

Műszeres genoméret vizsgálatok fű fajtafenntartásban

Lepossa Anita¹ – Dallos Dóra¹ –
Nagy Szabolcs Tamás²

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

¹Növénytermesztési-tudományok Intézet, Agronómia Tanszék,
Keszthely

²Állattenyésztési Tudományok Intézet, Precíziós Állattenyésztési
és Állattenyésztési Biotechnika Tanszék, Keszthely
Lepossa.Anita@uni-mate.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

Keszthelyen több évtizedes múltra tekint vissza a gyepalkotó fűfajok nemesítése. A már regisztrált fajták fajtafenntartó nemesítő munkájának célja többek között a fajtaleírásban szereplő ploidiafok megőrzése. A növényi DNS-tartalom vizsgálatának gyors, korszerű eszköze a flow citometria. Előkísérletünkben a MATE Georgikon Campuson fenntartott négy fűfajta genoméretét hasonlítottuk össze a nemzetközi adatbázisban adott fűfajra közölt ismert, hasonló ploidiafokú minták adataival. Eredményeink nagyfokú egyezést mutattak az elméletileg várt értékekkel, alátámasztva a flow citometria alkalmazhatóságát a növénynemesítésben, valamint a fajtafenntartás gyakorlatában.

Kulcsszavak: csomós ebír, vörös csenkesz, nádképi csenkesz, magyar rozsnok, 2C-érték, flow citometria

SUMMARY

In Keszthely, the breeding of grass species have several decades long history. Among other things, the aim of the maintenance work of the registered varieties is to preserve the ploidy levels that have been reported in the variety descriptions. Flow cytometry is a fast, modern tool for examining plant DNA content. In our pilot study, we compared the genome size of the four grass species maintained at the MATE Georgikon Campus with the data of known samples of similar ploidy levels published for the given grass species in the international database. Our results showed a high degree of agreement with the theoretically expected values, supporting the applicability of flow cytometry in plant breeding and in variety maintenance.

Keywords: orchard grass, red fescue, tall fescue, smooth bromegrass, 2C-value, flow cytometry

BEVEZETÉS

Az utóbbi évtizedekben egyre nagyobb figyelem fordul a növényi genoméret felé, ahogy mind nyilvánvalóbbnak tűnik ennek a sejtteni jellemzőnek a biológiai sokféleségben betöltött alapvető szerepe, biológiai, evolúciós és ökológiai jelentősége. Vizsgálata sokféle megközelítéssel lehetséges, mérésére közvetett vagy közvetlen módszerek állnak rendelkezésre. A flow citometria (FCM) már több évtizede alkalmazott technika a növényi DNS-tartalom becslésére (Doležel és Bartoš, 2005).

A MATE Georgikon Campuson takarmány- és pázsitfűvek fajtafenntartó nemesítő munkájához kapcsolódóan az államilag elismert fűfajták ploidia

fokának és genoméretének automatizált citogenetikai vizsgálatait nyolc éve kezdtük, amikor a Campus jogelődjének Sejtanalitikai Laboratóriumában 2016-ban csomós ebír fajta törzsállományában megjelent néhány széles levelű anyató ploidiafok becslését végeztük el flow citométerrel, a fajtafenntartás során esetlegesen bekövetkezett spontán poliploidizáció kizárására (Lepossa és Nagy, 2016, 2022; Györei és mtsai, 2017). Jelen munka a MATE NTTI Georgikon Campuson fenntartott fűfajták genoméret becslésére végzett előkísérletről számol be.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A genom a DNS-molekulák összessége, a benne tárolt információkon alapul a növény egyedfejlődési programja, mely a környezet által is szabályozottan meghatározza a növény fenotípusát. Méretének sejt- és szervezet szintű hatásai vannak, melyek befolyásolhatják pl. a sejtciklus hosszát, a sejt méretet, olyan tulajdonságokat, mint az életciklus, ökológiai igények, és ezeken keresztül a növénytársulás összetételét, növény-állat kölcsönhatásokat, evolúciós útvonalakat és az ökoszisztéma-dinamikát (Doležel és mtsai, 2007; Dodsworth és mtsai, 2015; Suda és mtsai, 2015; Simonin és Roddy, 2018; Guignard és mtsai, 2019; Pellicer és Leitch, 2020). A DNS-mennyisége a C-érték, amely abszolút értékben fejezhető ki, mértékegysége a „pikogramm (pg) DNS” vagy „bázispárok száma/sejtmag” (Doležel és mtsai, 2007).

Hasonló fejlettségű növényfajok genoméretei között akár három nagyságrendnyi eltérések is lehetnek (C-érték paradoxon), ennek a biológiai magyarázata azonban még nem teljesen tisztázott (Doležel és mtsai, 2007). A gének száma nem feltétlenül arányos a genom méretével. A ploidiafok növekedése hozzájárul ugyan a genom méretnövekedéséhez, önmagában azonban nem eredményez nagyfokú különbségeket.

