© Zool.-Bot. Gesellschaft Österreich, download unter www.biologiezentrum.at
Bryologische Forschung in Österreich
Abh. Zool.-Bot. Ges. Österreich **30** (1999): 169-177

Genomgrößenanalyse bei Laubmoosen

Hermann VOGLMAYR und Johann GREILHUBER

Die Genomgrößen von 263 Laubmoosherkünften aus insgesamt 123 Arten wurden mittels Propidiumjodid Flowzytometrie und Feulgen Densitometrie ermittelt; die Herkünfte stammten aus Österreich, der Schweiz, Spanien, Mexiko und den USA. Die 1C DNA Gehalte der vorliegenden Studie lagen zwischen 0,174 und 2,049 pg und entsprachen damit einer nur 12-fachen Variationsbreite. Bei Arten mit mehreren Herkünften lagen die Unterschiede in der Regel bei unter 15%, was für große Konstanz der Genomgröße innerhalb der Arten spricht. Diese Konstanz der Genomgröße lässt sich oft auch auf Gattungs- oder Familienebene feststellen. Polyploidie konnte nur in wenigen Fällen nachgewiesen werden und spielt bei Laubmoosen nur eine untergeordnete Rolle. Der Vergleich zwischen Propidiumjodid Flowzytometrie und Feulgen Densitometrie ergab beinahe identische Werte, ein Beweis für die Genauigkeit und Anwendbarkeit beider Methoden in der Genomgrößenanalyse.

VOGLMAYR, H. & GREILHUBER, J. 1999 Genome size analysis in mosses.
Genome sizes from 263 accessions belonging to 123 moss species were investigated using propidium iodide flow cytometry and Feulgen densitometry, respectively The accessions originated from Austria, Switzerland, Spain, Mexico and the USA. 1C DNA contents obtained in the present study ranged from 0,174 to 2,049 pg, representing a less than 12-fold variation. Species where more than one accession was measured usually showed less than 15% variation which is good evidence for genome size stability within a species. Constancy in genome size was often also present on genus or family level. Only in a few cases could polyploidy be demonstrated and is of low importance in mosses. Comparison between propidium iodide flow cytometry and Feulgen densitometry usually revealed almost identical results, demonstrating exactness and applicability of both methods for genome size analysis.

Keywords: genome size analysis, DNA content, propidium iodide flow cytometry, Feulgen densitometry, mosses.

Einleitung

Da bei Laubmoosen kaum Daten über Genomgröße bekannt sind und die Genomgröße für eine ganze Reihe von biologischen Fragestellungen von

 © Zool.-Bot. Ges. Österreich, Austria; download unter

zentraler Bedeutung ist (siehe GREILHUBER et al. 1999), war es von besonderem Interesse, bei den Laubmoosen ein breit angelegtes Screening auf Genomgröße durchzuführen. Im Rahmen einer Studie wurde daher versucht, Arten aus möglichst vielen Laubmoosfamilien in die Analyse miteinzubeziehen, um ein repräsentatives Bild über Genomgrößenvariation bei Laubmoosen zu erhalten. Dabei zeigte es sich, dass sich die Laubmoose in Bezug auf die Genomgrößenvariation grundlegend von den übrigen Landpflanzen unterscheiden.

Material und Methoden

Die Laubmoose wurden nach der Aufsammlung im Gelände möglichst rasch verarbeitet. Für die Feulgen-Färbung wurden Sprößchenspitzen in Methanol-Eisessig (1:3) etwa einen Tag fixiert, das Fixiergemisch gegen Ethanol (96%) getauscht und bei –20 °C gelagert. Die Herbarbelege befinden sich im Privatherbar des Erstautors und im Herbar des Instituts für Botanik der Universität Wien (WU).

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen wurden hauptsächlich mit Flowzytometrie von Propidiumjodid-gefärbten Zellkernen gewonnen. Als interner Standard wurden Blätter von Sojabohne (*Glycine max* 'Ceresia', 1C=1,134 pg) verwendet. Für die Kernisolation wurde das Protokoll von BARANYI & GREILHUBER (1995) entsprechend modifiziert: 5-15 frische Sprößchenspitzen des Mooses und ein halbes junges Sojabohnenblatt wurden mit einer Rasierklinge in 0,55 ml Isolationspuffer (0,1M Zitronensäurepuffer mit Triton X-100 als Detergens) zerhackt, das Volumen mit Puffer auf 1 ml aufgefüllt und filtriert. Nach einem RNAse-Verdau (Endkonzentration 0,15 mg/ml; 30 Minuten bei 37° C) wurden 0,4 ml Kernsuspension mit 2 ml Propidiumjodid-Färbelösung (für die Rezeptur siehe BARANYI & GREILHUBER 1996) versetzt und nach mindestens 20 Minuten mit einem Partec CA II Flowzytometer vermessen (für genaue Ausstattung siehe GREILHUBER & OBERMAYER 1997).

