagokat felveszi, akkumulálja, majd a biomassza betakarítását követően a szennyezés eltávolítható a területről. Kimutatták, hogy a *GSH* (glutathion) alapú fitoremediációra nemesített *35S-gshI* transzgenikus nyárfaklónok közel tízszer aktívabban képesek a talajszennyeződések felvételére a hagyományos fajtákkal szemben (Gyulai et al. 2012).

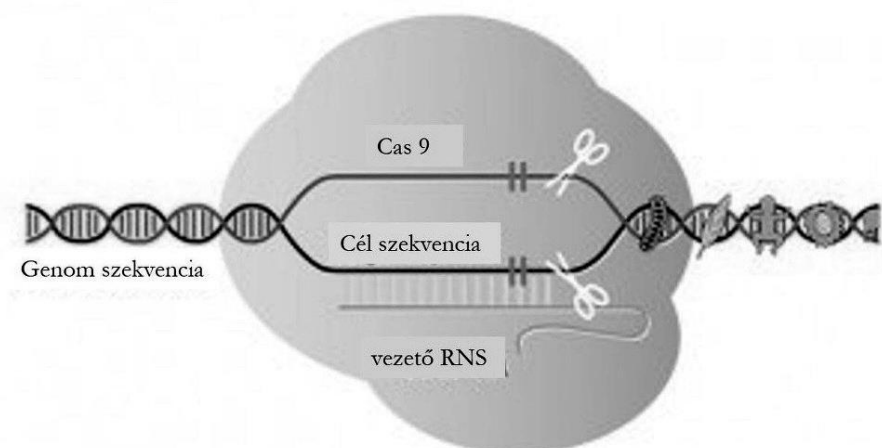
2.5.3. A genomszerkesztési módszerekkel végzett célzott mutagenézis és precíziós nemesítés

A funkcionális gének beépítésével előállított GM fás szárú genotípusok mind a fahozam növelése mind a környezet- és klímavédelmi célok érdekében segíthetik a nemesítés sikerességét. A genomszerkesztési módszerekkel egy kiválasztott célgén akár egyetlen építő elemét, nukleotidját is ki lehet cserélni, amivel az elvárásnak megfelelően megváltoztathatók a kódolt fehérje tulajdonságai. A DNS-hez kötött cink-ujj (*ZF*) protein doménjét elsőként alkalmazták genomszerkesztési eszközként. Jelenleg több genomszerkesztési módszert használnak, mint a cink-ujj nukleáz (*ZFN*), a *TALENs*, és a *CRISPR/Cas9* rendszer. (Osakabe et al. 2016).

A cink-ujj nukleázok (Zinc-Finger Nucleases, *ZFN*) mesterségesen kialakított fúziós fehérjék, amelyek kétféle feladatot ellátó egységgel rendelkeznek. A cink-ujj fehérjestruktúrák felismernek egy meghatározott DNS-szekvenciát. A kötődésük szelektivitását 3-4 cink-ujj fehérjeegység együttese biztosíthatja. Informatikai

programok segítségével analizálják egy kiválasztott célgén DNS-szekvenciáját, hogy meghatározzák azt a 9-12 bázisnyi DNS-régiót, amelyhez a cink-ujj egységek megbízhatóan kapcsolódni képesek. Ahhoz, hogy a DNS felnyitása a kívánt helyen következzen be, minden egyes célgén esetében külön-külön tervezik meg a cink-ujj egységeket (leírás: Dudits és Györgyey 2013). A *TALE* (Transcription Activator-Like Effectors) megtervezett fehérjékre szintén alapozható a DNS-szekvenciamotívum felismerése. A *TALE* fehérjékben nagymértékben konzervált középső régió van jelen, amelyekben 34 aminosavból álló szakaszok ismétlődnek. Ezek a szerkezeti egységek, ismétlődések felelősek egy-egy nukleotid megkötéséért, attól függően, hogy a 12. és 13. helyen milyen aminosavak találhatóak. Az ismétlődések sorrendjével egy ismert DNS-szekvencia-szakaszhoz kötődő *TALE* fehérje építhető fel, amelyhez a *FokI* endonukleáz kapcsolódik. Az így kialakított rekombináns fehérje a kívánt helyen hasítja a DNS mindkét szálát (áttekintés: Dudits 2014).

A *CRISPR/Cas9* rendszer egyik kulcslépése, hogy a DNS molekula mindkét szálán törést kell előidézni a kicserélendő nukleotid közelében, amelyet a *Cas9* vagy *FokI* restrikciós endonukleáz enzim végez el. A genomszerkesztést végző molekulákat a növények esetében tenyésztett sejtekben aktiválják és az új variánsokat a mutációt hordozó sejtekből nevelik fel. A rendszer azonban kivitelezhető funkcionális gén beépítése nélkül is. A 6. ábra bemutatja a folyamatot, valamint a *Cas9* kettősszálú DNS-t hasító nukleázt és a cél szekvenciát felismerő vezető RNS komplexét (Dudits és Nagy 2017).



6. ábra: A *CRISPR/Cas9* genomszerkesztési rendszer génspecifikus mutációk indukálását teszi lehetővé. A *Cas9*-kettősszálú DNS-t hasító nukleáz és a cél szekvenciát felismerő vezető RNS komplexe. (Dudits és Nagy 2017)

A genomszerkesztési módszereket már sikerrel alkalmazták az erdészeti fás szárú fajok esetében is (Tsai és Xue 2015). Zhou et al. (2015) a *CRISPR-Cas9* eljárással a nyár *4-coumarate: CoA ligase (4CL)* génjében létrehozottak egy két alléles mutációt, amely 23%-al csökkentette a fás szövetek lignin tartalmát.

2.5.4. A rövid vágásfordulójú fásszárú fajok molekuláris citogenetikai vizsgálata FISH módszerrel

A FISH a jelölt heterológ DNS próbákon alapuló módszer, amellyel megvalósítható a kromoszómák és a kromoszóma párok azonosítása, ezáltal első lépésként a kariotípus részleges meghatározása. Az *in situ* hibridizáció a modern növényi sejt és molekuláris biológiában alkalmazott alapvető módszer. Hatékony technikája a nukleinsav szekvenciák (DNS vagy RNS) lokalizálásának a biológiai anyagokban, mint a sejtmagban, kromoszómákban, organellumban vagy a citoplazmában (Pardue és Gall 1969, Houben et al. 2005). A fluoreszcens *in situ* hibridizációban (FISH) használt repetitív DNS próbák specifikus mintázatot adnak a kromoszómákon (Rayburn és Gill 1987, Pedersen és Langridge 1997). Ez a módszer alkalmas a kromoszómák azonosítására és a növényfajok elkülönítésére, úgy mint a *Triticeae* törzsekben is (Mukai et al. 1993, Rayburn és Gill 1985, 1986). A fásszárúak közül a szőrös termésű nyár (*Populus trichocarpa*) az első olyan fafaj, amelynek a genomját megszekvenálták, ennek következtében ezt a fajt tartják az erdei fafajok modellnövényének a genetikai és genomikai kutatásokban (Tuskan et al. 2006). A FISH jeleket adott rDNS klónokat, illetve *Arabidopsis*-típusú teloméra specifikus szekvenciákat és markerekre szelektált BAC DNS klónokat már azonosították a nyárban (Islam-Faridi et al. 2009a,b). A telomerikus szekvencia motívum detektálása a centroméra régiójában már az ember, állat és más növényekkel kapcsolatos korábbi tanulmányokban is leírása kerültek (Ruiz-Herrera et al. 2008). Nyárral végzett FISH kísérletekben az *Arabidopsis*-típusú telomerikus ismétlődő szekvencia próbák eredménye minden kromoszómának a középponttól távol eső végén adott jelet. A szerző nem figyelt meg hibridizációs jelet a centroméra régiójában (Islam-Faridi et al. 2009a,b). Búzából izolált riboszómális próbát használták a nyírfa fajok (*Betula* L.) kromoszóma FISH analíziséhez is (Anamthawat-Jónsson 2003). A plazmid DNS a kukorica 18S-28S rDNS inszertjével hibridizációs próbaként szolgált a gesztenye (*Castanea dentata*), kromoszóma komplementereinek meghatározásához (Islam-Faridi et al. 2009a,b).

2.5.5. A *Salix viminalis* L. molekuláris citogenetikai vizsgálata során alkalmazott marker DNS próbák jellemzése

Kísérleteink során kilenc jelölt DNS próbát alkalmaztunk, amelyek többsége a búza és rokon fajából, valamint az *Arabidopsis thaliana*-ból származott.

Vrána et al. (2000) szerint a GAA mikroszatellit szekvencia a *Triticum aestivum* L. genomi DNS-éből került felszaporításra. A pSc119.2 klón 120 ismétlődő bázispárt tartalmaz, amely a rozs *EcoRI* maradvány DNS-éből származik, amit a *King II*-vel illesztettek be a *pBR322* plazmidba (Bedbrook et al. 1980). A pTa71 klónozott 18S-5.8S-26S riboszómális DNS próba, amely a búza nagyobb riboszómális génjeit képviseli (Gerlach és Bedbrook 1979). A pTa794 rDNS klón a *Triticum aestivum*-ból származik, tartalmazza a 410 bázispár *BamHI* fragmentumot, amely magában foglalja a gének közötti szakaszt és az 5S rDNS géncsalád részét. (Gerlach és Dyer 1980). A HT100.3 teloméra specifikus ismétlődő (TTTAGGG)_n szekvenciát az *Arabidopsis thaliana* L.-ből izolálták és szaporították fel (Juchimiuk-Kwasniewska et al. 2011). A pAl1 178 bázispárból álló tandem ismétlődő szekvenciáját szintén az *Arabidopsis thaliana* L.-ből klónozták (Martinez-Zapater et al. 1986). Az *Aegilops tauschii*-ből izolált pAs1 DNS próba úgynevezett D-genom specifikus klón a *Triticeae* törzsekben, és megközelítőleg 1,2 kb inszertet tartalmaz (Rayburn és Gill 1986). Az ismétlődő szekvenciák sok családját klónozták búzából vagy közeli rokon fajokból. Ezek a szekvenciák összehangolt tandemet alkotnak, és a kromoszóma régiók, kromoszómák és a genom azonosítására használt citológiai markerekként szolgálnak. Az Afa-family ismétlődő szekvenciákat (Nagaki et al. 1995) az árpa, (*Hordeum vulgare* L.) genomi DNS-éből szaporították fel. Az Afa-family szekvenciája 340 bázispárból álló tandem ismétlődő szekvencia, amely alapján véve szubklónja a pAs1-nek. A pAs1 inszertje három egység ismétlődő szekvenciából áll. Mindegyik egység 336 vagy 337 bp és nagy homológiát mutatnak egymással (Nagaki et al. 1995). A ZCF1 centroméra specifikus próba (Cheng és Murata 2003), amelyet a búza genomi DNS-éből izoláltak.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. A kísérleti alapanyag és fajta kiválasztása

A kísérletek megtervezésénél a nemesítési célok meghatározása mellett kulcsfontosságú lépés a megfelelő fajta, nemesítési alapanyag kiválasztása, amely döntően befolyásolja a kísérletünk sikerességét és eredményét.

Kísérleteinket a Kreátor 2005. Kft. által nemesített és szaporított „ENERGO” (*Salix viminalis* L., 2n=2x=38) energiafűz fajtaival végeztük.

3.2. A dugványok tárolása, előkészítése és üvegházi kísérleti körülmények beállítása

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 PVC csővel magasított műanyag virágcserepekbe 19 cm-es mélységben helyeztük el a dugványokat. A talaj 30%-ban marosi homok és 70 %-ban kerti komposzt föld (FLORIMO) keverékéből állt. A növényeket üvegházban, 16 óra mesterséges megvilágítás/ 8 óra sötét periódus, 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.

3.3. Tetraploid fűz vonalak előállítása az oldalhajtások rügyeinek kolchicin kezelésével

Az üvegházból izolált 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 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ -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 megkezdttük az *in vitro* mikroszaporításukat. Az így regenerált növénykéek 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.

3.3.1. A genommet meghatározása különböző módszerekkel

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

3.3.1.1. Ploidszint meghatározása áramlási citometria alkalmazásával

A kolhicinnel kezelt *in vitro* és üvegházi körülmények között nevelt egyedek ploidszintjének megállapításához áramlási citometria vizsgálatot végeztünk, amelyhez a növények gyökércsúcsából vettünk mintát. A megsebzett, agaron vagy vízben gyökeresített, két hetes dugványok gyökércsúcsa megközelítőleg 5-10 mm. Az áramlási citometria vizsgálatot egy BD FACSCalibur típusú flow citométerrel végeztük 532 nm-es zöld szilárd félvezető áramkörű lézerrel 30 mV-on. A vizsgálatához szükséges sejtmagok kinyerésére jégen tartott 55 mm átmérőjű petricsészében, 1 ml Galbraith pufferben (Galbraith et al. 1983) borotvapengével 15

mg gyökércsúcsot vágunk fel nagyon apró darabokra. A puffer összetevői a 0,2 M Tris-HCl, 45 mM MgCl₂, 30 mM Na-citrát, 20 mM morfolinpropán szulfonát és 1 v/v %-os Triton X-100, az oldat pH-ja 7-es. Az így kapott szuszpenziót leszűrtük egy 40 µm-es átmérőjű nejlonszűrővel. A sejtmagokat 10 perccel a flow citometria vizsgálat előtt 1 µg/ml koncentrációjú propídium-jodid oldattal festettük meg, hogy jól detektálhatók legyenek a gép számára. A sikeres analízis elengedhetetlen feltétele a magas, minimum 5000 darab feletti részecskeszám mintánként. Az elemzett relatív fluoreszcens intenzitás értékek alapján összehasonlíthatók, valamint azonosíthatók a diploid és tetraploid minták. A ploidszint egyenletessége letesztelhető az adott növény gyökeres szár dugványainak ismételt felhasználásával.

3.3.1.2. A tetraploid jelleg meghatározása citogenetikai vizsgálattal

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. A kromoszómák vizualizálásához 2 mg/ml DAPI festést alkalmaztunk, majd Olympus FV1000 konfokális lézer mikroszkóppal detektáltuk őket.

3.4. A tetraploid genotípusok üvegházi és szántóföldi körülményekhez történő adaptálása és felszaporítása

Mind a tetraploid, mind a kontrol diploid állományt üvegházi körülmények között neveltük tovább és szaporítottuk fel. A gyökereztetett dugványok gyökeréből vett mintákkal visszaellenőriztük a ploidszintet áramlási citometria alkalmazásával. A vonalak további szűrésével és szelekciójával folytattuk a tetraploid állomány vegetatív szaporítását és fenntartását. A következő lépcsőben a fűz dugványok szabadföldi körülmények közé történő tavaszi kiültetése lehetővé tette a szár- és hajtásnövekedés analízisét *in vivo* környezeti feltételek között (7. ábra). Kezdetben az *in vitro* kultúra szolgáltatta a már azonosított, független, tetraploid növényanyagunk alapját az üvegházi kiültetésekhez.

A talaj előkészítését tárcsás-boronával végeztük el, műtrágyázást nem alkalmaztunk. Mivel a különböző genotípusokból felhasználható növények száma limitált volt, így egysoros ültetéssel, 1 m-es sortávval, 50 cm-es tőtávval telepítettük

az állományt. Átlagosan öt-hat növényt használtunk fel genotípusonként a szabadföldi vizsgálatokban. A növekedési időszak végén az egy éves fűz vesszőket visszavágtuk a tél folyamán. Az elsődleges és másodlagos növekedési időszak alatti 8 napos periódusban folyamatosan mértük és figyeltük az újonnan fejlődő hajtások növekedési rátáját április vége és május első napjai között. Ebben az időszakban az átlagos nappali hőmérséklet 21,5 °C, az átlagos éjszakai hőmérséklet 9 °C volt.



7. ábra: Az autotetraploid Poli Plusz fűz genotípusok gyűjteménye a szegedi tenyészkertben nyáron és télen.

3.5. Az autotetraploid genotípusok szár- és gyökernövekedésének fenotipizálása

A növényfajok variabilitásán alapuló fenotipizálási tanulmányokban (Tackenberg 2007; Golzarian et al. 2011; Fehér-Juhász et al. 2014) a zöld pixelek arányának értékeivel meghatározható a zöld levél/szár felület aránya, így a zöld biomassa tömeg is, melynek eredménye összehasonlítási alapul szolgálhat a különböző genotípusok elkülönítésére.