A Royal Botanic Gardens által működtetett Növényi Genoméret Adatbázis elektronikus felülete a 2001-es első kiadás óta gyorsuló ütemben, folyamatosan bővül, jelenleg a 7.1 frissítésben 12273 növényfajra tartalmaz genoméret információt, túlnyomó részben zárvatermőkre (Leitch és mtsai, 2019). Az adatbázisban csak azokhoz a genoméret-becsléshez találunk citológiai adatokat (pl. kromoszómaszám, ploidiafok), ahol azt a referenciaforrás is közli, ezzel igyekeznek elkerülni

– különösen a többféle citotípusú fajok esetében – a genoméret-adatok téves értelmezésének lehetőségét (Kolár és mtsai, 2017). A flow citometriával végzett genoméret-bebecslések nem szolgáltatnak konkrét citológiai információkat, és korábban Suda és mtsai (2006) is felhívták a figyelmet, hogy a vizsgálandó taxonómiai csoport előzetes citológiai ismerete nélkül a kromoszómaszám vagy ploidia fok kizárólag genoméret-bebecslésen alapuló értelmezése félrevezető lehet.

A kvantitatív DNS-vizsgálatok lényege a sejtmagban található DNS mennyiségének (C-érték, illetve szomatikus sejtek esetében 2C-érték) megállapítása. A mérésekhez DNS-specifikus festékeket kell alkalmazni, amelyek sztöchiometrikusak, azaz a DNS-hez kötődő festékmolekulák száma megfeleltethető a DNS mennyiségével, így a detektált fluoreszcencia-intenzitás utal a sejtmag DNS-tartalmára. Az egyik leggyakrabban alkalmazott festék a propidium-jodid (PI), amely gerjesztési maximuma (536 nm) és emissziós maximuma (623 nm) miatt jól használható a 488 nm gerjesztőfényű asztali citométerekben. A mérés előkészítése a sejtek permeabilizálását igényli, mert a PI membrán-impermeabilis fluorokrom. Az azonos sejtciklusban lévő sejtek jellemzően ugyanannyi DNS-t tartalmaznak, és az eltérő ciklusban lévő sejtek DNS-különbsége is maximum kétszeres (G1 - G2/M fázis), így a fluoreszcenciaintenzitást lineáris skálán szokás rögzíteni. Az adatgyűjtés során elkülönítjük a fluoreszkáló eseményeket (DNS-tartalmú sejtek) a nem fluoreszkálóktól (törmelék, zaj, stb.). Sejtciklus-vizsgálatok során kritikus a G2/M fázisban lévő sejtek megkülönböztetése az összetapadt G1 sejtektől. Az adatgyűjtés során ügyelni kell a műszer megfelelő beállítására, ehhez minden mérésorozat előtt fluoreszcens mikrogöngyökkel végzett kalibráció végrehajtása szükséges. A mérés során folyamatosan ellenőrizni kell a DNS-fluoreszcencia-intenzitási hisztogram G1 csúcsának CV-értékét, amely optimális esetben kevesebb, mint 8. A hordozófolyadék tartályát minden mérésorozat előtt célszerű teljesen feltölteni a stabilabb folyadékaramlás érdekében (Brotherick, 2006).

Növénymintából (*Vicia faba*) történő első flow citométeres vizsgálat eredményét 1973-ban publikálták, és ezt követően az 1980-as évektől már rutinszerűen alkalmazott technika a növényi DNS-tartalom bebecslésére (Ochatt, 2008). Napjainkban is folyamatosan növekszik az ilyen műszerekkel felszerelt laboratóriumok száma, és a technikát már nem csak kutatásra, hanem rutinszerűen a növénynevelésben (poliploid és hibrid nevelés) és vetőmag minősítésnél is használják, például a vetőmag érettségének, minőségének és a csírázás előrehaladásának megállapítására. Leggyakrabban a genoméret és a ploidiafok bebecslését végzik, de az FCM alkalmas a sejtciklus aktivitás és az endoreduplikáció intenzitásának megállapítására is különböző növényi szövetekben és szövetekben. A szomaklonális variabilitás miatt a szövetkultúrában termesztett növényi anyag meglehetősen instabil a

DNS-tartalmát tekintve, ezért az FCM-elemzések ez esetben különösen ajánlottak. A kertészeti fajokat gyakran belső standardként használják a genoméret bebecslésében és különböző vegyületek citometriásan vizsgált citotoxikus / rákellenes / allelopátiás hatásának elemzésében. A genomszerkesztés gyakorlatának növénynevelésben várható elterjedése az FCM-technika rutinszerű alkalmazását vetíti előre (Sliwinska, 2018).

Számos vizsgálatot végeztek már gyepalkotó évelő fűfajokon a flow citometria alkalmazásával a DNS-mennyiség bebecslésére, elsősorban a ploidiafok meghatározása céljából. Tuna és mtsai (2001) *Bromus* fajok vizsgálata során azt találták, hogy az átlagos DNS-mennyiség szoros pozitív kapcsolatot mutatott a gyökércsúcsból értékelte kromoszómaszámmal. A gyakran nehezen azonosítható apró csenkesz fajok közül pl. juh csenkesz (*Festuca ovina*) mintákat Qiu és mtsai (2020), a Duna mentén előforduló *Festuca* taxonba tartozó fajokat Balogh és mtsai (2022) vizsgálták. Előbbiben a ploidiafok széles skáláját találták diploidtól oktaploid fokig, és azt is igazolták, hogy a juhcsenkesz esetében magasabb ploidiafokhoz nagyobb magméret társult. Akiyama és mtsai (2016) olaszperjéből (*Lolium multiflorum*) és nádképi csenkeszből (*Festuca arundinacea*) indított *Festulolium* keresztezés során azt tapasztalták, hogy az utódnemzedékekben a hexaploidok genommérete nem stabil, folyamatosan csökkent.

Előkísérletet végeztünk négy hazai gyepalkotó fűfaj (csomós ebír, vörös csenkesz, nádképi csenkesz, magyar rozsnok) Keszthelyen, MATE Georgikon Campusán fenntartott regisztrált fajtaírási csíranövény mintáival, melynek során a fajtaírási csíranövény mintáink genoméret-eredményét hasonlítottuk össze a nemzetközi adatbázisban adott fűfajra közölt ismert, hasonló ploidiafokú minták adataival.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A vizsgált fűfajták jellemzése: a vizsgálatokhoz a MATE Georgikon Campusán korábban nevelített, jelenleg is fenntartott fűfajtákat (három takarmány- és egy parkfű fajtát, *1. ábra*) használtunk.

„Keszthelyi 54” csomós ebír (*Dactylis glomerata* L.): szára alacsony, kevésbé szilárd. Levele hosszú, keskeny, középzöld. Fejlődése generatív jellegű. Jó a zöldtömeg- és magtermő képessége, extenzív viszonyok között is megfelelő. Rozsdával és lisztharmattal szemben ellenállóbb. Jó a télálló- és szárazságtűrő képessége. Tiszta vetésben legeltetésre, szilázs és fűliszt készítésre egyaránt alkalmas.

„Tomaj” vörös csenkesz (*Festuca rubra* L.): nevelítője Ivány Károly, 2007-ben kapott állami elismerést ez a park típusú fajta. Kiváló szárazságtűrő, finom levélzetű, tarackot nem fejleszt. Levele közép-sötétzöld színű, nem viaszolt. Önállóan is zárt, dús állományú pázsitot, tarackosokkal együtt alkalmazva taposás-tűrő, zárt gyeptet képez. Társulás-alkotó képessége kiváló. Szalmája erős, éréskor fénylő szalmasárga, ezért előszeretettel használják koszorúalap készítésére.

„Keszthelyi 50” nádképi csenkesz (*Festuca arundinacea* Schreber): Ecker István nemesítette Keszthelyen, 1979 óta regisztrált, takarmány típusú, kiváló alkalmazkodó képességgel bíró, hosszú élettartamú, hexaploid fajta. Szára sima, vastag, három nóduszos. Sűrű, széles, terülő bokrot fejleszt. Tőlevelei 50-60 cm hosszúak, 1-1,5 cm szélesek, középzöld színűek, érdeseek. Felálló bugája érskor gyengén terülő. Télállósága kitűnő, szárazságtűrése jó. Keverékekben elnyomja a társfüveket és pillangósokat, ezért ajánlott inkább a tiszta vetése. Hasznosítása javasolt extenzív legelőkön vagy szilázsnak betakarítva.

„Keszthelyi 51” magyar rozsnok (*Bromus inermis* Leyss.): magas, vastagszárú, felálló bokrot nevelő, hosszú, közepes-széles, sötétzöld levelű szálfü. Tarackjai a talajban mélyen helyezkednek el. Bugája zöldesfehér színű, közepesen nagy, tömöttebb. Késői virágzású. Jól tűri a szélsőséges talaj- és éghajlati viszonyokat, valamint jól terem az extenzív körülmények között is. Sarjadása viszonylag lassú, viszont utána intenzív a fejlődése. Kiváló takarmány- és magtűró képességű. Legeltetésre és tömegtakarmány termesztésre is alkalmas tisztán vetve vagy pillangós társítással. Száraz fekvésű legelők felújítására, illetve ilyen területeken létesítendő gyepek telepítésére alkalmas.

A fűfajták megbízott fajtafenntartója a Georgikon Campuson 2015-től Lepossa Anita.

1. ábra: Vizsgálatba vont fűfajták törzsállománya Keszthelyen (Foto: Lepossa A., 2015)

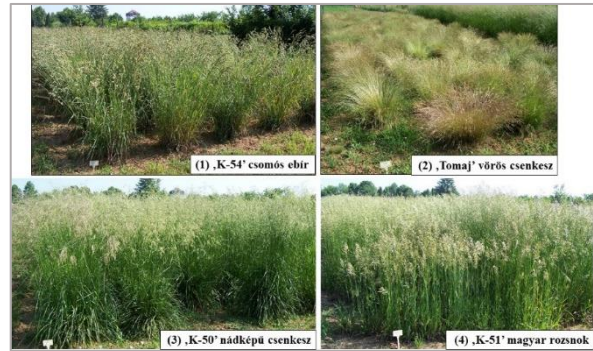


Figure 1: Pure stands with single spaced plants of the examined Hungarian grass varieties

Orchard grass 'K-54'(1), Red fescue 'Tomaj'(2), Tall fescue 'K-50'(3), Smooth brome grass 'K-51'(4)

A fajtáinkkal megegyező ploidiáfokú fűfajok fontosabb adatait a Növényi Genomméret Adatbázisban szereplő, flow citometriát és propidium-jodid (PI) DNS-festést alkalmazó (FC:PI) vizsgálati módszerrel becsült 2C-értékekkel az 1. táblázat ismerteti.