Az Európai Növény Fenotipizálási Hálózat (European Plant Phenotyping Network) tagjaként az MTA Szegedi Biológiai Kutatóintézete rendelkezik egy félautomata fenotipizálási platformmal, amelyet már korábban használtak az árpa és búza növények föld feletti részének fenotipizálásához (Cseri et al. 2013, Fehér-Juhász et al. 2014). Az alvó rügyekkel rendelkező dugványokat az egyedi azonosíthatóság érdekében chip jelöléssel ellátott plexi csövekbe ültettük, 80% virágföldből és 20% homokból álló talajkeverékbe. A plexi csöveket PVC csövekbe helyeztük, majd véletlenszerű kísérleti elrendezésben állítottuk be a különböző, vizsgált tetraploid fűz genotípusokat. Minden vizsgált genotípus esetében 3 tálcát használtunk fel, amelyen tálcánként 5 növény kapott helyet. Az üvegházi

körülmények között a megvilágítás intenzitása hozzávetőlegesen $400 \mu\text{mol foton/m}^2/\text{s}$ volt. Hetente egyszer öntöttük és készítettünk digitális képeket a vizsgált genotípusok egyedeiről. Az alvó rügyekből a szár fejlődését a cserepek 51,4 fokos forgatásával hét különböző pozícióból fotóztuk Olympus C7070WZ digitális kamera használatával. Az SZBK által fejlesztett képelemző szoftver használatával a digitális fényképeken meghatároztuk és elkülönítettük a növényekhez kapcsolódó zöld pixelek számát, ami a szár és levél felületéből származott. A fenotipizálási kísérlethez használt berendezést a 8. ábra mutatja be.



8. ábra: A fűz növények fenotipizálása digitális képfeldolgozással.

Ugyanezt a fenotipizálási rendszert kisebb módosításokkal a kezdeti gyökérfejlődés vizsgálatára is alkalmaztuk. A plexi csövekbe ültetett dugványok gyökereit négy különböző oldalsó pozícióból és alulról fényképeztük. A gyökérhez kapcsolódó fehér pixelek azonosítását a fekete színű talaj háttérének kivonásával végeztük. A cső falán megjelenő gyökerek felületének metrikus értéke a 4 oldalsó pozíció és az alulról mért értékek összeadásából válik meghatározhatóvá. A hét hetes fenotipizálási kísérlet befejeztével a gyökeres dugványok gyökereit eltávolítottuk. A gyökértömeg meghatározásának céljából előbb megmértük a nedves gyökértömeget, majd $21 \text{ }^\circ\text{C}$ -on egy nap szárítást követően a száraz gyökértömeget is.

3.6. A tetraploid genotípusok CO₂ fixációjának mérése

A gázcsere paramétereit méréséhez, a CO₂ felvétel mértékének meghatározásához, a transpiráció és a sztóma konduktancia méréséhez a Licor 6400 gas analyzer (LI-COR) készüléket használtuk. A méréshez üvegházi körülmények között nevelt fűz növények teljesen kifejlett fiatal, a hajtáscsúcstól számított ötödik-hatodik leveleit használtuk fel, amelyeket a gáz küvettába helyeztünk. A gáz küvetta kísérleti körülményei 400 µl/l környezeti CO₂-ra, 22 °C-os hőmérsékletre és 400-450 µmol/m²/s növekvő fényintenzitásra állítottuk be Mulkey és Smith (1988) és Taiz és Zeiger (2010) protokolljai alapján.

3.7. Az alkalmazott statisztikai módszerek

A diploid és tetraploid minták tulajdonságainak összehasonlítására a statisztikai analízis során a Welch-féle kétmintás t-próbát alkalmaztuk. A Welch-féle t-teszt a Student-féle t-próbának egy adaptációja, amely sokkal megbízhatóbb értéket ad bizonyos esetekben, ha egyenlőtlenek a minták méretei vagy varianciája (Ruxton 2006). Továbbá többszemponos összehasonlító elemzést is végeztünk a posthoc Tukey-féle HSD (honestly significant difference) teszt által követett variancianalízis felhasználásával, ahol a Tukey-féle HSD teszt 0,05-ös értékre volt beállítva, amely további, szigorúbb szignifikancia küszöbértéket adott a tetraploidok diploidokkal történő összehasonlításakor. A Welch-féle t-próba szignifikancia szintjeit csillaggal jelöltük, amelyeket a Tukey-féle HSD próba eredményei alapján húztunk alá. Ritkább esetben a Tukey-féle teszttel kiszámolt P érték egy magasabb szignifikancia intervallumba esett a t-próbával nyert P értékkel összehasonlítva. Ebben az esetben aláhúzással jelöltük az adott részt a táblázatokban. Minden statisztikai elemzésünket az R statisztikai elemző szoftver (R Core Team; <https://www.R-project.org/>) használatával végeztük (Dudits et al. 2016).

Minden genotípus minden egyes növényének a tulajdonságait megmértük, és 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. A fenotipizálási tanulmányok adatainak elemzését egy Matlab szoftver (2008b verzió) alapú, házi fejlesztésű szoftvercsomag képfeldolgozó eszközkészletével (MathWorks) végeztük (Dudits et al. 2016).

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

3.8.1. Citológiai preparátumkészítés

Az energiafűz esetében egy új citológiai preparátumkészítési módszer kidolgozása vált szükségessé. A jelen kutatásunk során enzimátikus emésztéssel távolítottuk el a sejtek sejtfalát és citoplazmáját, amely módszert már korábban sikerrel alkalmaztak számos növényfajnál, mint a lúdfű, paradicsom, rizs, stb (Fransz et al. 1996, Zhong et al. 1998, Sasaki et al. 2002). A Linc et al. (1999) által leírt protokoll kisebb módosítása lehetővé tette a fűz kromoszómák molekuláris citogenetikai vizsgálatát.

A mitózis metafázisában történő kromoszómavizsgálathoz a fűz 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 fűz növénykékről ekkor levágtuk az 1-1,5 cm hosszúságú gyökereket, majd jeges vízzel telt fiolába helyeztük és jégen tároltuk további 24 órán át. A gyökereket ezt követően Carnoy oldatban (etil alkohol és ecetsav 3:1 arányú keveréke) 5 napig 4 °C-on fixáltuk. A gyökereket a fixálást követően 2 × 10 percig steril vízzel, majd ismét 2 × 10 percig citrát pufferben mostuk. A citológiai preparátum készítéséhez 1 %-os sejtfalbontó enzimkombinációt alkalmaztunk, amely 0,33 % pektináz, 0,33 % pektoliáz és 0,33 % citohelikáz enzimet tartalmazott. Gyökérmintánként 400 µl enzim-mixet és 800 µl citrát-puffert használtunk fel. A gyökereket 3 órán át 37 °C-on inkubáltuk eppendorf-csővekben. Az emésztést követően az enzimet steril vizes mosással eltávolítottuk a gyökerekről. Ezután a mitotikus kromoszómapreparátum készítésekor a gyökércsúcsot levágtuk és 45 %-os ecetsavban, tárgylemezen szétnyomva fáziskontraszt mikroszkóp alatt vizsgáltuk. A megfelelő preparátumokról, amelyeken 8-10 sejt megfigyelhető, a kromoszómák átfedése nem számottevő, a citoplazma mennyisége pedig elenyésző, a fedőlemezt folyékony nitrogénben történő fagyasztás után eltávolítottuk. Az elkészült citológiai preparátumokat etanol sorozatban (70 %, 90 %, abszolút etanol) 2 × 5 percig víztelenítettük, majd szobahőmérsékleten kiszárítottuk. A további felhasználásig (FISH, kromoszómák detektálása DAPI-val) -20 °C-on tároltuk.

3.8.2. A *Salix viminalis* L. kromoszómák kariotipizálása FISH módszerrel

3.8.2.1. 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:

1. Az Afa family próba egy 260 bp hosszúságú repetitív DNS szekvenciát hordozó fragmentum, amelyet az *Ae. tauschii*-ből izoláltak (Nagaki et al. 1995).
2. A GAA mikroszatellit szekvencia a *Triticum aestivum* L. genomi DNS-éből lett felszaporítva (Vrána et al. 2000).
3. A HT100.3 teloméra specifikus ismétlődő (TTTAGGG)_n szekvencia, amelyet az *Arabidopsis thaliana* L.-ből izolálták és szaporították fel (Juchimiuk-Kwasniewska et al. 2011).
4. A pAl1 178 bázispárból álló tandem ismétlődő szekvencia, amelyet szintén az *Arabidopsis thaliana* L.-ből klónozták (Martinez-Zapater et al. 1986).
5. A pAs1 az *Aegilops tauschii*-ből izolált DNS próba, amely megközelítőleg 1,2 kilobázisos inszertet tartalmaz (Rayburn és Gill 1986).
6. A pSc119.2 a rozsból izolált 120 bp hosszú repetitív DNS (Bedbrook et al. 1980);
7. A pTa71 búzából izolált 9,05 kb hosszúságú, klónozott 18S-5.8S-26S riboszómális DNS próba (Gerlach és Bedbrook 1979).
8. A pTa794 rDNS klón a *Triticum aestivum* L.-ből származik és tartalmazza az 5S rDNS géncsalád részét (Gerlach és Dyer 1980).
9. A ZCF1 centroméra specifikus próba (Cheng és Murata 2003), amelyet a búza genomi DNS-éből izoláltak.

A DNS próbákat DIG-és Biotin Nick Transzlációs mixxel 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.

3.8.2.2. A fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH)

Az energiafűzre optimalizálva kisebb módosításokkal Linc et al. (1999; 2012) módszerét alkalmaztuk a fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) során. A hibridizációt megelőzően a preparátumokat 20-30 percig 37 °C-on felmelegítettük (a -20 °C-os tárolás után). A melegítést követően a minták RNS tartalmát RN-áz kezeléssel (22,5 µl 10 mg/mL RN-áz 2 × SSC-ben oldva, 37 °C-os vízfürdőben, 35-60 percig) távolítottuk el. Ezt követően a preparátumokat 2 × 3-5 percig mostuk 37 °C-on vízfürdőben 2 × SSC-ben. Ezután a kromoszómákat utófixáltuk 4 %-os paraformaldehiddel szobahőmérsékleten 10 percig, majd 3 × 2 perces mosási lépés következett 2 × SSC-ben, szobahőmérsékleten. A preparátumokat jéghideg 70 %, 90 % és 100 %-os etanol sorozatban dehidratáltuk 3-3 percig, végül szobahőmérsékleten szárítottuk. 20 µl hibridizációs keveréket alkalmaztunk preparátumonként, amely 50 % formamidot, 10 % 20 × SSC-t, 10 % DS-t, 1 % SDS-t, 1 µg/ml jelölt DNS próbát és 50 ng/µl blokkoló DNS-t (lazac sperma DNS, Sigma Aldrich) tartalmazott. A hibridizációs keveréket a benne lévő próbával és blokkoló DNS-sel 8 perc 35 másodpercig 85 °C-on denaturáltuk és a felhasználásig jégen tartottuk. A kromoszómákat denaturáltuk 75 °C-on 6 percig, majd a preparátumokat (eltávolítva róluk a fedőlemezt) jeges etanol sorozatban (70 %, 90 %, 100 %) 3 × 5 percig mostuk. A mosási lépés után szobahőn szárítottuk. A megszáritott tárgylemezekhez hozzáadtuk a 20 µl hibridizációs mixet és 37 °C-os termosztátban párás dobozban inkubáltuk overnight. A hibridizációt követően a nem kötődő DNS szakaszok eltávolítására 2 × 5 percig 4 × SSC-TWEEN-ben 42 °C-on mostuk a tárgylemezeket. A mosást követően a detektáláshoz preparátumonként 50 µl fluoreszcens antitestet alkalmaztunk. A digoxigenin-16-dUTP és biotin-11-dUTP detektálását anti-digoxigenin-rodamine Fab fragmentum (Roche) és streptavidin-FITC (Roche) hozzáadásával végeztük. A biotinnal jelölt próbák hibridizációs jeleit a zöld fluoreszcens jelet adó sztreptavidin-FITC-el (Roche) (10 µg/ml TNB pufferben feloldva), a digoxigeninnel jelölt próbákat a piros jelet adó anti-digoxigenin-rodaminnal (Roche) (10 µg/ml TNB pufferben feloldva), a biotin és digoxigenin keverékéből együttesen sárga fluoreszcens jelet adó sztreptavidin-FITC és anti-digoxigenin-rodaminnal (10 µg/ml TNB pufferben feloldva) detektáltuk 37 °C-on 40 percig. A detektálás után 2 × 3 percig 4 × SSC-TWEEN-ben, majd 1 × 2 percig 1 × PBS oldatban mostuk szobahőmérsékleten a lemezeket. A kontrasztfestéshez

mintánként kimértünk 2 µg/ml 4',6-diamidino-2-fenilindolt (DAPI) és 0,1 µg/ml Vectashield fakulásgátló oldatot (Vector Laboratories).

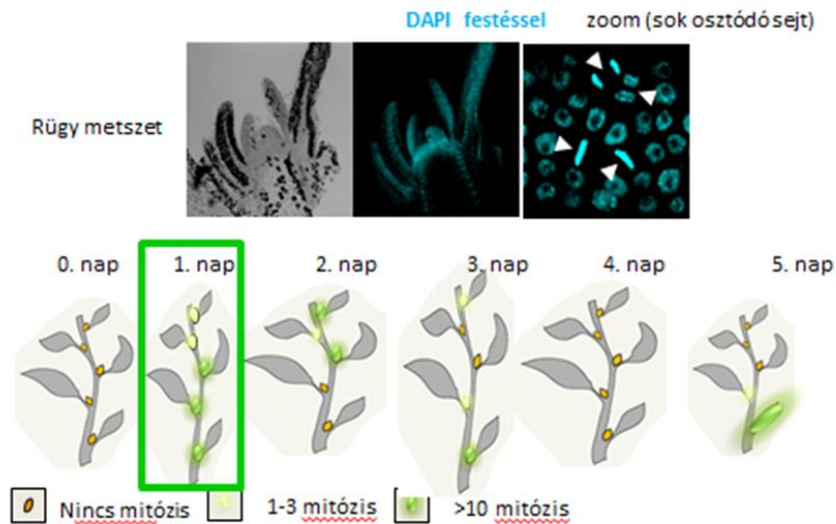
Az *in situ* hibridizációs jeleket Zeiss Axioscope 2 epifluoreszcens mikroszkóppal (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen, Németország) vizsgáltuk. A hibridizációs jeleket a DAPI (Zeiss filter set 1), a FITC (Zeiss filter set 10), a Rodamin (Zeiss filter set 15), valamint a FITC és Rodamin (szimultán detektálására Zeiss double filter set 24) gerjesztési és emissziós spektrumaira érzékeny szűrőkön keresztül és Spot CCD camera (Diagnostic Instruments, Inc. USA) fényképezőgép használatával fényképeztük. A fényképek kiértékeléséhez az Image-Pro Plus 5.1 (Media Cybernetics, USA) szoftvert használtuk.

4. EREDMÉNYEK

4.1 A *Salix viminalis* „ENERGO” fajta autotetraploid változatainak előállítás

Az energiafűz nemesítésben a 2014-ben lezárult Gazdasági Operatív Program (GOP) nyújtotta lehetőség keretében sikerült az energiafűz aktivált oldalrügyeinek kolhicin kezelésével poliploid vonalakat előállítanunk. Ezek a Poli Plusz (PP) elnevezésű fűznövények több előnyös tulajdonsággal is rendelkeznek a biomassza tömeg növelése és a kedvezőtlen klímahatásokkal szembeni tolerancia szempontjából.

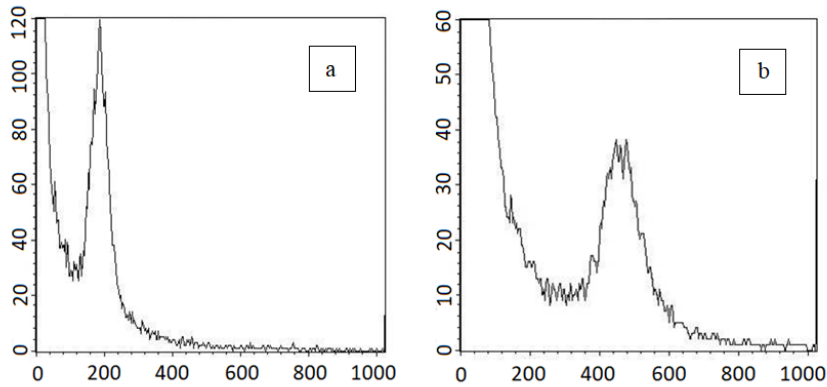
A kolhicin a mikrotubulus kialakulását gátló alkaloida, amelyet változatos módszerekkel alkalmaznak a magok kezelésében, vagy a csírázó magok csúcsi merisztémáin. Az *in vitro* tenyésztett szövetek differenciálódási lehetőségei ideális explantumokat szolgáltathatnak a poliploid sejtek és regeneránsok előállítására (Tang et al. 2010., Cai és Kang 2011.). A kísérleteink során a fűz ENERGO fajtaváltozatának szárszöveiből indított kallusztenyészetekben nem sikerült hajtásregenerációt indukálni, ezért a poliploidizációs protokoll optimalizálásával az aktivált oldalrügyeket kolhicinnel kezeltük. Az *in vitro* nevelt fűz magoncok szárának csúcsi merisztémáját eltávolítottuk, ami a mitotikus sejtek aktiválódását eredményezte. Ezt jól mutatták a citológiai metszetek (9. ábra). Az axilláris merisztémák sejtjeinek mitózisát a kolhicin vegyület gátolta, ami a kromoszómák számának megduplázódásához vezetett. A kezelt rügyekből kinőtt hajtásokat visszavágtuk és újragyökeresítettük.



9. ábra: A rügmetszetek mikroszkópos képe DAPI festés előtt és azt követően. A sematikus növényeken a zöld színnel jelölt rügek minimum 10 osztódó sejtet tartalmaznak, a fehér színnel jelölt rügek 1-3 osztódó sejtet tartalmaznak, míg a narancssárga színnel jelölt rügekben nem volt látható a sejtosztódás (Ayaydín F. [n.a.]

4.1.1. A diploid és tetraploid fű genotípusok azonosítása a gyökérsejtek áramlási citometria görbéinek kiértékelésével

A korai fejlődési stádiumban lévő tetraploid jelölt növények gyökércsúcsából áramlási citometria alkalmazásával elvégeztük az egyedek ploidszintjének vizsgálatát. Az áramlási citometria hisztogramja (10. ábra) 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. A horizontális tengelyen a görbe csúcsa a diploid vonal esetében a 200-as értéknél látható, míg a tetraploid jelölt egyedek görbéjének csúcsa eltolódva, a 400-as vagy e feletti értékeket mutatja.



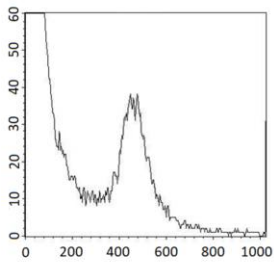
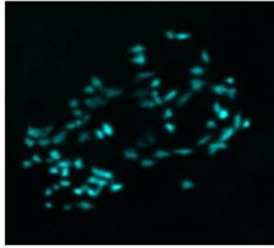
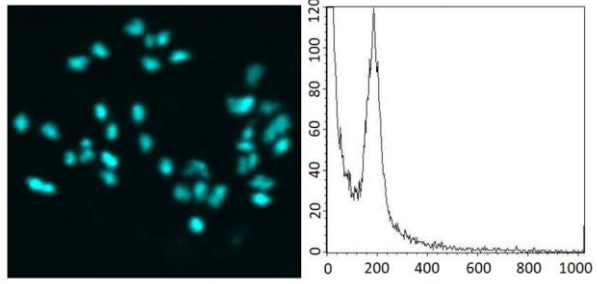
10. ábra: A diploid és a tetraploid vonalakban a DNS tartalom kimutatása propidium-jodid festéssel és az áramlási citometria görbéinek összehasonlítása:

a: A diploid kontrol vonal áramlási citometria görbéjének eredménye a horizontális tengelyen 200-as értéknél látható; b: A tetraploid jelölt vonal áramlási citometria görbéjének eredménye a horizontális tengelyen 400 és 600-as közötti értéknél látható

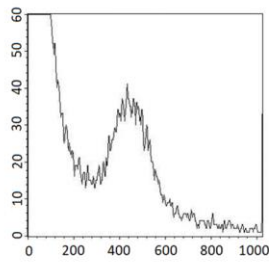
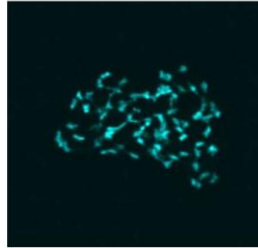
4.1.2. Az energiafűz növények genomméretének meghatározása a metafázisos kromoszómák száma alapján

A kétszeres DNS tartalmú PP-E (Poli Plusz ENERGO) növényeket először flow citometriával válogattuk ki, majd a kromoszómák tényleges számát a fűzre optimalizált citológiai protokoll alkalmazásával határoztuk meg. A diploid „ENERGO” növények gyökérsajtjeiben $2n=2x=38$, míg a tetraploid növények sejtjeiben $2n=4x=76$ kromoszómát lehetett megszámolni. Tizenhat különböző autotetraploid vonalat sikerült azonosítanunk a fűzre optimalizált és kidolgozott eljárással. Az előállított fűz genotípusok citológiai preparátumait első lépésben fázis kontraszttal, majd a kromoszómafestést követően konfokális fluoreszcens lézermikroszkóppal vizsgáltuk. A következő ábra (11. ábra) mutatja a diploid és tetraploid vonalak áramlási citometria és kromoszóma analízis eredményeit. A citológiai preparátumkészítés során ügyeltünk a megfelelő mitotikus index elérésére és azokat a preparátumokat választottuk ki, ahol a kromoszómák jól láthatók, az átfedésük minimális és a citoplazma mennyisége elenyésző.

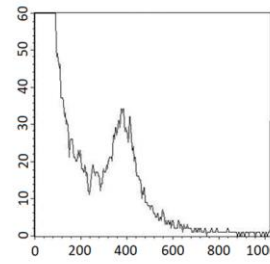
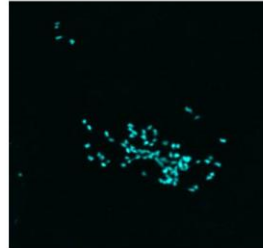
Diploid
 $2n=2x=38$



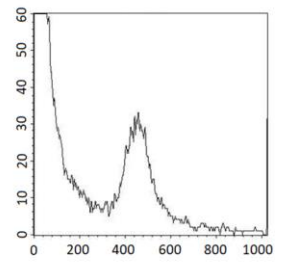
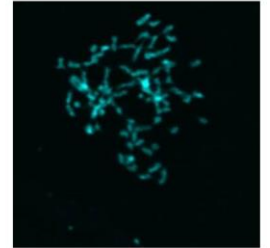
PP-E1



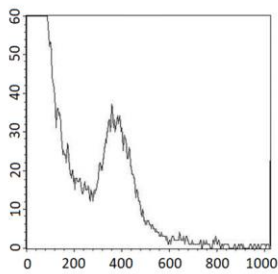
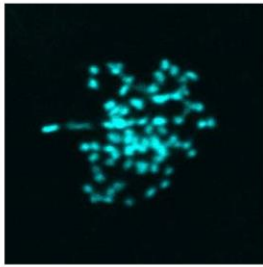
PP-E2



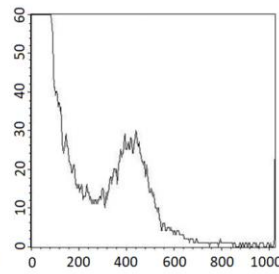
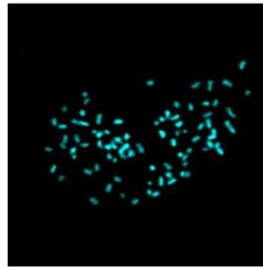
PP-E3



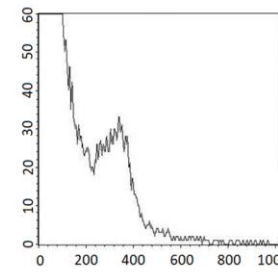
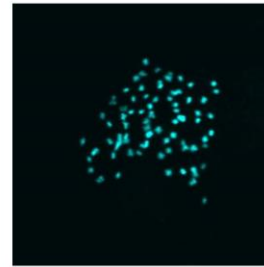
PP-E4



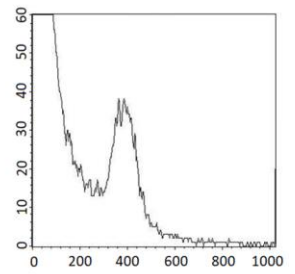
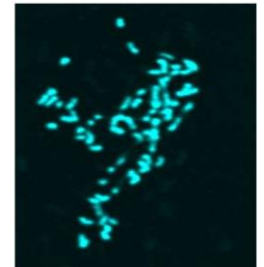
PP-E5



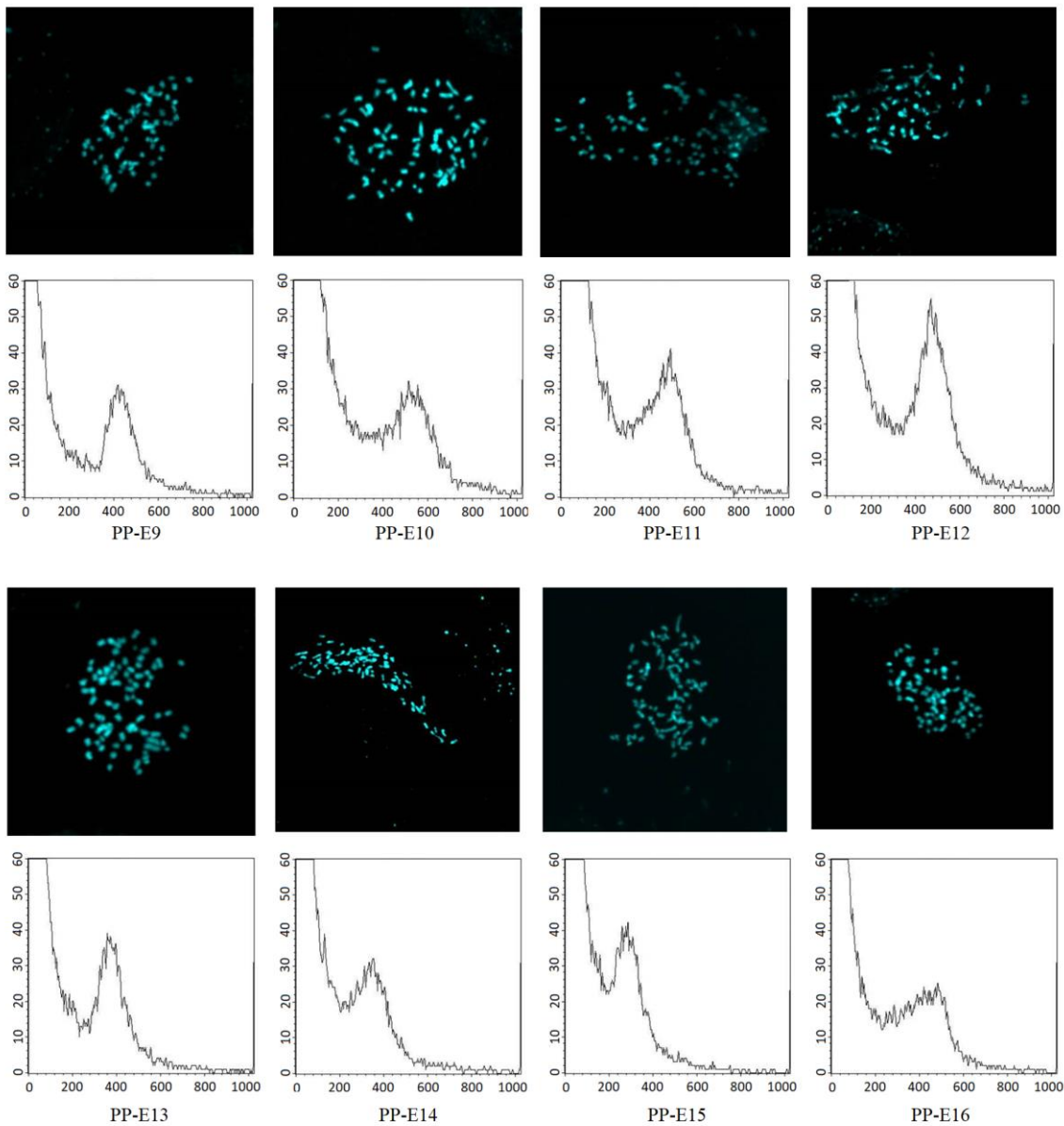
PP-E6



PP-E7



PP-E8



11. ábra: A diploid ($2n=2x=38$) és PP-E1-PP-E16 ($2n=4x=76$) autotetraploid fű genotípusok azonosítása kromoszómaszám meghatározással (DAPI festés alkalmazásával) és relatív DNS tartalmuk analízise áramlási citometria méréssel (propidium-jodid alkalmazásával). A megnövekedett sejtméret és kromoszómaszám az autotetraploid fű genotípusok áramlási citometria görbéjének csúcsát a horizontális tengelyen a 400-as érték felé tolta, míg a diploid genotípus esetében a 200-as értéknél látható.

4.1.3. Az előállított autotetraploid fűz genotípusok főbb morfológiai bélyegeinek jellemzése

A poliploidizáció hatására bekövetkezett jelentős funkcionális és alaktani változásokról részletesen beszámoltunk a 2016-ban megjelent közleményünkben. Ezek az új tulajdonságok a biomassza hozamot is jelentős mértékben meghatározzák. Ezek között a változások között említhetők a nagyobb levélméret, továbbá a szár megvastagodása, valamint a gyökér denzitásának növekedése.

4.1.3.1. A genoméret megduplázásnak hatásai a levél fejlődésére

A több független autotetraploid energiafűz vonal átfogó jellemzése során megállapítható, hogy a genoméret változásának 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 (12. ábra), azonban a levelek hosszúsága az egyes genotípusokban igen változatos, néhol mérsékelt csökkenést is mutatott a diploid vonalhoz képest (13. ábra).

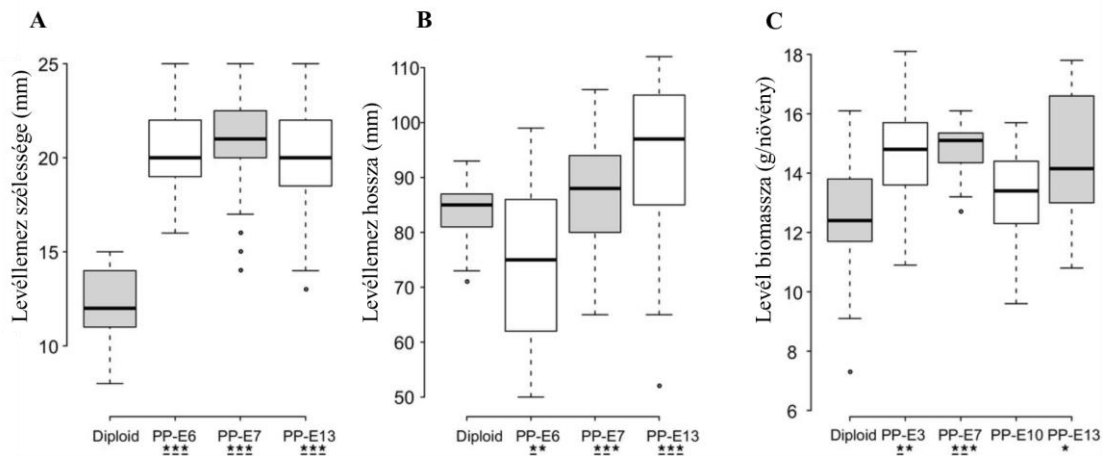


12. ábra: A: a nagyobb a kromoszómaszámmal ($2n=4x=76$) rendelkező Poli Plusz energiafűz tetraploid növényekre vastag szár és hajtásátmérő, valamint nagy levélfelület jellemző. B: a diploid energiafűz



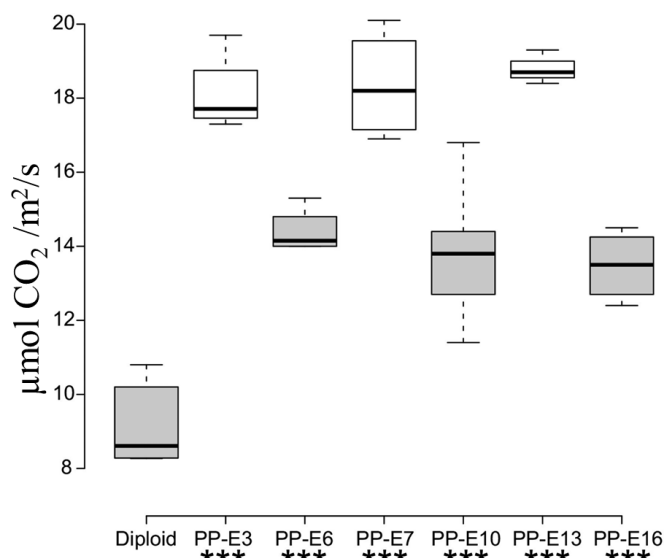
13. ábra: Az autotetraploid fűz genotípusok levélméreteinek morfológiai összehasonlítása a diploid genotípussal

Ezeknek a méretbeni különbségeknek a fokozódó hatása általában jól tükrözi a tetraploid növények megnövekedett teljes levél biomasszáját is (14. ábra). A Poli Plusz ENERGO tetraploid genotípusok nagyobb levélzete kulcsfontosságú lehet a biomassza tömeg növekedésében.