1. táblázat

Vizsgálatba vont fűfajok nemzetközi adatbázisban közölt genoméret adatai

Botanikai név(1)	Fajnév(2)	Kromoszóma szám(3)	Ploidia foka(4)	Közlés száma (db)(5)	2C-érték (pg)(6)
<i>Dactylis glomerata</i>	csomós ebir(7)	28	4	4	8,63±0,36
<i>Festuca rubra</i>	vörös csenkesz(8)	42	6	6	12,54±1,00
<i>Festuca arundinacea</i>	nádképi csenkesz(9)	42	6	5	16,64±0,82
<i>Bromus inermis</i>	magyar rozsnok(10)	56	8	3	23,18±1,20

Table 1: Genome size data of analyzed grass species from the Plant DNA C-values Database

Botanical name(1), Species name(2), Chromosome number(3), Ploidy level(4), Number of references(5), 2C-value(6), Orchard grass(7), Red fescue(8), Tall fescue(9), Smooth brome grass(10)

A DNS-vizsgálatokhoz használt növényanyag: Vizsgálatainkhoz a fűfajták törzsállományából származó vetőmagból nevelt csíranövényeket használtunk, a csíráztatást Memmert 750 típusú növénynevelő kamrában, váltott hő- és fényviszonyok között végeztük 21 napon keresztül, 14h/10h órás fény és sötét periódus, illetve 18 °C (16h) / 25 °C (8h) hőmérsékleti periódus beállításával.

A DNS-tartalom vizsgálata: A citométeres vizsgálatok minta-előkészítését Doležel és mtsai (2007) módszere alapján végeztük. A sejtmagokat a csíranövények levélmintáiból nyertük ki, majd CyStain PI Absolute T reagens kít segítségével (SYSMEX 05-5023) festettük. Kontrollként fixált szívárványos pisztráng vörösvérsejteket (DNA Control PI, SYSMEX, 05-7303) használtunk Wake és mtsai (1995) nyomán a fűminták szuszpenziójához keverve.

Sejtmagfestés FCM vizsgálathoz:

1) festés előkészítése

- felhasználásra kész extrakciós puffer készítése (0,525 g puffer reagens + 25 mL sejtmagextrakciós puffer, a puffer max. hét napig 2-8 °C-on tárolható);
- RNáz törzsoldat elkészítése (5 mg RNáz A + 1,5 mL víz, az oldat -20 °C-on tárolandó);
- festőoldat elkészítése 10 db mintához (20 ml festőpuffer + 120 µL propidium-jodid + 60 µL RNáz, fénytől védve tárolandó 18-25 °C-on, az oldat csak 24 óráig stabil)

2) festés menete friss növényi mintával

- kb. 20 mg friss növénymintát Petri-csészébe helyezni, és hozzáadni 500 µL extrakciós pufferoldatot
- éles borotvapengével 30-60 másodpercig finoman aprítani a mintát (5-10 minta után szükséges a pengét cserélni)

- a szuszpenziót inkubálása 2-15 percig, szobahőmérsékleten
- szuszpenzió szűrése 30 µm-es CellTrics szűrőn
- 2 ml festőoldat szűrlethez adása
- minta inkubálása 30-60 percig, szobahőmérsékleten, fénytől védve
- 100 µL pisztráng vörösvérsejt szuszpenzió hozzáadása
- minta értékelése

Adatgyűjtés és -elemzés: A flow citometriás mérésekhez Beckman Coulter FC500 citométert használtunk 488 nm-es, 20 mW argon ion lézeres gerjesztőfényel. A PI fluoreszcenciaintenzitás rögzítése az FL 3 detektoron (650 nm LP) lineáris módban történt. A méréseket 10 000 esemény vagy 5 perc futtatási idő elérése után állítottuk meg. Az adatfájlokat flow citométer standard LMD fájlformátumban tároltuk. Az adatgyűjtéshez Beckman-Coulter CXP Acquisition szoftvert, az adatelemzéshez Flowing szoftvert (v. 2.5.1., Internet 1), illetve Kaluza adatelemző szoftvert (v.2.1.0003.20057, Beckman Coulter Inc.) használtunk. Az adatfájlokat kétdimenziós oldalirányú szórtfényintenzitás (SSC log) és FL3 detektoron rögzített PI-fluoreszcenciaintenzitás citogramokon jelenítettük meg, ahol azonosítottuk a kontroll pisztrángvér, valamint a vizsgált fű sejtmag populációkat, majd ezek medián fluoreszcencia-intenzitási értékét, szórását és variációs koefficiensét (CV) egydimenziós PI-intenzitás hisztogramokon állapítottuk meg.

Genomméret számítása: A minták DNS-mennyiségének meghatározásához Doležel és mtsai (2007) által közölt alábbi képletet használtuk:

$$\text{minta 2C érték (DNS pg)} = \text{kontroll 2C érték} * \frac{\text{minta intenzitás medián érték}}{\text{kontroll intenzitás medián érték}}$$

ahol a kontrollként használt pisztrángvér 2C-értéke 5,05 pg (Wake és mtsai, 1995), a minta és kontroll intenzitás medián értékei pedig a mérési adatfájlok hisztogram analízisével számított értékek. A mérések linearitását Galbraith és Villalobos-Menuey (2018) megközelítése szerint értékeltük, összevetve a Növényi Genomméret Adatbázisban található genomméret értékeket a kapott PI medián fluoreszcenciaintenzitási értékekkel. Az adatgyűjtés minőségellenőrzésére a hisztogramok CV értékét vettük figyelembe, 8%-ot tekintve felső küszöbértéknek (Givan, 2001).

EREDMÉNYEK

A flow citometriai mérés eredményét kétdimenziós citogramok és egydimenziós hisztogramok segítségével értékeltük (2-3. ábrák). A kétdimenziós citogramokon látható, hogy a kontroll pisztráng- (piros körrel jelölve), és a vizsgált növényi sejtmagok (zöld körrel jelölve) szórtfény- és DNS-fluoreszcencia-intenzitásuk alapján jól elkülöníthetők voltak (2. ábra).

2. ábra. SSC/PI-fluoreszcenciaintenzitás citogramok a kontroll (piros) és a minta (zöld) populációkkal

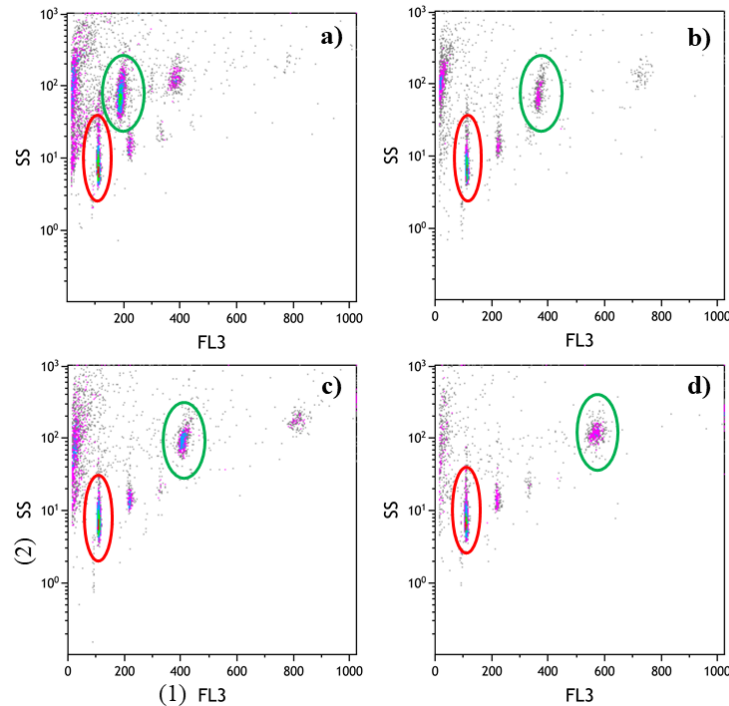


Figure 2: PI fluorescence intensity with the populations of control (red) and samples (green) Orchard grass 'K-54'(a), Red fescue 'Tomaj'(b), Tall fescue 'K-50'(c), Smooth bromegrass 'K-51'(d), PI fluorescence intensity on the FL3 detector(1), Side scatter light intensity(2)

Az egydimenziós hisztogramokon pirossal jelölve a kontroll pizstráng-, zöld színnel jelölve pedig a vizsgált növényi sejtmagok fluoreszcenciaintenzitás értékeit láthatjuk (3. ábra).

A hisztogramok CV értékei minden növényminta esetében elfogadható értéket (<8%) adtak (2. táblázat).

3. ábra: Vizsgált fűfajták DNS-hisztogramja

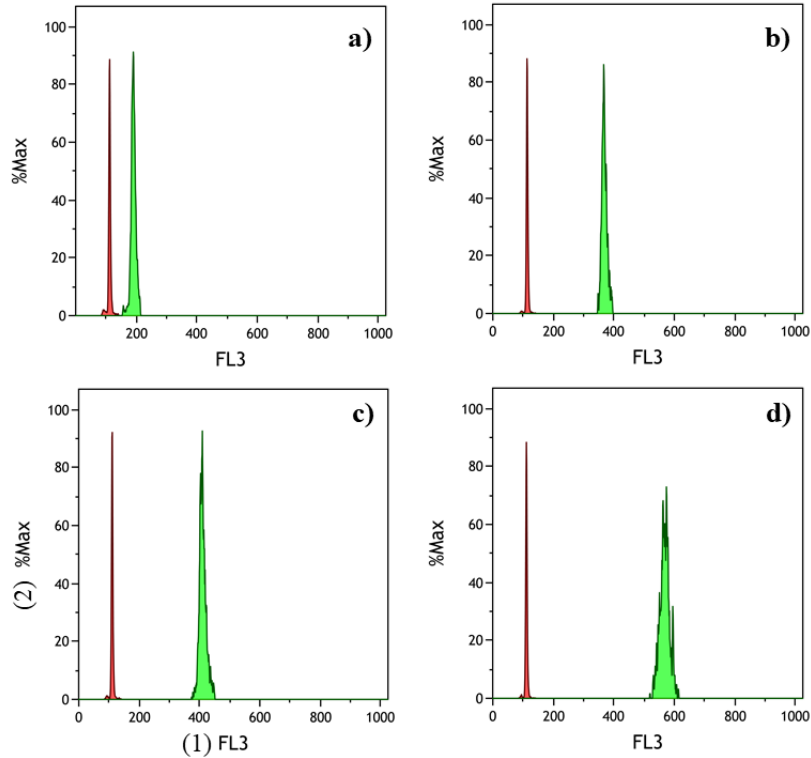


Figure 3: DNA histograms of the analysed grass varieties Orchard grass 'K-54'(a), Red fescue 'Tomaj'(b), Tall fescue 'K-50'(c), Smooth bromegrass 'K-51'(d), PI fluorescence intensity on the FL3 detector(1), Maximum frequency(2)