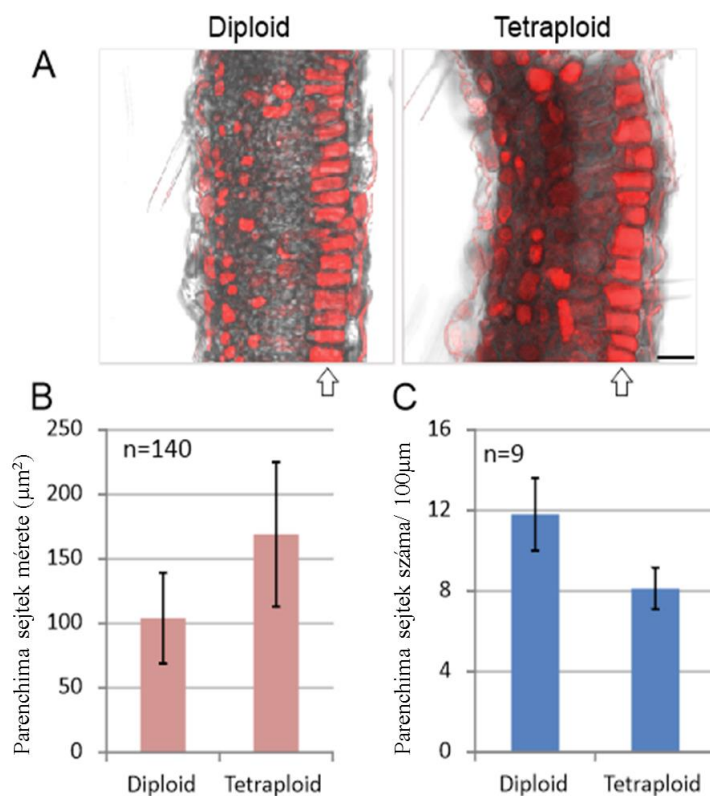
14. ábra: Az autotetraploidizáció hatása a levéllemez méretére. A: a tetraploid genotípusok levéllemez szélessége szignifikánsan nagyobb a diploid genotípusénál; B: a diploid és tetraploid genotípusok levéllemez hosszúságának összehasonlítása; C: A tetraploid genotípusok nagyobb levél biomassza hozamot produkáltak a diploid genotípushoz képest. A diploid genotípusokhoz viszonyítva a tetraploid genotípusok esetében a statisztikailag szignifikáns differenciát a Welch-féle t-próba alkalmazásával mutattuk ki. A szignifikancia erősségének szintjét, amelyet a P értéke határoz meg, csillaggal jelöltük: *** (magas) ha $P < 0.01$; ** (közepes) ha $P < 0.05$ és * (alacsony) ha $P < 0.1$. Az aláhúzott csillagok jelölik a szignifikancia szintet, amely a Tukey-féle HSD próba posthoc-eredmények összehasonlításán alapul

A PP-E tetraploid genotípusok nagyobb méretű levelei jobb fényhasznosítási hatékonyságuknak köszönhetően hozzávetőlegesen kétszeres mennyiségben fixálták a széndioxidot egységnyi levélfelületen (15. ábra). Ezzel együtt a megnövekedett fotoszintetikus asszimiláció során nagyobb a szerves anyag felhalmozódás mértéke is, amely kedvező hatással van a biomassza hozam növelésére, például a fahozam produktumra. A sztóma konduktivitási és transzspirációs adatokat a közleményünk tartalmazza (Dudits et al. 2016).



15. ábra: Az autotetraploid fűz növényeknek hatékonyabb a CO₂ megkötése a diploid genotípussal szemben. A Welch-féle t-próba és a Tukey-féle HSD posthoc teszt alapján kimutatható, hogy statisztikailag a szignifikáns differencia mértéke milyen szintű a diploid genotípus eredményeihez viszonyítva a tetraploid genotípusok esetében. A diploid és tetraploid genotípusok P < 0.01 valószínűségi szinten szignifikánsan különböznek egymástól, amelyet ***-gal jelöltünk az ábrán

A genomduplikáció hatása a tetraploid genotípusok leveleiben nemcsak külső morfológiai, illetve élettani változásokat eredményezett. 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 (16. ábra).

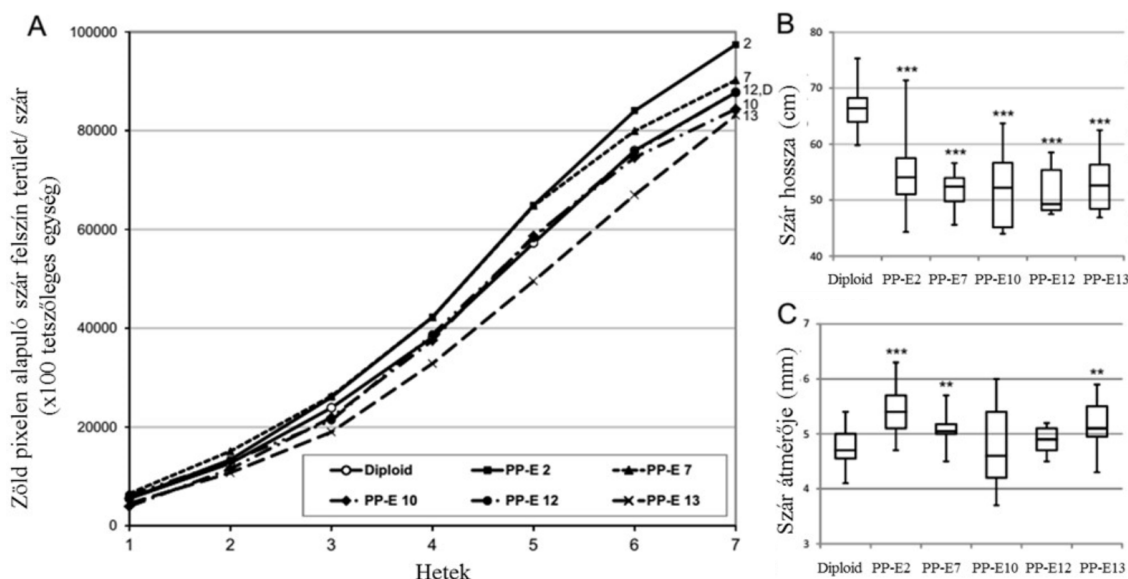


16. ábra: A diploid és a tetraploid fűz genotípusok paliszád parenchima sejtei; A: a diploid és tetraploid fűz növények levél keresztmetszetének összehasonlítása; B: a vizsgált parenchima sejtek átlagos méretének összehasonlítása; C: a parenchima sejtek száma egységnyi távolságon belül.

4.1.3.2. A genomméret megduplázásának hatásai a szár fejlődésére

A fűz növények hajtásfejlődés vizsgálatára a digitális képalkotásra alapozott fenotipizálás módszerét alkalmaztuk, mely lehetővé tette a földfeletti zöld biomassza tömeg kvantitálását több héten át (17/A ábra). Az alvó rüggyekkel rendelkező fűz dugványokat egy speciálisan kialakított cserépbe és egy átlátszó plexi csőbe ültetve neveltük üvegházi körülmények között. A vizsgált tetraploid és diploid genotípusok egyedeinek megfigyelése során a különböző fejlődési stádiumokban fotókat készítettünk, a növények föld feletti részéről (8. ábra). 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 (17/B ábra). Ez azonban a hajtások zöld pixelszámában statisztikailag nem mutat szignifikáns differenciát, ami feltehetően

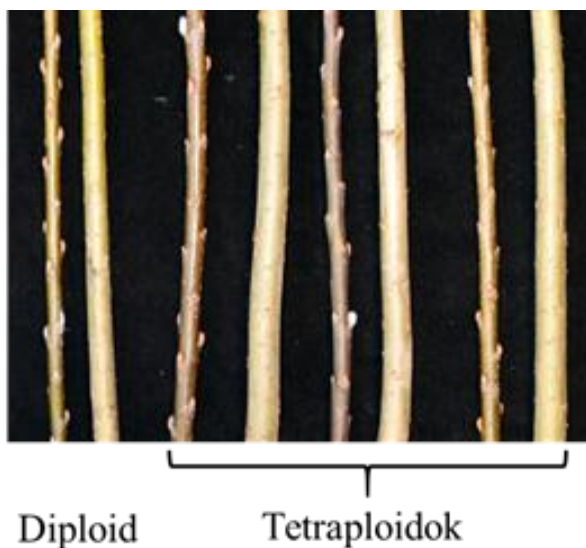
néhány más tényezőtől eredhet, mint például a szárátmérő, levélszám, levélméret, és a levélnyel felülete. A szár átmérőjének megvastagodása mindazonáltal szembetűnő volt a tetraploid genotípusok esetében (17/C ábra).



17. ábra: A diploid és a tetraploid fűz genotípusok szár fejlődésének különböző paraméterei; A: a diploid és a tetraploid vonalak föld feletti biomassza hozamnövekedésének összehasonlítása a zöld pixelek számán alapuló fenotipizálás módszerével; B: a diploid és a tetraploid genotípusok szár hosszúságának összehasonlítása esetében negatív irányú szignifikáns különbség volt megfigyelhető; C: a diploid és a tetraploid genotípusok szár átmérőjében megmutatkozó szignifikáns differencia mértéke három tetraploid genotípus esetében volt kimutatható. A tetraploid genotípusok a Welch-féle t-próbán alapuló statisztikailag szignifikáns különbséget mutató eredményeinek összehasonlítása a diploid genotípusok eredményeihez viszonyítva. A szignifikancia erősségének szintjét csillaggal jelöltük:

*** P <0.01 és ** P <0.05 valószínűségi szinteken

A diploid és a tetraploid növények föld feletti részeinek analízise üvegházi és szántóföldi körülmények között zajlott, a fenotipizálását hét héten át végeztük. A hetedik hét végén a mért szárhosszúság 20-25%-kal alacsonyabb értéket mutatott a tetraploid növények elsődleges szárhosszúságában a diploid genotípushoz képest. A rövidebb szárhossz kapcsolatban van a felerősödött másodlagos szárnövekedéssel, amelynek szemmel látható eredménye a jelentősen megvastagodott szár átmérő valamennyi tetraploid genotípusban (18. ábra).



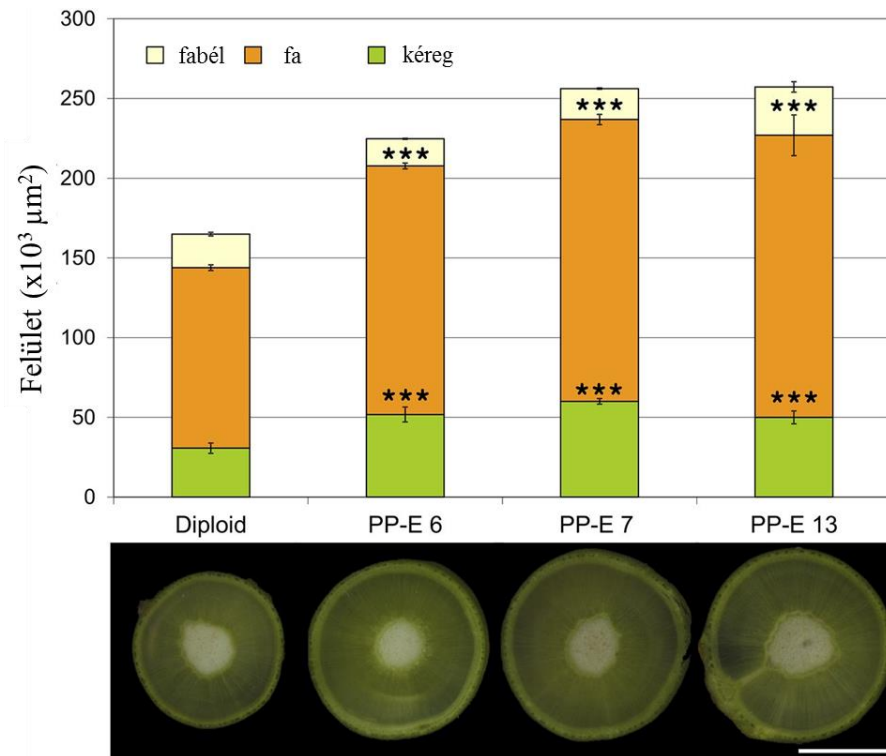
18. ábra: A tetraploid genotípusokat jelentősen vastagabb a szár jellemzi a diploid genotípusokhoz képest

A szántóföldi körülmények között tavasszal az alvó rügyekből újrakhajtott hajtások növekedésének intenzitását az elsődleges és másodlagos növekedés vizsgálatával jellemeztük. A hajtásfejlődés kezdeti időszakában, az üvegházi kísérlethez hasonlóan, szintén az összes autotetraploid genotípusban a csökkent elsődleges növekedés volt megfigyelhető a diploid genotípushoz képest, amely a hajtáshossz mérési eredményeiben nyilvánult meg. A másodlagos növekedés jellemzésére a szár átmérőjének vastagságát mértük, amelynek eredményeit az 1. táblázat foglalja össze.

1. táblázat: A diploid és a tetraploid genotípusok szár paramétereinek mérési eredményei és szignifikancia szintjei. A tetraploid genotípusok szár hosszúságában mért eredmények alul maradtak a diploid genotípus eredményéhez képest, és szignifikáns különbséget mutatnak. Ellenben a szár átmérő vastagságának esetében a tetraploid genotípusok felülmúlták a diploid genotípus eredményeit, amely esetben szintén kimutatható volt a szignifikáns differencia. A Welch-féle t-próbán alapuló statisztikailag szignifikáns különbséget mutató mérési eredmények összehasonlítása a tetraploid genotípusokban a diploid genotípusok eredményeihez viszonyítva: a szignifikancia erősségének szintjét csillaggal jelöltük a különböző valószínűségi szinteken, *** P <0.01, ** P <0.05 és * P <0.1. Az aláhúzott csillagok jelölik azt a szignifikancia szintet, amely a Tukey-féle HSD próba posthoc-eredmények összehasonlításán alapul.

Genotípusok	Szár hosszúság 0. nap	Szár hosszúság 8. nap	Elsődleges növekedés	Szár átmérője 0. nap	Szár átmérője 8. nap	Másodlagos növekedés, szár átmérője
	<i>cm</i>		<i>cm/8 nap</i>	<i>mm</i>		<i>cm/8 nap</i>
Diploid	52.02 ± 3.79	83.08 ± 7.04	31.07 ± 4.24	5.76 ± 0.77	6.59 ± 0.60	0.82 ± 0.21
PP-E2	42.68 ± 2.39***	68.36 ± 4.57***	25.68 ± 0.99***	6.31 ± 0.41*	7.27 ± 0.71**	0.96 ± 0.35
PP-E3	39.48 ± 3.64***	64.96 ± 5.61***	25.48 ± 1.47***	6.33 ± 0.66	7.59 ± 0.68*	1.26 ± 0.18***
PP-E4	38.60 ± 2.63***	63.90 ± 7.59***	25.30 ± 1.56**	6.33 ± 0.60*	7.22 ± 0.45*	0.89 ± 0.01
PP-E5	38.66 ± 2.20***	60.93 ± 4.28***	22.27 ± 2.69***	5.99 ± 0.54	7.01 ± 0.55	1.02 ± 0.22
PP-E6	36.46 ± 2.73***	58.74 ± 4.92***	22.28 ± 2.86***	5.87 ± 0.51	6.85 ± 0.63	0.98 ± 0.35
PP-E7	37.56 ± 2.55***	58.16 ± 3.24***	20.60 ± 4.99***	6.09 ± 0.50	6.76 ± 0.54	0.68 ± 0.17
PP-E12	42.09 ± 3.59**	69.76 ± 4.36**	27.67 ± 2.39**	5.90 ± 0.53	7.46 ± 0.64**	1.56 ± 0.21***
PP-E13	40.36 ± 2.74***	66.28 ± 4.41***	25.92 ± 2.28***	5.97 ± 0.50	7.12 ± 0.54*	1.15 ± 0.26***

A táblázatban szereplő adatok jól tükrözik a tendenciát, mely szerint a vizsgált tetraploid fűz növények mindegyike kivétel nélkül vastagabb szárát fejlesztett a diploid fűz növényekkel szemben. A mért eredmények a másodlagos növekedésben jelentős szignifikanciát mutattak (1. táblázat). A tetraploid fűz növények megvastagodott szár átmérője egy olyan anatómiai változás, amely feltehetően a megduplázódott genommet következményeként alakult ki. A tetraploid fűz genotípusok vesszőinek keresztmetszeteiben megfigyelhető az elsődleges és másodlagos xilem gyűrűk szignifikáns növekedése és a vastagabb kéreg fejlesztése a diploid genotípushoz képest (19. ábra).