2. táblázat

A vizsgált MATE Georgikon fűfajták genommérete

Fajta	PI intenzitás medián (CV)(5)	Kontroll intenzitás medián (CV)(6)	Számított 2C-érték(7)
<i>Dactylis glomerata</i> (csomós ebír 'K-54')(1)	190,84 (4,5)	111,58 (3,17)	8,64
<i>Festuca rubra</i> (vörös csenkesz 'Tomaj')(2)	368,22 (2,58)	113,72 (2,59)	16,35
<i>Festuca arundinacea</i> (nádképi csenkesz 'K-50')(3)	409,14 (2,74)	110,65 (2,58)	18,67
<i>Bromus inermis</i> (magyar rozsnok 'K-51')(4)	567,84 (2,34)	111,19 (2,48)	25,79

Table 2: Genome size of the MATE Georgikon grass varieties Orchard grass 'K-54'(1), Red fescue 'Tomaj'(2), Tall fescue 'K-50'(3), Smooth bromegrass 'K-51'(4), PI median intensity(5), Control median intensity(6), Calculated 2C-value(7)

A vizsgált keszthelyi fűfajták 2C értékei – a 'K-54' csomós ebír kivételével – meghaladták az adott fajhoz, azonos ploidiafokra a Növényi Genomméret Adatbázisban közölt átlagos genomméretet (4. ábra). Legnagyobb eltérést a vörös csenkesz esetében

tapasztaltunk, itt a 'Tomaj' fajtánk genommérete mintegy 30%-kal volt nagyobb, a 'K-50' nádképi csenkesz esetében ez a különbség 12% volt, míg a magyar rozsnoknál elenyésző, csupán 1%-os eltérés mutatkozott.

4. ábra: Általunk vizsgált és nemzetközi adatbázisban szereplő, FC:PI módszerrel becsült fű genomméret adatok (piros oszlop = saját fajtákra vonatkozó becslés, szürke oszlop = adott ploidiafokra közölt adatok)

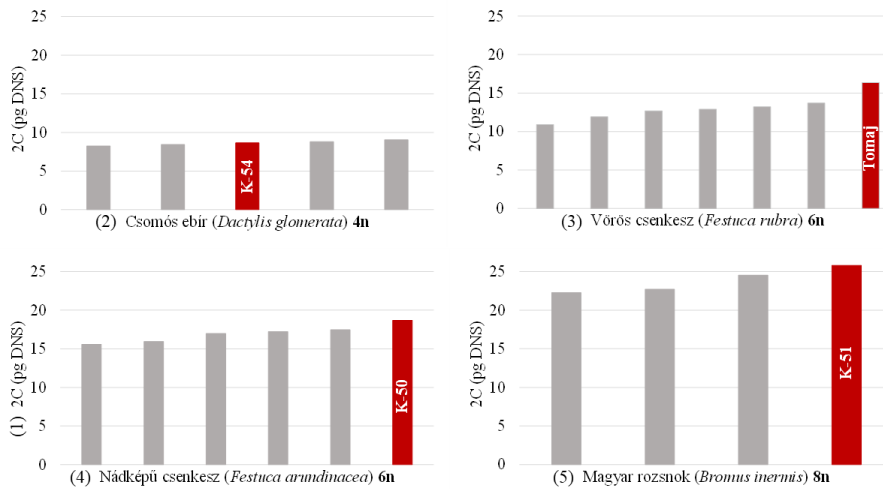


Figure 4: Our grass genome size results (red columns) with reference 2C-values (grey columns)
Genome size 2C-value(1), Orchard grass 'K-54'(2), Red fescue 'Tomaj'(3), Tall fescue 'K-50'(4), Smooth brome grass 'K-51'(5)

Fluoreszcencia intenzitás eredményeinket a Növényi Genomméret Adatbázisban szereplő, hasonló módszerrel vizsgált és adott ploidiafokra publikált adatok átlagával összehasonlítva megállapítható, hogy a fluoreszcencia intenzitási értékek nagyfokú linearitást mutattak a referenciaértékekkel (5. ábra).

5. ábra: Fluoreszcencia intenzitási értékek

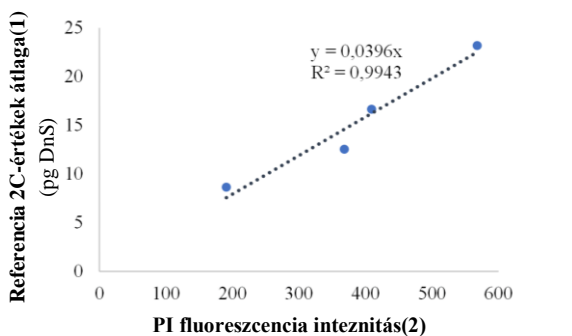


Figure 5: Fluorescence intensity values
Average of reference 2C-values(1), PI fluorescence intensity(2)

DISZKUSSZIÓ

A genomméretre vonatkozó flow citometriai vizsgálataink eredményét más hasonló munkákkal összevetve szoros egyezést találtunk. Pustahija és mtsai (2013) a Balkán félszigetről gyűjtött csomós ebir mintában $8,44 \pm 0,20$ pg DNS mennyiséget becsültek, mely megegyezett a saját becslésünkkel. A vizsgált *Festuca* fajok esetében nagyobb eltérést kaptunk a Genomméret Adatbázisban közölt források eredményeihez képest: a vörös csenkesz esetében (*F. rubra subsp. rubra*) Loureiro és mtsai (2007)

$17,66 \pm 0,305$ pg DNS tartalmat határoztak meg feltételezhetően, de nem igazoltan oktaploid növényekben. Jelen vizsgálatunkban kapott eredmény közelebb áll ehhez az értékhez, mint Šmarda és mtsai (2008) által hexaploidnak feltételezett mintákra közölt alacsonyabb, $13,68$ pg DNS értékhez. Ebben a vizsgálatban a szerzők a nádképi csenkesz genomméretre $17,22$ pg DNS tartalmat becsültek, de itt kromoszómaszám meghatározás nem történt, a szerzők jelezték, hogy a kapott adat megfeleltethető földrajzilag távol eső területről gyűjtött, igazoltan hexaploid növény minta genomméretével. Tuna és mtsai (2001) vizsgálataiban az Amerikai Egyesült Államok Mezőgazdasági Minisztériuma Génbankjából származó 233 db oktaploid *Bromus inermis* minta (Észak-Amerikában csak oktaploid magyar rozsnokot használnak mezőgazdasági célra) átlagos 2C-értéke $22,28 \pm 0,42$ pg DNS volt, Joachimiak és mtsai (2001) ugyanerre 10 db oktaploid növény mintából $24,54 \pm 0,34$ pg DNS tartalmat kaptak, hasonlóan az általunk mért értékhez. A kapott eltérésekhez hasonló különbségek a szakirodalomból ismertek, különböző laboratóriumok azonos növény mintákon végzett vizsgálati eredménye között akár több mint 30% különbség is adódott (Doležel és Bartoš, 2005).

A kvantitatív genomméret-vizsgálatok lényeges eleme a megfelelő referenciaminták kiválasztása és beszerzése. Bár a szakirodalomban elfogadott, hogy növényi genomméret meghatározásához nem növényi referenciák is használhatók, mint például – ahogy munkánkban is szerepelt – pisztráng versejtek (Wake és mtsai, 1995), valószínűleg pontosabb becslés kapható referenciaként használva ismert genomméretű növények friss mintáival, melyek a vizsgált növény mintákkal együtt, azonos előkészítést és festési protokollt igényelnek (Doležel és mtsai, 2007).

Előkísérletünk tapasztalatai megerősítik, hogy a flow citometria hasznos eszköz a DNS-mennyiség vizsgálatokban, az így szerzett információ további genetikai vizsgálatok vagy a növénynevelés kiindulópontját képezheti, felhasználható fajtafenntartási munka minőségének ellenőrzésére, de akár regisztrált fajták vagy vetőmagok ellenőrző vizsgálati során is. A flow citometriában rejülő lehetőségek a klinikai és orvosbiológiai alkalmazásoktól eltérő területeken még messze nincsenek kiaknázva. A módszer olyan előnyei, mint a gyors adatgenerálás, a multiparaméteres vizsgálatok

lehetősége, nagyfokú precizitás alkalmazhatóvá teszik számos, nem konvencionális területen is. A citométeres genomvizsgálatok jövőbeni szerepe elsősorban abban rejlik, hogy valamely újonnan vizsgálni kívánt növényfaj költséges molekuláris genetikai vizsgálatai (teljes genom analízis, szekvenálás) előtt ezzel a gyors és precíz, viszonylag olcsó vizsgálattal képet nyerhetünk a genomméretről, illetve spontán megjelenő fenotípusos eltérések esetében a genomméret-változás lehetősége megerősíthető vagy kizárható.