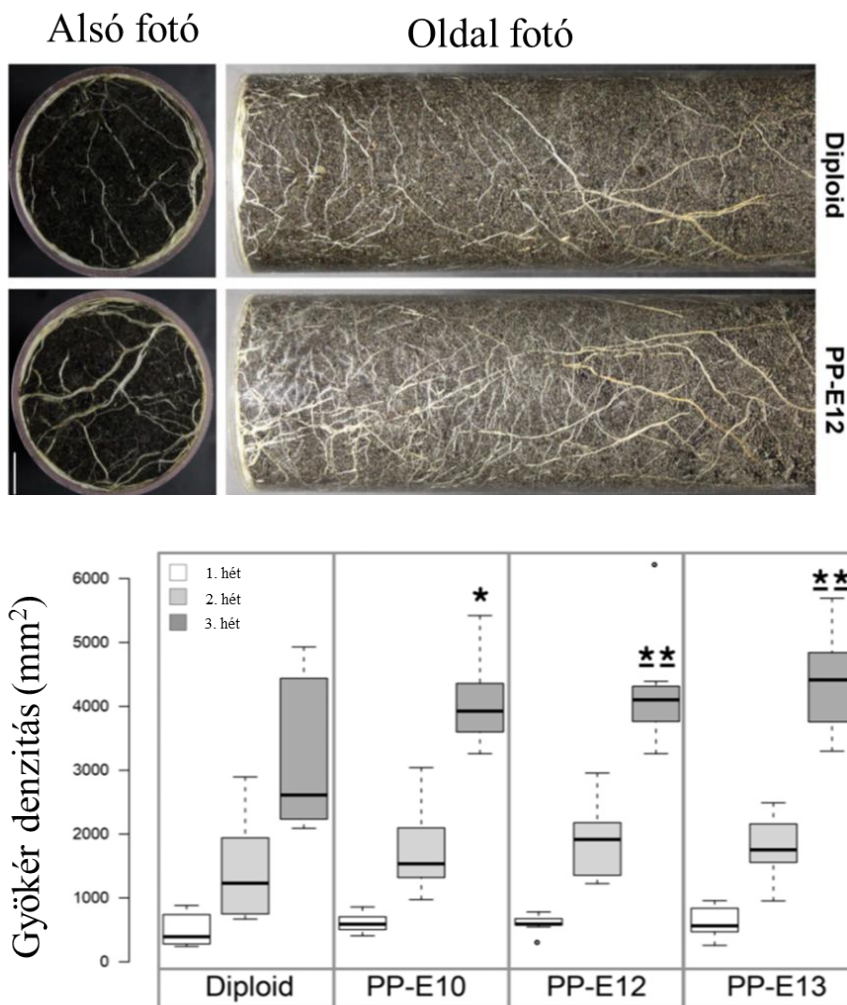


19. ábra: A diploid és a tetraploid fűz genotípusok fás szárában a különböző régiók megoszlási arányának és keresztmetszeteinek összehasonlítása. A tetraploid genotípusokban szignifikáns differencia figyelhető meg a szárvastagságban, amely a fabél, fa és kéreg arányában is megfigyelhető a diploid genotípushoz képest. Méretarány = 0,5 cm. A Welch-féle t-próba és a Tukey-féle HSD posthoc teszt alapján összehasonlítható a diploid és tetraploid genotípusok kéreg és fa régiókban mért eredményei, amely statisztikailag magas szintű szignifikáns differenciát mutatott $P < 0.01$ valószínűségi szinten, amelyet az ábrán ***-gal jelöltünk

4.1.3.3. A genom méret megduplázásának hatásai a gyökérrendszer fejlődésére

A gyökér fenotipizáláshoz használt speciális berendezéssel a fűz vonalak gyökérrendszerének növekedését vizsgáltuk. A plexi csőbe ültetett dugványok gyökereiről, 4 oldalról és a cső aljáról digitális fotókat készítettünk, majd a tetraploid növények jól fejlett, megnövekedett gyökérrendszerét összehasonlítottuk a diploid növényekével. A diploid és tetraploid genotípus közti különbségeket az összegzett fehér pixelek számának kiértékelésével határoztuk meg. Bebizonyosodott, hogy csupán a növekvő fehér pixel számokkal nem fejezhető ki az egész gyökér biomassza mennyisége. Azonban ez a megközelítés a genotípusok gyökernövekedési rátája közti különbségek kimutatására sikerrel alkalmazható. A gyökérfejlődés első három

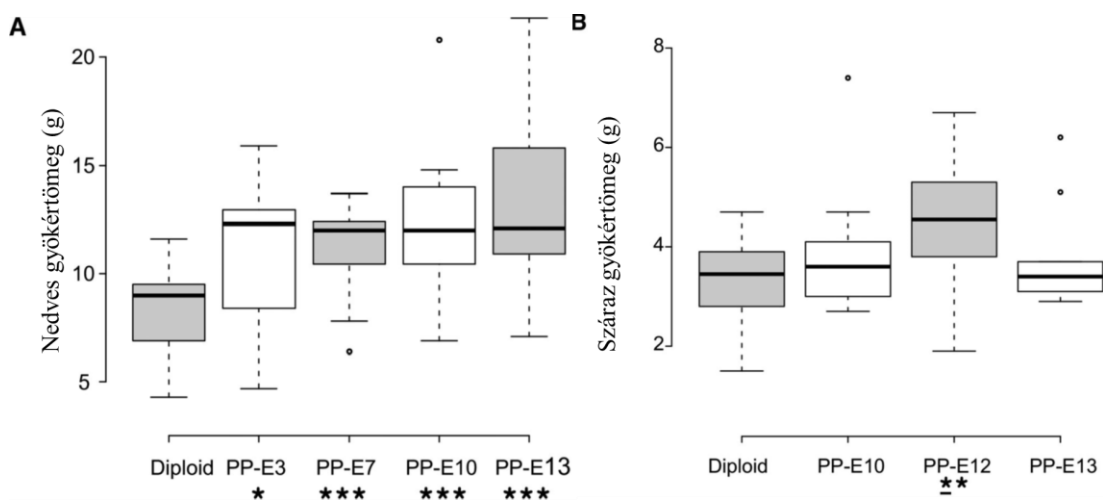
hetében a rügyes tetraploid genotípusú dugványok jelentősen magasabb gyökér denzitással rendelkeztek diploid társaikénál (20. ábra).



20. ábra: A diploid és a tetraploid fűz genotípusok gyökérfejlődésének és a gyökér denzitás mértékének összehasonlítása. A diploid genotípusban a gyökér denzitása jelentősen kisebbnek bizonyult a tetraploid genotípusok gyökér denzitásához viszonyítva. A Welch-féle t-próba alapján a diploid és tetraploid genotípusok közötti statisztikailag kimutatható szignifikáns különbségeket $P < 0.05$ valószínűségi szinten ** -gal, és $P < 0.1$ valószínűségi szinten * -gal jelöltük. Az aláhúzott csillagok szignifikancia szintje a Tukey-féle HSD teszt posthoc-eredményének összehasonlításán alapul

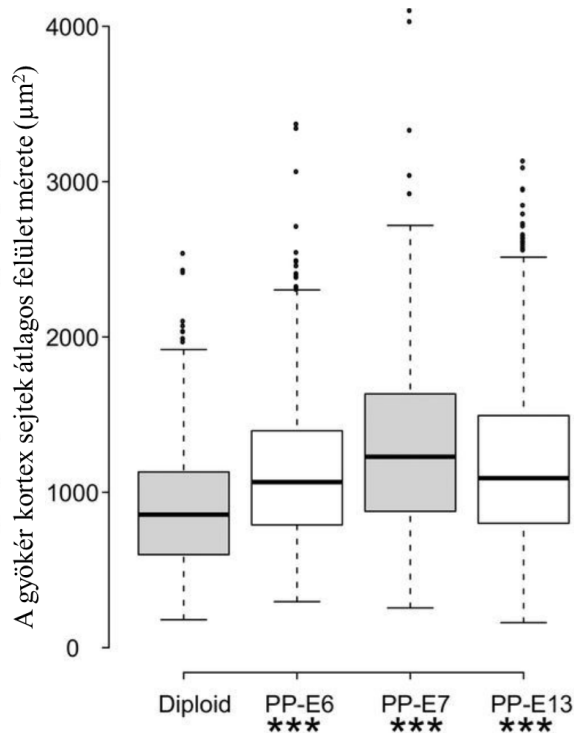
A gyökér denzitásának mérési eredményeiből a gyökér biomassa hozama is megbecsülhető a fejlődés korai időszakában. A hét hetes növekedési időszak után az autotetraploid fűz növények fejlettebb gyökérrendszerüknek köszönhetően nagyobb nedves gyökértömeggel rendelkeztek a diploid növényekkel szemben. Azonban a

száraz gyökértömeg mérési eredményéből megállapítható, hogy a diploid és tetraploid genotípusok közötti szignifikáns differencia kevésbé hangsúlyos, amelyet feltehetően a különböző nedvességtartalom okozott (21. ábra).



21. ábra: A diploid és a tetraploid fűz genotípusok gyökértömegeinek összehasonlítása; A: a tetraploid genotípusok nagyobb nedves gyökértömege szignifikáns különbséget mutatott a diploid genotípusokhoz képest; B: mind a diploid, mind a különböző tetraploid genotípusok között is eltérés mutatkozott a száraz gyökértömeg tekintetében, amely esetében csak a PP-E12 tetraploid genotípus mérési eredményében mutatkozott szignifikáns differencia a diploid genotípus eredményéhez viszonyítva. A Welch-féle t-próba alapján a diploid és tetraploid genotípusok közötti statisztikailag kimutatható szignifikáns különbségeket $P < 0.01$ valószínűségi szinten ***-gal, $P < 0.05$ valószínűségi szinten ** -gal és $P < 0.1$ valószínűségi szinten *-gal jelöltük. Az aláhúzott csillagok szignifikancia szintje a Tukey-féle HSD teszt posthoc-eredményének összehasonlításán alapul

A gyökerek keresztmetszetének vizsgálatakor szintén kimutatható volt a szignifikáns differencia a diploid és tetraploid gyökerek anatómiájában. A megduplázódott genommérettel rendelkező növényekben nagyobb gyökér cortex sejtek találhatóak (22. ábra)



22. ábra: A diploid és a tetraploid genotípusok gyökér cortex sejtméretének összehasonlítása. A tetraploid genotípusokra jelentősen nagyobb gyökér cortex sejtek voltak jellemzők, mint a diploid genotípusok esetében. A Welch-féle t-próba és a Tukey-féle HSD posthoc teszt alapján, a tetraploid genotípus és a diploid genotípus eredményei egymáshoz hasonlítva $P < 0.01$ valószínűségi szinten különböznek egymástól, amelyet az ábrán ***-gal jelöltünk

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

A fűz metafázisos metacentrikus kromoszómái hasonlóak, átlagosan 5 µm alatti méretűek és másodlagos szerkezetek nem láthatók rajtuk. Ez a morfológiai tulajdonság azonban kevés ahhoz, hogy a 19 kromoszómapár és a kromoszómák egyedileg is megkülönböztethetők és azonosíthatók legyenek. A fűz genomjának genetikai térképezése mellett a faj kromoszóma szerkezetét még nem tanulmányozták alaposabban. Az általánosan használt FISH protokollt fűzre optimalizáltuk és alkalmaztuk a különböző kromoszómák elkülönítésére. Fontos a genom helyzetének tanulmányozása molekuláris szinten, még ha ismert is az összetétele a repetitív DNS szekvenciáknak.

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

Célunk egy olyan FISH-alapú protokoll kidolgozása volt, amely alkalmas a fűz kromoszómák kariotipizálására. A FISH a jelölt heterológ DNS próbákon alapuló módszer, amellyel megvalósítható a kromoszómák és a kromoszómapárok azonosítása, ezáltal első lépésként a kariotípus részleges meghatározása. A fűz gyökércsúcsok teljes enzimatis emésztése kritikus lépése a preparátum készítésnek, amely a metafázisos kromoszómák megfelelő szétterülésével a hibridizációs jelek jó detektálhatóságát biztosítja. A gyökér szöveteinek citohelikáz enzimmel történő emésztése alapvető és nélkülözhetetlen része a megfelelő minőségű fűz citológiai preparátum készítésének. A preparátumokat DAPI festéssel ellenőriztük, majd kiválasztottuk a további kísérletekre alkalmas mintákat.

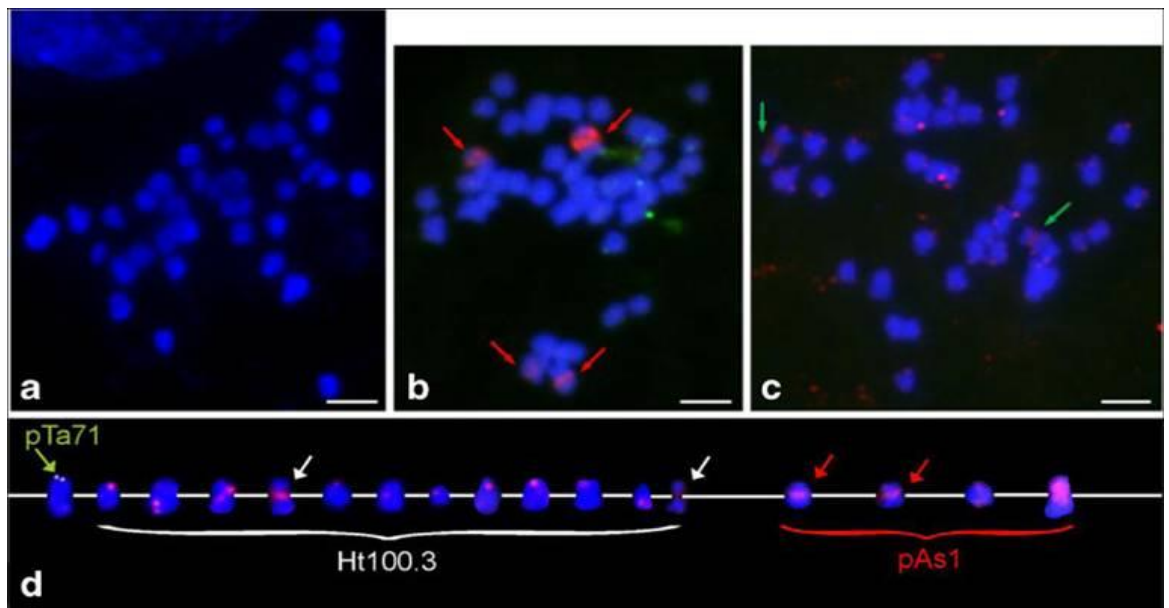
A kísérletünkben 9 jelölt repetitív DNS próbából három DNS klón mutatott egyértelmű hibridizációs jelet a fűz meghatározott, különböző kromoszóma régióin: a pAs1, a HT100.3 és a pTa71 rDNS klón (2. táblázat). A tanulmányozott ismétlődő DNS szekvenciák elrendeződése a genom molekuláris szintű tanulmányozásának egy fontos szempontja. A centromerikus markerként használt pAs1-jelölt DNS klón két kromoszómapáron adott jelet a centroméra régiójának közelében. A pAs1 a *Triticeae* fajtából származó D-genom specifikus klón és megközelítőleg 1 kb inszertet tartalmaz az *Aegilops tauschii*-ből. Az ismétlődő szekvenciák számos családját klónozták a búzából és rokon fajajiból. Ezek a szekvenciák tandem elrendezésben összehangolva citológiai markerként alkalmazhatók a genom, a kromoszómák és a kromoszóma régiók azonosítására. A jelen kutatásunk az első olyan tanulmány amelyben bemutatjuk két kromoszómapár pAs1 FISH mintázatát a fűzfajok között. Mindemellett a jelölt DNS próbaként alkalmazott Afa-family, amely egy 340 bázispárból álló tandem ismétlődő szekvencia, és alapvetően a pAs1 szubklónja, nem adott detektálható FISH jelet egy fűz kromoszómán sem.