IRODALOM

- Akiyama, Y.-Ueyama, Y.-Hamada, S.-Kubota, A.-Kato, D.-Yamada-Akiyama, H.-Takahara, Y.-Fujimori, M. (2016): Utilization of flow cytometry for festulolium breeding (*Lolium multiflorum* (2x) × *Festuca arundinacea* (6x)) *Breed Sci.*, 66(2): 234-243.
- Balogh D.-Fűrész A.-Penksza K.-Lantos Cs.-Szöke A. (2022): *Festuca* taxonok ploid vizsgálata Magyarországon. In: Bene Sz. (szerk.): XXIX. Ifjúsági Tudományos Fórum Konferenciakötet, MATE Georgikon Campus, Keszthely. 314. p., 149.
- Brotherick, I. (2006): Basic DNA Measurement by Flow Cytometry. In: *Flow Cytometry. Educational Guide*. Dako, 119. p.
- Dodsworth, S.-Leitch, A. R.-Leitch, I. J. (2015): Genome size diversity in angiosperms and its influence on gene space. *Current Opinion in Genetics and Development*, 35. 73-78.
- Doležel, J.-Bartoš, J. (2005): Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany*, 95(1): 99-110.
- Doležel, J.-Greilhuber, J.-Suda, J. (2007): Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols*. 2(9): 2233-2244.
- Galbraith, D.-Villalobos-Menuet, E. (2018): Analysis of plant genome sizes using flow cytometry: a case study demonstrating dynamic range and measurement linearity. <https://www.beckman.com/gated-media?mediaId=%7BE4CF5A60-0C84-458B-862A-54CD881FF82F%7D>
- Givan, A. L. (2001): *Flow cytometry. First principles*. 2nd ed. Wiley-Liss Inc., 304. p.
- Guignard, M. S.-Nichols, R. A.-Knell, R. J.-Macdonald, A.-Romila, C. A.-Trimmer, M.-Leitch, I. J.-Leitch, A. R. (2019): Genome size and ploidy influence angiosperm species' biomass under nitrogen and phosphorus limitation. *New Phytologist*, 210. 1195-1206.
- Györei M.-Nagy Sz.-Lepossa A. (2017): Csomós ebír (*Dactylis glomerata* L.) törzsállomány eltérő fenotípusú egyedeinek gyors citogenetikai vizsgálata. XXIII. Ifjúsági Tudományos Fórum, 2017. május 26., Keszthely, ISBN: 978-963-9639-87-4, CD-n megjelent összefoglaló. 1-6.
- Internet 1: www.flowingsoftware.com
- Joachimiak, A.-Kula, A.-Sliwinka, E.-Sobieszczyńska, A. (2001): C-banding and nuclear DNA amount in six *Bromus* species. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 43: 105-115.
- Kolář, F.-Čertner, M.-Suda, J.-Schönschetter, P.-Husband, B. C. (2017): Mixed-ploidy species: progress and opportunities in polyploid research. *Trends in Plant Science*, 22: 1041-1055.
- Leitch, I. J.-Johnston, E.-Pellicer, J.-Hidalgo, O.-Bennett, M. D. (2019): *Plant DNA C-values Database*. v7.1, 2019. április. <https://cvalues.science.kew.org/>
- Lepossa A.-Nagy Sz. T. (2016): Csomós ebír (*Dactylis glomerata* L.) fenotípusos változatainak automatizált citogenetikai vizsgálata. In: Nagy Z. B. (szerk.) LVIII. Georgikon Napok: Felmelegedés, ökolábnyom, élelmiszerbiztonság. Keszthely, Pannon Egyetem Georgikon Kar, 102.
- Lepossa A.-Nagy Sz. T. (2022): A keszthelyi fű-fajtafenntartáshoz kapcsolódó kvantitatív genomméret vizsgálatok. In: Polgár Zs.-Karsai I.-Bóna L.-Matuz J.-Taller J. (szerk.): XXVIII. Növénynevelési Tudományos Napok, Összefoglaló kötet. Keszthely, Magyar Növénynevelítők Egyesülete, 122 p., pp. 55.
- Loureiro, J.-Kopecký, D.-Castro, S.-Santos, C.-Silveira, P. (2007): Flow cytometric and cytogenetic analyses of Iberian Peninsula *Festuca* spp. *Plant Syst. Evol.* 269. 89-105.
- Ochatt, S. J. (2008): *Flow Cytometry in Plant Breeding*. Cytometry, Part A. 73A. 581-598.
- Pellicer, J.-Leitch, I. J. (2020): The Plant DNA C-values database (release 7.1): an updated online repository of plant genome size data for comparative studies. *New Phytologist*, 226. 301-305.
- Pustahija, F.-Brown, S. C.-Bogunić, F.-Bašić, N.-Muratović, E.-Ollier, S.-Hidalgo, O.-Bourge, M.-Stevanović, V.-Siljak-Yakovlev, S. (2013): Small genomes dominate in plants growing on serpentine soils in West Balkans, an exhaustive study of 8 habitats covering 308 taxa. *Plant Soil*, 373. 427-453.
- Qiu, Y.-Hamernick, S.-Ortiz, J. B.-Watkins, E. (2020): DNA content and ploidy estimation of *Festuca ovina* accessions by flow cytometry. *Crop Science*, 60. 2757-2767.
- Simonin, K. A.-Roddy, A. B. (2018): Genome downsizing, physiological novelty, and the global dominance of flowering plants. *PLoS Biology*, 16:e2003706
- Sliwinka, E. (2018): Flow cytometry – a modern method for exploring genome size and nuclear DNA synthesis in horticultural and medicinal plant species. *Folia Hort.*, 30(1): 103-128.
- Šmarda, P.-Bureš, P.-Horová, L.-Foggi, B.-Rossi, G. (2008): Genome Size and GC Content Evolution of *Festuca*: Ancestral Expansion and Subsequent Reduction. *Annals of Botany*, 101(3): 421-433.
- Suda, J.-Krahlucova, A.-Trávníček, P.-Krahluc, F. (2006): Ploidy level versus DNA ploidy level: an appeal for consistent terminology. *Taxon*, 55. 447-450.
- Suda, J.-Meyerson, L. A.-Leitch, I. J.-Pyšek, P. (2015): The hidden side of plant invasions: the role of genome size. *New Phytologist*, 205. 994-1007.

Tuna, M.-Vogel, K. P.-Arumuganathan, K.-Gill, K. S. (2001): DNA Content and Ploidy Determination of Bromegrass Germplasm Accessions by Flow Cytometry. *Crop Sci.*, 41. 1629-1634.

Wake, C. M.-Schaefer, P. R.-Jost L. K.-Evenson, D. P. (1995): Analysis of intraspecific nuclear DNA content variation in *Gleditsia triacanthos* by flow cytometry. *Canadian Journal of Forest Research*, 25(3): 440-445.