A pAs1 inszertje az ismétlődő szekvenciák három egységéből áll. Minden egyes szekvencia 336 vagy 337 bp és magas homológiát mutatnak a másikkal. Egy egységen belül, ahol látszanak konzervatív és változó régiók, gyakran előfordul báziscsere az A T, vagy a T A bázisok között. Ez a jelenség fontos lehet a repetitív szekvenciáknak, hogy meg tudják tartani a struktúrájukat a különböző genom amplifikációk és permutációk során (Nagaki et al. 1995).

2. táblázat: A *Salix viminalis* L. FISH térképezés során alkalmazott különböző DNS próbák, jelölésük és detektálása a fűz kromoszómákon

DNS próba	Jelölés	Detektálható jel a fűz kromoszómákon
Afa family	Digoxigenin -16- dUTP	Nem
GAA	Biotin-11-dUTP	Nem
Ht100.3	Digoxigenin -16- dUTP	Igen
pA11	Biotin-11-dUTP	Nem
pAs1	Digoxigenin -16- dUTP	Igen
pSc119.2	Biotin-11-dUTP	Nem
pTa71	Biotin-11-dUTP	Igen
pTa794	Biotin-11-dUTP	Nem
	Digoxigenin -16- dUTP+ Biotin-11-dUTP	Nem
ZCF1	Biotin-11-dUTP	Nem

A Ht100.3 teloméra specifikus DNS próba a kromoszómák teloméráján mutatott hibridizációs jelet változó intenzitással. Továbbá a tiszta hibridizációs jel lekorlátozódott a két kromoszóma centroméra régiójára, amelyekről feltételezzük, hogy párok lehetnek. A pTa71 rDNS próba jele mindössze csak egy kromoszómapár egyik tagján volt egyértelműen detektálható a telomerikus régió közelében. A pAs1 DNS próba jelét négy fűz kromoszómán, azaz két feltételes kromoszómapáron tudtuk azonosítani a centroméra régiójának közelében. A 23. ábrán a fűz kromoszómákon detektált hibridizációs jelek alapján jól megkülönböztethetők a feltételes kromoszómapárok. A piros, zöld és fehér nyilak mutatják a FISH mintázatok alapján meghatározott feltételes kromoszómapárokat.



23. ábra: A *Salix viminalis* L. mitotikus kromoszómainak FISH mintázata heterológ DNS próbák alkalmazásával. a: A DAPI kontrasztfestéssel vizualizált *Salix viminalis* L mitotikus kromoszómái. b: A pAs1 DNS fragmentum FISH mintázata 2 kromoszóma teloméráján és 2 kromoszóma centroméra régiójának közelében volt detektálható, amelyet a piros nyilak mutatnak. c: A HT100.3 DNS próba FISH mintázata egyes kromoszómák telomerikus régiójában, míg más kromoszómák centroméra régiójának közelében volt detektálható. A mintázat alapján feltételezett kromoszómapárokat a zöld nyilak mutatják. d: A *Salix viminalis* L. kromoszómák FISH mintázata és a feltételes kromoszómapárok azonosítása: fehér nyilak mutatják a HT100.3 DNS próba FISH mintázata alapján feltételezett kromoszómapárt, piros nyilak jelölik a pAs1 DNS fragmentum FISH mintázata alapján feltételezett kromoszómapárt, zöld nyíl jelöli a pTa71 rDNS klón FISH mintázatát, amely egyetlen kromoszómán volt csak jelen. (Méretarány: 5 μ m)

Nagyon valószínűsíthető, hogy a detektált fűz kromoszómák tartalmazhatnak heterokromatikus ITSs-t (het-ITSs), egy nagy kiterjedésű teloméra-szerű DNS-t, amely főleg a centroméránál helyeződik.

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 gyökérzete 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.

Eredményeink nagy részét az alábbi cikkekben publikáltuk:

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

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, March 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: 1.902

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

5.1. A megduplázott genommérettel rendelkező energiafűz változatok azonosítása

A természetben sűrűn játszódnak le a *Salix* nemzetségben intersepcifikus és intraspecifikus hibridizációk, amelyek allopoliploid utódokat eredményeznek (Dorn 1976, Barcaccia et al. 2003). A nemesítés során a bokorfűzek biomassza hozamának növelése a keresztezési programokon alapul, amelyekkel szintén létre lehet hozni allopoliploid genotípusokat (Serapiglia et al. 2014). Ezen nemesítési munka eredménye gondoskodik az autotetraploidok részletes jellemzéséről és kibővíti az ismereteinket a rövid vágásfordulójú energiafűz mesterséges genom duplikációjának morfológiai és fejlődési következményeiről.

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. Sejtszinten a genom instabilitása előidézheti a kiméra, azaz mixoploid egyedek megjelenését. A kimérák diploid és tetraploid sejteket is tartalmaztak (Dudits et al. 2016).

A jelenlegi EU direktíva szerint a kromoszómaszám megsokszorozási technikája nem minősül GMO eljárásnak. Ezért ez a biomassza 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.

5.1.1. Az autotetraploidia hatása az elsődleges és másodlagos növekedésre

A növekedés jellemzése beleértve a biomassza felhalmozódást is, a növények digitális képfeldolgozásával követhető, amely az egyik alapvető eszköze a fenotipizálásnak (Golzarian et al. 2011., Hartmann et al. 2011). A zöld pixelekkkel összehasonlítható a zöld felszín területe, amellyel jellemezhető a hajtás biomassza mennyisége, valamint a lényeges különbségek a diploid és tetraploid vonalak között.

Ez a fenotípusos jellemző megmutatja a magasabb vagy alacsonyabb zöld biomassza produktivitást, így összehasonlíthatók a tetraploid és a diploid növények. A független autotetraploid nyírfa családok változatainak néhány fenotípusos jellemzője szintén megfigyelhető volt a magok kolhicin kezelését követően (Mu et al. 2012). Az egyes hajtások földfeletti biomassza paramétereinek egyedi tulajdonságának gondos vizsgálata szükséges a genom méret módosulás következményének mélyebb tanulmányozásához.

A fűz növényekben a genom megduplázását követően a szárhosszúság és a szár átmérő adatai jelentős eltérést mutattak. A szár hosszának csökkenése más tetraploid fajoknál is megfigyelhető volt (Särkilahti és Valanne 1990; Griffin et al. 2015). A diploid császárfák (*P. tomentosa*) 10%-kal magasabbak a tetraploid társaikénál (Tang et al. 2010), míg a tetraploid nyírfák 19%-kal voltak alacsonyabbak a diploid nyír vonalaknál (Mu et al. 2012). Az üvegházi kísérletünkben a vizsgált tetraploid vonalak tekintélyes változást mutattak a szárhosszúságban. Az előbbiekkal megegyezően az autopoliploidizáció következményeként több tetraploid fűz genotípus mutatta a szár átmérő megvastagodásával együtt járó szárhosszúság csökkenést. A mesterséges genom méret duplikáció tehát eltérő változást okozott a fás szárú növények elsődleges és másodlagos földfeletti növekedésében. Ez a két funkció összefüggésben van egymással a természetben, amelyet egy mediterrán félcserje fajokkal végzett tanulmány is alátámaszt (Camarero et al. 2013).

A mesterségesen előállított újfajta fűz genotípus az autotetraploid genomjával a nemesítő program tekintélyes eredménye, amelynek széleskörű hasznosítása a későbbiekben kiemelkedően jövedelmező lehet. A fás hajtások tömegének további növelése érdekében indokolt a triploid változatok előállítása. Az értekezésben bemutatott tetraploid változatok nemesítési értéke abban nyilvánul meg, hogy keresztezési partnerként szolgálnak a diploid \times tetraploid kombinációkban.

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

5.1.2. 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. Megnövekedett a levél biomasszája, amelyet a levél alakjának módosulásával a hosszabb, szélesebb levélfelület kísért. Ezek a jellemző fenotípusos tulajdonságok már ismertek más autotetraploid fásszárúakban (Ewald et al. 2009, Cai és Kang 2011, Harbard et al. 2012, Mu et al. 2012). A sejtszinten kívüli, a ploidfok változtatással előidézett levélméret növelése a fajok esetében kevésbé ismert. Az angolperje és a nádperje diploid és autotetraploid fű fajok kultúráiban már végeztek részletes vizsgálatokat, amelyekben bizonyították a poliploidok nagyobb levélméretét. A nagyobb levélméret eredménye a megnövekedett sejt elongációs ráta, de nem a hosszabb ideig tartó elongációs periódus. A megnövekedett végső sejt méret szintén közreműködött a levélméret változásában (Sugiyama 2005). A kinematikus módszer nem mutat szignifikáns különbséget a diploid és tetraploid tenyészetek sejtcsoportjának paramétereiben úgy, mint az osztódási rátában és a sejtciklus hosszában. A tetraploid fűz levelekben kevesebb, de nagyobb parenchima sejtek voltak megfigyelhetők (Dudits et al. 2016).

Korábban már kitértünk rá, hogy a nagyobb levélfelület 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.

Habár a jelen kutatásunk fő nézőpontjában a tetraploid genotípusok korai fejlődési stádiumában leírható biomassza hozamának jellemzése és a rövid vágásfordulóban történő alkalmazása áll. Az új genotípusok megfigyelése a morfológiai és fiziológiai tulajdonságokon alapul. Az autotetraploidizáció alkalmazása az új lehetőségekkel kombinálva jelentős növekedési előnyt eredményezhet, különösen a vegetatívan szaporított fajok továbbfejlesztésében.

5.1.3. Az autotetraploid energiafűz genommérete és a megnövekedett gyökérrendszer kapcsolata

Az autotetraploid fafajok fenotípusos jellemzésének eredményei korábban csak a növények földfeletti jellegeiről számoltak be (Balkesley et al. 2002, Ewald et al. 2009, Tang et al. 2010, Cai és Kang 2011, Harbard et al. 2012, Mu et al. 2012). Ez a tanulmány kibővíti az eddigi ismereteket és bemutatja a tetraploid energiafűz gyökérfejlődésének méretében és szerkezetében bekövetkezett lényeges változásokat a diploidokkal szemben. A dinamikusan fejlődő növényfenotipizálási kutatások eredményeként több alternatív módszer létezik már a gyökérrendszer növekedésének kíméletes monitorozásához, mint a talajnélküli közeg vagy a földdel töltött rhizotron (Dudits et al. 2016). A genotípusok közötti eltérés a gyökér biomasszában már az első hetekben dokumentálásra került. Az eredményeink azt igazolják, hogy a hosszú növekedési periódus után a tetraploid genotípusok jelentősen nagyobb gyökérbiomassza hozamot termeltek.

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

A Poli Plusz tenyészanyagok felszaporítása folyamatban van a szegedi tenyészkertben és a Beck Antal Erdészeti Csemetekertben (Borjád), illetve a NÉBIH elindította a DUS vizsgálatokat. Hasznosítása azonban csak abban az esetben lehetséges, ha az egyes változatok a felszaporításuk és értékelésük után bekerülnek a fajtaminősítési rendszerbe.

5.2. Az energiafűz molekuláris citológiai jellemzése és részleges kariotipizálása

A jelen értekezésben bemutatásra került az alkalmazott fluoreszcens *in situ* hibridizációs megközelítés előnye a fás szárú fajok genomjának molekuláris genetikai tanulmányozásában. A genetikai és természettani térképezési technológiák kombinálása a fafajok genomikájának a kutatásában és a kapcsolatban álló nemesítési programokban kiemelt, egyre növekvő figyelmet kap. A standard FISH protokoll optimalizálása nélkülözhetetlen előfeltétele a kísérleteknek. Az értekezésben leírt, heterológ próbák alkalmazásával elért eredmények alapjául szolgálhatnak és a jövőben felhasználhatók lehetnek az energiafűz kariotípusának elkészítésében. A további kísérletekben szükségessé válik a *S. viminalis* genomjából

fajspecifikus DNS klónok izolálása, és ezek felhasználása, amely miatt fontossá válik a FISH technológia ismételt optimalizálása is. Ezen DNS próbák alkalmazása molekuláris citológiai markerként új információt nyújthatnak majd a fűz kromoszómák FISH mintázatának tanulmányozásában (Németh et al. 2013). A fűz genom egyedi kromoszómáinak részletes citogenetikai analízise fontos szerepet játszhat majd a *Salix* fajok genomjának további, magasabb szintű tanulmányozásában.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A *Salix viminalis* L. ($2n=38$) egy diploid, kétszikű növényfaj, amely a *Salix* nemzetségbe és ezen belül a *Salicaceae* családba tartozik. Ezek a rövid vágásfordulójú fás szárú energianövények az egyik legfontosabb megújuló bioenergiaforrások világszerte

A rövid vágásfordulójú ültetvényben termesztett energiafűz (*Salix viminalis*) biomassza hozama függ a különböző növényi szervek szerkezetétől, funkciójától és a genom méretétől. Az oldalrügyek kolhicin kezelésének eredményeként autotetraploid fűz genotípusokat hoztunk létre. Az 'ENERGO' genotípusokból létrehozott Poli Plusz poliploid „ENERGO”, PP-E, ($2n=4x=76$) változatok földfeletti részét a zöld pixelek számának meghatározásán alapuló fenotípezálási vizsgálatnak vetettük alá. Megfigyelhető volt a hajtás biomasszájának a növekedése, amely elsősorban a nagyobb levélméretből és a vastagabb szár átmérőből származott. Az autotetraploidizáció lassabb elsődleges növekedést, de jelentős mértékű szárvastagodást eredményezett, a szántóföldi vesszőkben megnőtt a kéreg és a fa rétegvastagsága. A PP-E növények szélesebb levelet és vastagabb levéllyelet, valamint nagyobb parenchima sejteket fejlesztettek. A levelek morfológiai változásai jelentősen megnövelték a CO₂ fixáció hatékonyságát egységnyi levélfelületen, amely magasabb asszimilációs rátát és ezáltal nagyobb biomassza hozamot eredményez. A gyökér denzitásában és biomassza tömegében szignifikáns különbség mutatkozott a diploid és tetraploid genotípusok között. A tetraploid növények nagyobb méretű cortex sejtjei a gyökerek megvastagodását eredményezte. A bemutatott változatok, azaz a tetraploid fűz genotípusok jellemző tulajdonságai jól szemléltetik, hogy miként lehet az energianövényekben a különböző növényi szervek méretének fejlesztésével a biomassza hozamot növelni az autotetraploidizáció és a kromoszóma szerkesztés technikájának a felhasználásával.

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 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 site nem volt látható. A HT100.3 teloméra specifikus DNS klón jól kivehető jelet mutatott a centroméra régiójában. A pAs1 FISH jelét két kromoszómapáron azonosítottuk. A további kísérletek során a fűz kromoszómakészlet FISH mintázatának jellemzése lehet az alapja a fűz fajok kariotipizálásának.

7. SUMMARY

Salix viminalis L. ($2n=38$) is a diploid dicot species belonging to the *Salix* genus of the *Salicaceae* family. These short-rotation woody crops are the most important renewable bioenergy resources worldwide.

Biomass productivity of the energy willow *Salix viminalis* as short-rotation woody crop depends on organ structure and function that are under the control of genome size. Colchicine treatment of axillary buds resulted in a set of autotetraploid *S. viminalis* var. Energo genotypes: Poli Plusz polyploid Energo PP-E ($2n=4x=76$) with variation in the green pixel-based shoot surface area. We observed increased shoot biomass principally derived from larger leaf size and wider stem diameter. Autotetraploidy slowed down primary growth during early shoot development and increased the shoot diameter as parameter of secondary growth. The duplicated genome size enlarged bark and wood layers in twigs sampled from the field. The PP-E plants developed wider leaves with thicker midrib and enlarged palisade parenchyma cells. The morphological changes of leaves increased significantly the efficiency of CO₂ uptake relative to the leaf area. The efficiency of atmospheric CO₂ uptake by plants and of its photosynthetic assimilation into organic compounds as the building blocks of biomass has a major impact on wood production capacity. Autotetraploidization increased the biomass of the root system of PP-E plants relative to diploids. Sections of tetraploid roots showed thickening with enlarged cortex cells. The presented variation in traits of tetraploid willow genotypes provides a basis to use autopolyploidization as chromosome engineering technique to alter the organ development of energy plants in order to improve biomass productivity.

In breeding for high biomass productivity, limited knowledge is available on the molecular cytogenetics of willow, which could be combined with genetic linkage mapping. The present study describes the adaptation of a fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) protocol as a new approach to analyse the genomic constitution of *Salix viminalis* using the heterologous DNA probes: pSc119.2, pTa71, pTa794, pAs1, Afa family, pAl1, HT100.3, ZCF1 and the GAA microsatellite marker. Three of the nine probes showed unambiguous signals on the metaphase chromosomes. FISH analysis with the pTa71 probe detected one major 18S-5.8S-26S rDNA locus on the short arm of one chromosome pair; however, the pTa794 rDNA site was not visible. One chromosome pair showed a distinct signal around the centromeric region after FISH with the telomere-specific DNA clone HT100.3. Two chromosome pairs

were found to have pAs1 FISH signals, which represent a D-genome-specific insert from *Aegilops tauschii*. Based on the FISH study, a set of chromosomes with these presented characteristic patterns is presented, which could be used to establish the karyotype of willow species.

8. MELLÉKLETEK

M1. Irodalomjegyzék

- ANAMTHAWAT-JÓNSSON, K. (2003):** Preparation of chromosomes from plant leaf meristems for karyotype analysis and in situ hybridization. In: *Methods Cell Sci* (25) 91–95
- ANTAL, G. (2018):** Zöld növényi biomassza hasznosításának nemzetközi és hazai kilátásai. In: *International Journal of Engineering and Management Sciences (IJEMS)* Vol. 3. (2018). No. 3
- AYAYDIN, F. [n.a.]:** A rügymetszetek mikroszkópos képe DAPI festés előtt és azt követően. In: [k.n][h.n.]
- BAI, A. (1999):** Az energiaerdő, mint alternatív növénytermesztési ágazat. In: *Tiszántúli Mezőgazdasági Tudományos Napok, Debreceni Agrártudományi Egyetem, Konferencia Kiadvány, Debrecen, 125-130 p.*
- BARCACCIA, G., MENEGHETTI, S., ALBERTINI, E., TRIEST, L., LUCCHINI, M. (2003):** Linkage mapping in tetraploid willows: segregation of molecular markers and estimation of linkage phases support an allotetraploid structure for *Salix alba* × *Salix fragalis* interspecific hybrids. In: *Heredity* (90) 169–280
- BEDBROOK, J.R., JONES, J., O'DELL, M., THOMPSON, R.D, FLAVELL, R.B. (1980):** A molecular description of telomeric heterochromatin in *Secale* species. In: *Cell* 19:545–560
- BLAKESLEY, D., ALLEN, A., PELLNY, T.K., ROBERTS, A.V. (2002):** Natural and induced polyploidy in *Acacia dealbata* Link. and *Acacia mangium* Willd. In: *Ann Bot (Lond)* 90: 391–398
- BORHIDI A. (1998):** A zárvatermők fejlődéstörténeti rendszertana. In: *Nemzeti Tankönyvkiadó. Budapest.* p. 64-66., 134-135., 250-251.
- BUSOV, V., FLADUNG, M., GROOVER, A., STRAUSS, S. (2005):** Insertional mutagenesis in *Populus*: relevance and feasibility. In: *Tree Genetics & Genomes* 1: 135–142.
- CAI, X. ÉS KANG, X.Y. (2011):** In vitro tetraploid induction from leaf explants of *Populus pseudo simonii* Kitag. In: *Plant Cell Rep.* 30: 1771–1778.

- CAMARERO, J.J., PALACIO, S., MONTSERRAT-MARTÍ, G. (2013):** Contrasting seasonal overlaps between primary and secondary growth are linked to wood anatomy in Mediterranean sub-shrubs. In: *Plant Biol (Stuttg)* 15: 798–807
- CAMIA, A., ROBERT, N., JONSSON, R., PILLI, R., GARCÍA-CONDADO, S., LÓPEZ-LOZANO, R., VAN DER VELDE, M., RONZON, T., GURRÍA, P., M'BAREK, R., TAMOSIUNAS, S., FIORE, G., ARAUJO, R., HOEPFFNER, N., MARELLI, L., GIUNTOLI, J. (2018):** Biomass production, supply, uses and flows in the European Union. In: *First results from an integrated assessment, EUR 28993 EN, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2018, ISBN 978-92-79-77237-5, doi:10.2760/539520, JRC109869*
- CHENG, Z.J., ÉS MURATA, M. (2003):** A centromeric tandem repeat family originating from a part of *ty3/gypsy*-retroelement in wheat and its relatives. In: *Genetics* 164:665–672
- CSERI, A., SASS, L., TÖRJÉK, O., PAUK, J., VASS, I., DUDITS, D. (2013):** Monitoring drought responses of barley genotypes with semi-robotic phenotyping platform and association analysis between recorded traits and allelic variants of some stress genes. In: *Aust J Crop Sci* 7: 1560–1570
- 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.*
- DAI, X., HU, Q., CAI, Q., FENG, K., YE, N., TUSKAN, G. A., MILNE, R., CHEN, Y., WAN, Z., WANG, Z., LUO, W., WANG, K., WAN, D., WANG, M., WANG, J., LIU, J., YIN, T. (2014):** The willow genome and divergent evolution from poplar after the common genome duplication. In: *Cell Res.* 10: 1274–1277.
- DORN, R.D. (1976):** A synopsis of American Salix. In: *Can J Bot* 54: 2769–2789
- DUBOUZET, J. G., STRABALA, T. J., WAGNER, A. (2013):** Potential transgenic routes to increase tree biomass. In: *Plant Sci.* 212: 72–101.
- DUDITS D. ÉS GYÖRGYÉY J. (2013):** Zöld GMO-k. In: *Akadémiai Kiadó. Budapest.* 145. p.

- DUDITS D. (2014):** Új génebeszeti módszerek a növényi gének és genomok célzott szerkesztésében. In: *Zöld Biotechnológia*. 10. évf. 2014/7-8. Július-augusztus, 1-9.
- 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
- EHRENDORFER, F. (1991):** Evolution und Systematik. In: *Strasburger, E.: Lehrbuch der Botanik. 33. Aufl. – Springer Vlg.* p. 484-828.
- EUROPEN ENVIRONMENT AGENCY (2013):** Mix of energy crops, 2006–2008 and EEA scenario for environmentally compatible energy cropping in 2020. <http://www.eea.europa.eu/data-and-maps/figures/mix-of-energy-crops200620132008>. Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: energy crops, SRC, EU. Lekérdezés időpontja: 2016. 11.12.
- EWALD, D., ULRICH, K., NAUJOKS, G., SCHÖDER, M.B. (2009):** Induction of tetraploid poplar and black locust plants using colchicine: chloroplast number as an early marker for selecting polyploids in vitro. In: *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 99: 353–357
- FEHÉR-JUHÁSZ, E., MAJER, P., SASS, L., LANTOS, C., CSISZÁR, L., TURÓCZY, Z., MIHÁLY, R., MAI, A., HORVÁTH, G.V., VASS, I., DUDITS, D., PAUK, J. (2014):** Phenotyping shows improved physiological traits and seed yield of transgenic wheat plants expressing the alfalfa aldose reductase under permanent drought stress. In: *Acta Physiol Plant.* 36: 663–673
- FRANK N. (2008):** Az év fája. A törékeny fűz (*Salix fragilis* L.) erdőművelési tulajdonságai. In: *Erdészeti Lapok* 143 (9) p. 276-277.
- FRANZ, 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
- GARCÍA-CONDADO, S., LÓPEZ-LOZANO, R., NISINI, L., CERRANI, I., VAN DER VELDE, M., BARUTH, B. (2017):** Assessing EU crop residue production using empirical models of biomass partitioning. In: *Part 2: current scenario and drivers of inter-annual variability in residue biomass production across EU. In preparation.*
- GENCSI L. ÉS VANCSURA R. (1992):** Dendrológia. In: *Mezőgazda Kiadó. Budapest.* p. 382-411.
- GERLACH, W.L., BEDBROOK, J.R. (1979):** Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. In: *Nucleic Acids Res.* 7:1869–1885
- GERLACH, W.L., DYER, T.A. (1980):** Sequence organization of the repeating nits in the nucleus of wheat which contain 5S rRNA genes. In: *Nucleic Acids Res.* 8:4851–4865
- GOLZARIAN, M.R., FRICK, R.A., RAJENDRAN, K., BERGER, B., ROY, S., TESTER, M., LUN, D.S. (2011):** Accurate inference of shoot biomass from high-throughput images of cereal plants. In: *Plant Methods* 7: 2
- GUO, M., RUPE, M.A., WEI, J., WINKLER, C., GONCALVES-BUTRUILLE, M., WEERS, B.P., CERWICK, S.F., DIETER, J.A., DUNCAN, K.E., HOWARD, R.J., HOU, Z., LÖFFLER, C.M., COOPER, M., SIMMONS, C.R. (2014):** Maize *ARGOS1 (ZARI)* transgenic alleles increase hybrid maize yield. In: *J. exp. Bot.* (65) 249-260. p.
- GRIFFIN, A.R., CHI, N.Q., HARBAR, J.L., SON, D.H., HARWOOD, C.E., PRICE, A., VUONG, T.D., KOUTOULIS, A., THINH, H.H. (2015):** Breeding polyploid varieties of tropical acacias: progress and prospects. In: *Southern Forests.* 77: 41–50
- GYULAI, G., KERTI, B., ALI A.M. (2015):** Molecular barcoding of Sex-Linked DNA markers of dioecious plants. In: *Plant DNA Barcoding and Phylogenetics* 279-298 p.
- GYULAI, G., KIRÁLY, K., BITTSÁNSZKY, A., MALONE, P.R., GULLNER, G., KÓMÍVES, T. (2012):** Transzgénikus nyárfák (35S-*gshI-11ggs* és 35S-*rbcS-gshI-6lgl*) alkalmazása a fitoremediációban. In: *Zöld biotechnológia* (8) 2012/5-6 május-június 9-14. p.

- GYURICZA, CS. (2010):** Energetikai faültetvény létesítésére alkalmas fajok és fajták (1.), Fásszárú energianövények termesztése (2.). Megújuló energiaforrások. In: *Agrofórum*. 64–67. p.
- 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.
- GYURICZA CS. (Szerk.) (2014):** Energianövények, biomassza termelés és felhasználás. In: *6. tananyag. Gödöllő*, 143 p.
- HÄGGMAN, H., SUTELA, S., FLADUNG, M. (2016):** Genetic Engineering Contribution to Forest Tree Breeding Efforts. In: *Biosafety of Forest Transgenic Trees. Forestry Sciences*. 82: 11–29.
- HARBARD, J.L., GRIFFIN, A.R., FOSTER, S., BROOKER, C., KHA, L.D., KOUTOULIS, A. (2012):** Production of colchicine induced autotetraploids as a basis for sterility breeding in *Acacia mangium* Willd. In: *Forestry*. 85: 3427–3436
- HARTMANN, A., CZAUDERNA, T., HOFFMANN, R., STEIN, N., SCHREIBER, F. (2011):** HTPheno: an image analysis pipeline for high-throughput plant phenotyping. In: *BMC Bioinformatics*. 12: 148
- Houben, A., ORFORD, S.J., TIMMIS, J.N. (2005):** In situ hybridization to plant tissues and chromosomes. In: *In Situ Hybridization Protoc*. 326:203–218
- HUANG, Y., WANG, J., YANG, Y, FAN, C., CHEN, J. (2017):** Phylogenomic Analysis and Dynamic Evolution of Chloroplast Genomes in *Salicaceae*. In: *Frontiers in Plant Science*. 8:1050
- ISLAM-FARIDI, M.N., NELSON, C.D., DIFAZIO, S.P., GUNTER, L.E., TUSKAN, G.A. (2009a):** Cytogenetic analysis of *Populus trichocarpa* ribosomal DNA, telomere repeat sequence, and marker-selected BACs. In: *Cytogenet Genome Res*. 125:74–80
- ISLAM-FARIDI, M.N., NELSON, C.D., SISCO, P.H., KUBISIAK, L.T., HEBARD, F.V., PARIS, R.L., PHILLIPS, R.L. (2009b):** Cytogenetic analysis of American chestnut (*Castanea dentata*) using fluorescent *in situ* hybridization. In: *Acta Hort*. 844:207–210, ISHS
- JUCHIMIUK-KWASNIEWSKA, J., BRODZIAK, L., MALUSZYNSKA, J. (2011):** FISH in analysis of gamma ray-induced micronuclei formation in barley. In: *J Appl Genetics*. 52:23–29

- KARP, A., HANLEY, S. J., TRYBUSH, S.O., MACALPINE, W., PEI, M., SHIELD, I. (2011):** Genetic Improvement of Willow for Bioenergy and Biofuels. In: *Journal of Integrative Plant Biology*. 53. 2: 151–165.
- KULUEV, B.R., KNYAZEV, A.V., MIKHAYLOVA, E.V., ERMOSHIN, A.A., NIKONOROV, Y.M., CHEMERIS, A.V. (2016):** The poplar *ARGOS-LIKE* gene promotes leaf initiation and cell expansion, and controls organ size. In: *Biologia Plantarum* 60 (3) 513-522. p.
- LEVAN, A. (1938):** The effect of colchicine on root mitoses in allium. In: *Hereditas* (24), 471-486. p.
- 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
- LINDEGAARD, K.N. és BARKER, H.A. (1996):** Breeding willows for biomass. Biomass and energy crops. In: *Aspects of Applied Biology*. 49: 1–9.
- LIU, Q., DING, C., CHU, Y., CHEN, J., ZHANG, W., ZHANG, B., HUANG, Q., SU, X. (2016):** PoplarGene: poplar gene network and resource for mining functional information for genes from woody plants. In: *Sci. Rep.* 6. 31356: 1–11.
- LIZAKOVA, K. (2018):** Mapping biomass resources in Europe. <http://www.eubia.org/cms/2018/06/15/european-biomass-resources/>
Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: biomass, Europe, 2018, energy resources. Lekérdezés időpontja: 2018.12.13.
- MARTINEZ-ZAPATER, J.M., ESTELLE, M.A., SOMERVILLE, C.R. (1986):** A highly repeated DNA sequence in *Arabidopsis thaliana*. In: *Mol Gen Genet*. 204:417–423
- MEGGYES, A. (2013):** Energianövény termesztési technológiák. In: *Debreceni Egyetem. Agrár- és Gazdálkodástudományok Centruma* 56. p.
- MISHIMA, K., HIRAO, T., URANO, S., WATANABE, A., TAKATA, K. (2009):** Isolation and characterization of microsatellite markers from *Robinia pseudoacacia* L. In: *Mol. Ecol. Resour.* 9. 3: 850–852.

- MU, H.Z., LIU, Z.J., LIN, L., LI, H.Y., JIANG, J., LIU, G.F. (2012):** Transcriptomic analysis of phenotypic changes in birch (*Betula platyphylla*) autotetraploids. In: *Int J Mol Sci.* 13: 13012–13029
- MUKAI, Y., FRIEBE, B., HATCHETT, J.H., YAMAMOTO, M., GILL, B.S. (1993):** Molecular cytogenetic analysis of radiation induced wheat-rye terminal and intercalary chromosomal translocations and the detection of rye chromatin specifying resistance to Hessian fly. In: *Chromosoma.* 102:88–95
- MULKEY, S.S., SMITH, M. (1988):** Measurement of photosynthesis by infra red gas analysis. In: *In CT Lange ed, Bioinstrumentation. American Biology Teachers Association, Warrenton, VA*, pp 79–84
- MURASHIGE, T., ÉS SKOOG, F. (1962):** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. In: *Physiol Plant.* 15: 473–497
- NAGAKI, K., TSUJIMOTO, H., ISONO, K., SASAKUMA, T. (1995):** Molecular characterization of a tandem repeat, Afa family, and its distribution among *Triticeae*. In: *Genome.* 38:479–486
- 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.
- NEMKY, E. (1965):** A magyarországi erdészeti nemesítés helyzete. In: *Az Erdő.* 1965. 14. (100.) évf. 10. füzet
- OSAKABE, Y., SUGANO, S.S., OSAKABE, K. (2016):** Genome engineering of woody plants: past, present and future. In: *J Wood Sci.* (62) 217–225. p.
- PARDUE, M.L. ÉS GALL, J.G. (1969):** Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. In: *Proc Natl Acad Sci USA.* 64:600–604
- PEDERSEN, C. ÉS LANGRIDGE, P. (1997):** Identification of the entire chromosome complement of bread wheat by two-colour FISH. In: *Genome.* 40:589–593
- PODANI J. (2003):** A szárazföldi növények evolúciója és rendszertana. In: *ELTE Eötvös Kiadó. Budapest.* p. 160.
- RAYBURN, A.L. ÉS GILL, B.S. (1985):** Use of biotin-labeled probestomaspécifiek DNA sequences on wheat chromosomes. In: *J Hered.* 76:78–81
- RAYBURN, A.L. ÉS GILL, B.S. (1986):** Molecular identification of the D-genome chromosomes of wheat. In: *J Hered.* 77:253–255

- RAYBURN, A.L. ÉS GILL, B.S. (1987):** Isolation of D-genome specific repeated DNA sequence from *Aegilops squarrosa*. In: *Plant Mol Biol Rep.* 4:102–109
- RÉDEI, K., OSVÁTH-BUJTÁS, Z.,VEPERDI, I. (2008):** Black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) improvement in Hungary: a Review. In: *Acta Silvatica and Lignaria Hungarica.* (4) 127–132 p.
- REHDER, A. (1951):** Manual of cultivated trees and shrubs. In: *The Macmillan Company. New York.* p. 82-111.
- RIYAL, D. (2011):** Development of mutation-based breeding technology in forest tree species. In: *Master of Science in the Department of Biological Sciences Simon Fraser University. Burnaby BC. Canada.*
- RUIZ-HERRERA, A., NERGADZE, S.G., SANTAGOSTINO, M., GIULOTTO, E. (2008):** Telomeric repeats far from the ends: mechanisms of origin and role in evolution. In: *Cytogenet Genome Res.* 122:219–228
- RUXTON, G.D. (2006):** The unequal variance t-test is an underused alternative to Student’s t-test and the Mann–Whitney U test. In: *Behav Ecol.* 17: 688–690
- SÄRKILÄHTI, E ÉS VALANNE, T. (1990):** Induced polyploid in *Betula*. In: *Silva Fennica.* 24: 227–234
- 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

- SERAPIGLIA, M. J., GOUKER, E. F., SMART, L. B. (2014):** Early selection of novel triploid hybrids of shrub willow with improved biomass yield relative to diploids. In: *BMC Plant Biology*. 14. 74: 1–12.
- SPITZER, M., WILDENHAIN, J., RAPPILBER, J., TYERS M. (2014):** BoxPlotR: a web tool for generation of box plots. In: *Nat Methods*. 11: 121–122
- STANTON, B. J., NEALE, D. B., LI, S. (2010):** *Populus* Breeding: From the Classical to the Genomic Approach. In: *Greenwood resources*.
- SU, X., CHU, Y., LI, H., HOU, Y., ZHANG, B., HUANG, B., HU, Z., HUANG, R., TIAN, Y. (2011):** Expression of Multiple Resistance Genes Enhances Tolerance to Environmental Stressors in Transgenic Poplar (*Populus × euramericana* ‘Guariento’). In: *PLoS One*. 6. 9: 1–11.
- SUGIYAMA, S. (2005):** Polyploidy and cellular mechanisms changing leaf size: comparison of diploid and autotetraploid populations in two species of *Lolium*. In: *Ann Bot (Lond)*. 96: 931–938
- SZALAY, D. és MAROSVÖLGYI, B. (2013):** A fásszárú energetikai ültetvények természetes karbonkörforgalmát befolyásoló tényezők. In: *Fiatal Műszakiak Tudományos Ülésszaka XVIII. EME. Kolozsvár*. 21–22: 371–374.
- TACKENBERG, O. (2007):** A new method for non-destructive measurement of biomass, growth rates, vertical biomass distribution and dry matter content based on digital image analysis. In: *Ann Bot (Lond)*. 99: 777–783
- TAIZ, L. és ZEIGER, E. (2010):** *Plant Physiology*, Ed 5. Sinauer Associates, Sunderland, MA
- TANG, Z.Q., CHEN, D.L., SONG, Z.J., HE, Y.C., CAI, D.T. (2010):** In vitro induction and identification of tetraploid plants of *Paulownia tomentosa*. In: *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 102: 213–220
- TREERNÉ WINDISCH M. (2014):** Barkás vesszőként alkalmazható hazai *Salix* taxonok termesztésbe vonása és posztharvest kezelése. In: *Doktori (PhD) értekezés. Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Doktori Iskola. DOI 10.14267/phd.2014004*
- TSAI, C. J. és XUE L. J. (2015):** *CRISPR* into the woods. In: *GM Crops Food*. 6. 4: 206–215.

TUSKAN, G.A., DIFAZIO, S., JANSSON, S., BOHLMANN, J., GRIGORIEV, I., HELLSTEN, U., PUTNAM, N., RALPH, S., ROMBAUTS, S., SALAMOV, A., SCHEIN, J., STERCK, L., AERTS, A., BHALERAO, R.R., BHALERAO, R.P., BLAUDEZ, D., BOERJAN, W., BRUN, A., BRUNNER, A., BUSOV, V., CAMPBELL, M., CARLSON, J., CHALOT, M., CHAPMAN, J., CHEN, G.L., COOPER, D., COUTINHO, P.M., COUTURIER, J., COVERT, S., CRONK, Q., CUNNINGHAM, R., DAVIS, J., DEGROEVE, S., DÉJARDIN, A., DEPAMPHILIS, C., DETTER, J., DIRKS, B., DUBCHAK, I., DUPLESSIS, S., EHLTING, J., ELLIS, B., GENDLER, K., GOODSTEIN, D., GRIBSKOV, M., GRIMWOOD, J., GROOVER, A., GUNTER, L., HAMBERGER, B., HEINZE, B., HELARIUTTA, Y., HENRISSAT, B., HOLLIGAN, D., HOLT, R., HUANG, W., ISLAM-FARIDI, N., JONES, S., JONES-RHOADES, M., JORGENSEN, R., JOSHI, C., KANGASJÄRVI, J., KARLSSON, J., KELLEHER, C., KIRKPATRICK, R., KIRST, M., KOHLER, A., KALLURI, U., LARIMER, F., LEEBENS-MACK, J., LEPLÉ, J.C., LOCASCIO, P., LOU, Y., LUCAS, S., MARTIN, F., MONTANINI, B., NAPOLI, C., NELSON, D.R., NELSON, C., NIEMINEN, K., NILSSON, O., PEREDA, V., PETER, G., PHILIPPE, R., PILATE, G., POLIAKOV, A., RAZUMOVSKAYA, J., RICHARDSON, P., RINALDI, C., RITLAND, K., ROUZÉ, P., RYABOY, D., SCHMUTZ, J., SCHRADER, J., SEGERMAN, B., SHIN, H., SIDDIQUI, A., STERKY, F., TERRY, A., TSAI, C.J., UBERBACHER, E., UNNEBERG, P., VAHALA, J., WALL, K., WESSLER, S., YANG, G., YIN, T., DOUGLAS, C., MARRA, M., SANDBERG, G., VAN DE PEER, Y., ROKHSAR, D. (2006): The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). In: *Science*. 313:1596–1604

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.*

- VAN ACKER, R., LEPLÉ, J. C., AERTS, D., STORME, V., GOEMINNE, G., IVENS, B., LÉGÉE, F., LAPIERRE, C., PIENS, K., VAN MONTAGU, M. C., SANTORO, N., FOSTER, C. E., RALPH, J., SOETAERT, W., PILATE, G., BOERJAN, W. (2014): Improved saccharification and ethanol yield from field-grown transgenic poplar deficient in cinnamoyl-CoA reductase. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 14. 11: 845–850.
- VRÁNA, J., KUBALÁKOVÁ, M., SIMKOVÁ, H., Číhalíková, J., Lysák, M.A., Dolezel, J. (2000): Flow sorting of mitotic chromosomes in common wheat (*Triticum aestivum* L.). In: *Genetics*. 156:2033–2041
- WANG, J., SHI, L., SONG, S., TIAN, J., KANG, X. (2013): Tetraploid production through zygotic chromosome doubling in *Populus*. In: *Silva Fennica*. 47: 932–940.
- WANG, J. X., LU, C., YUAN, C. Q., CUI, B.B., QIU, Q.D., SUN, P., HU, R.Y., WU, D.C., SUN, Y.H., LI, Y. (2015): Characterization of ESTs from black locust for gene discovery and marker development. In: *Genet. Mol. Res.* 2015 Oct. 19. 14. 4: 12684–12691
- WANG, X., YU, M.D., LU, C., WU, C., JING, C. (2011): Study on breeding and photosynthetic characteristics of new polyploidy variety for leaf and fruit-producing mulberry (*Morus* L.). In: *Sci. Agric. Sin.* (44) 562–569. p.
- WANG, Z., WANG, M., LIU, L., MENG, F. (2013): Physiological and proteomic responses of diploid and tetraploid black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) subjected to salt stress. In: *Int J Mol Sci*. 14: 20299–20325
- WANG, Z., FAN, G., DONG, Y., ZHAI, X., DENG, M., ZHAO, Z., LIU, W., CAO, Y. (2017): Implications of polyploidy events on the phenotype, microstructure, and proteome of *Paulownia australis*. In: *Plos One* DOI:10.1371/journal.pone.0172633, 1-21. p.
- WU, J., NYMAN, T., WANG, D.C., ARGUS, G.W., YANG Y.P., CHEN, J.H. (2015): Phylogeny of *Salix* subgenus *Salix s.l.* (*Salicaceae*): delimitation, biogeography, and reticulate evolution. In: *BMC Evolutionary Biology*. 15:31
- XIU, Y., IQBAL, A., ZHU, C., WU, G., CHANG, Y., LI, N., CAO, Y., ZHANG, W., ZENG, H., CHEN, S., WANG, H. (2016): Improvement and transcriptome analysis of root architecture by overexpression of *Fraxinus pennsylvanica* DREB2A transcription factor in *Robinia pseudoacacia* L. ‘Idaho’. In: *Plant Biotechnol. J.* 14. 6: 1456–1469.

- YANG, J., YI, J., YANG, C., LI, C. (2013):** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of *Salix matsudana* Koidz. using mature seed. In: *Tree Physiol.* 33. 6: 628–639.
- YE, Z.H. és ZHONG, R. (2015):** Molecular control of wood formation in trees. In: *J. Exp. Bot.* 66: 4119–4131.
- YORDANOV, Y., REGAN, S., BUSOV, V. (2010):** Members of the *LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN* Transcription Factor Family Are Involved in the Regulation of Secondary Growth in *Populus*. In: *The Plant Cell.* 22: 3662–3677.
- YUAN, C. Q., LI, Y. F., SUN, P., SUN, Y.H., ZHANG, G.J., YANG, M.S., ZHANG Y.Y., LI, Y., WANG, L. (2012):** Assessment of genetic diversity and variation of *Robinia pseudoacacia* seeds induced by short-term spaceflight based on two molecular marker systems and morphological traits. In: *Genetics and Molecular Research.* 11. 4: 4268–4277.
- ZHANG, H., HARRY, D.E., MA, C., YUCEER, C., HSU, C.Y., VIKRAM, V., SHEVCHENKO, O., ETHERINGTON, E., STRAUSS, S.H. (2010):** Precocious flowering in trees: the *FLOWERING LOCUS T* gene as a research and breeding tool in *Populus*. In: *J. Exp. Bot.* 61. 10: 2549–2560.
- ZHONG X.B., FRANSZ 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
- ZHOU, X., JACOBS, T.B., XUE, L.J., HARDING, S.A., TSAI, C.J. (2015):** Exploiting *SNPs* for biallelic *CRISPR* mutations in the outcrossing woody perennial *Populus* reveals *4-coumarate:CoA* ligase specificity and redundancy. In: *New Phytol.* 208. 2: 298–301.

M2: A kísérletek során felhasznált törzsoldatok és munkaoldatok összetétele

Törzsoldatok

20×SSC: 3M NaCl,
0,3M C₆H₅Na₃O₇·2H₂O (trinátrium-citrát dihidrát)
(pH 7,0)

10×PBS: 137 mM NaCl,
27 mM KCl,
80 mM Na₂ HPO₄ ,
15 mM KH₂PO₄
(pH 7,0)

TNB: 0,1M Tris-HCl,
150mM NaCl,
0,5% Blocking Reagent (Roche)

Munkaoldatok:

2×SSC (1000ml): 900 ml MQvíz
100 ml 20×SSC

4×SSC-Tween (500ml): 400 ml MQvíz
100 ml 20×SSC
2,5 ml 10% Tween20

1×PBS (1000 ml): 900 ml MQ víz
100 ml 10×PBS

paraformaldehid (50 ml): 50 ml MQ víz
2g paraformaldehid,
8 µL 8M NaOH
(pH 7,4)

etanol sorozat: 70% - 90% - 100% etanol

Galbraith oldat: 0,2 M Tris-HCL
45 mM MgCl₂
30 mM Na-citrát
20 mM 4-morfolin-propán-szulfonát (MOPS)
1 %-os Triton X-100
(pH 7,0)

Carnoy oldat: 100%-os etanol : 99%-os ecetsav 3:1 arányú keveréke

M3. A kísérletek során a növényregenerációra felhasznált táptalajok összetétele

MS (Murashige & Skoog, 1962) táptalaj: ½-szeres MS táptalaj:

NH ₄ NO ₃	1650 mg/l	825 mg/l
KNO ₃	1900 mg/l	950 mg/l
CaCl ₂ ×2 H ₂ O	440 mg/l	220 mg/l
MgSO ₄ ×7 H ₂ O	370 mg/l	185 mg/l
KH ₂ PO ₄	170 mg/l	85 mg/l
H ₃ BO ₃	6,2 mg/l	3,1 mg/l
MnSO ₄ ×H ₂ O	16,9 mg/l	8,45 mg/l
ZnSO ₄ ×H ₂ O	8,6 mg/l	4,3 mg/l
KI	0,83 mg/l	0,415 mg/l
NaMoO ₄ ×2 H ₂ O	0,25 mg/l	0,125 mg/l
CuSO ₄ ×5 H ₂ O	0,025 mg/l	0,0125 mg/l
CoCl ₂ ×6 H ₂ O	0,025 mg/l	0,0125 mg/l
FeSO ₄ ×7 H ₂ O	27,8 mg/l	13,9 mg/l
Na ₂ EDTA×2 H ₂ O	37,3 mg/l	18,65 mg/l
mio-inozit	100,0 mg/l	50 mg/l
nikotinsav	0,5 mg/l	0,25 mg/l
tiamin×HCl	0,1 mg/l	0,05 mg/l
piridoxin×HCl	0,5 mg/l	0,25 mg/l
glicin	2,0 mg/l	1,0 mg/l
szacharóz	30000 mg/l	15000 mg/l
agar	8000 mg/l	4000 mg/l

pH: 5,7-5,8

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás köszönetemet fejezem ki mindazoknak, akik PhD munkám és a disszertáció elkészítése során támogattak, így a Szegedi Biológiai Kutatóközpont valamennyi munkatársának, valamint a Szent István Egyetem Növénytudományi Doktori Iskola jelenlegi és volt vezetőjének, Dr. Helyes Lajos professzor úrnak és Dr. Heszky László akadémikus úrnak, hogy részt vehettem a Növénygenetika és Biotechnológia Programban.

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, Prof. Dr. Dudits Dénesnek a munkám során nyújtott kiemelkedő szakmai iránymutatásáért, a tanulmányaim és a kísérletek elvégzéséhez szükséges feltételek biztosításáért. Köszönöm türelmét, tanácsait és az értekezés megírásához szükséges áldozatos és nélkülözhetetlen segítségét. Köszönetemet fejezem ki, hogy a Gazdasági Operatív Program (GOP) keretében vezetőként lehetőséget biztosított, hogy a kísérleti munkákba bekapcsolódhassak.

Köszönettel tartozom Dr. Lángné Dr. Molnár Márta az MTA doktorának, tudományos tanácsadónak, az Agrártudományi Kutatóközpont Mezőgazdasági Intézet, Génmegőrzési és Organikus Nemesítési Osztály korábbi tudományos osztályvezetőjének és Dr. Linc Gabriella tudományos osztályvezetőnek a segítségéért, hogy vendég kutatóként betekintést nyerhettem a növényi molekuláris citogenetika és citológia elméleti és gyakorlati rejtelseibe. Továbbá köszönettel tartozom az ott tartózkodásom alatt nyújtott szakmai irányításukért és a kísérletek elvégzéséhez biztosított feltételek megteremtéséért.

Köszönöm Dr. Horváth V. Gábornak és Dr. Györgyey Jánosnak, hogy a Sejtosztódási- és Stressz Adaptációs Csoport (jelenleg: Növényi Testfelépítési és Fejlődési Csoport) csoportvezetőiként szakmai tapasztalataikkal és tanácsaikkal segítették kutatómunkámat. Köszönettel tartozom továbbá a Csoport valamennyi volt és jelenlegi tagjának, akik munkájukkal és javaslataikkal sokszor és sokat segítettek. Külön köszönettel tartozom Török Károlynénak asszisztensi munkájáért.

Végül, de nem utolsó sorban, köszönöm a Családom minden tagjának, hogy hosszú tanulmányaim során gondoskodásukkal, szeretetükkel és segítségükkel mindvégig áldozat készen és kitartóan támogattak.