Als zweite Messmethode kam in wenigen Fällen auch Feulgen-Densitometrie mit dem Bildanalyse-System CIRES (Kontron) zum Einsatz, um die Werte der Propidiumjodid-Flowzytometrie abzusichern. Die Hydrolyse und anschließende Feulgen-Färbung der Zellkerne folgte dem Protokoll von GREILHUBER & EBERT (1994). Dabei dienten Telophasen von Sojabohnenwurzelspitzen (*Glycine max* 'Ceresia') als interner Standard; bei

 © Austria; download unter www.biologiezentrum.at

den Moosen wurden unreplizierte Interphase-G1 (1C) Kerne von jungen Blättchen aus dem Spitzenmeristembereich der Sprößchen vermessen.
Die Auswertung der Ergebnisse und grafische Aufbereitung erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS für Windows 7.5 (SPSS, Chicago, Ill.).

Ergebnisse

Im Rahmen dieser Studie konnte die haploide Genomgröße (1C) von 263 Laubmoosherkünften aus insgesamt 123 Arten ermittelt werden. Die meisten Herkünfte stammten aus Österreich (171), einige auch aus der Schweiz (11), Spanien (11), Mexiko (23) und den USA (47). Die Kernisolation aus dem Moosgewebe erwies sich oft als relativ schwierig, da sich das harte und zähe Gewebe schlecht präparieren ließ. In der Regel ließen sich aber nach Anpassung des Isolationsprotokolles gute Ergebnisse erzielen; bei einigen Taxa war es allerdings unmöglich, gute Flow-Histogramme zu erhalten. Als mögliche Ursache dafür kommen die Kernfärbung störende Zellinhaltsstoffe in Betracht.
Der Vergleich zwischen Propidiumjodid Flowzytometrie und Feulgen Densitometrie ergab beinahe identische Werte; der Unterschied zwischen beiden Messmethoden lag in der Regel unter 10%. Dies ist ein deutlicher Beweis für die Genauigkeit und Verwendbarkeit beider Methoden für die Genomgrößenanalyse und sichert die erhaltenen Werte sehr gut ab.
1C DNA Gehalte der vorliegenden Studie lagen zwischen 0,174 und 2,049 pg und waren damit etwas höher als der niedrigste bekannte Wert bei den Angiospermen (*Arabidopsis thaliana* mit 1C=0,15 pg). Die meisten Arten hatten Werte zwischen 0,25 und 0,6 pg (mehr als 80%; Abb. 1); oberhalb 0,6 pg nahm die Anzahl von Arten rapide ab. Insgesamt konnte also eine etwa 12-fache Genomgrößenvariation festgestellt werden; der Großteil der Werte (mehr als 80%!) befindet sich in einem nur 2,4-fachen Variationsbereich. Nach der Entwicklung eines entsprechenden Kernisolationsprotokolles war die Qualität der Messungen sehr hoch; normalerweise lagen die CVs bei den Standard-Peaks zwischen 1,2 und 2%, bei den Laubmoosen zwischen 2 und 6%.
Als weiteres wichtiges Ergebnis zeigte es sich, dass die Genomgröße innerhalb einer Art sehr konstant ist. Innerhalb derselben Ploidiestufe lag der Quotient zwischen dem größten/kleinsten Mittelwert immer unter 1,3 (Abb. 2); in der Regel waren die Unterschiede zwischen verschiedenen Herkünften

 © Zool.-Bot. Ges. Österreich, Austria; download unter www.biologiezentrum.at

geringer als 10%, und damit nicht mehr eindeutig vom Messfehler trennbar. Diese hohe Auflösung ist bemerkenswert, wenn man die geringe Genomgröße bedenkt, und sie ist ein Beweis für die Anwendbarkeit der Propidiumjodid-Flowzytometrie auch bei kleinen Genomgrößen, obwohl nicht verschwiegen werden sollte, dass die Laubmoose am unteren derzeit messbaren Bereich liegen. Es ist auch interessant, dass die Genomgrößen bei Herkünften derselben Art aus Europa und Nordamerika praktisch identisch sind. In zwei Fällen wiesen die Werte auf das Vorliegen von Polyploidie innerhalb derselben Art hin (Diploidie bei *Rhizomnium punctatum* und Triploidie bei *Atrichum undulatum*), was bei *Atrichum undulatum* aufgrund von Chromosomenzählungen bereits belegt ist.

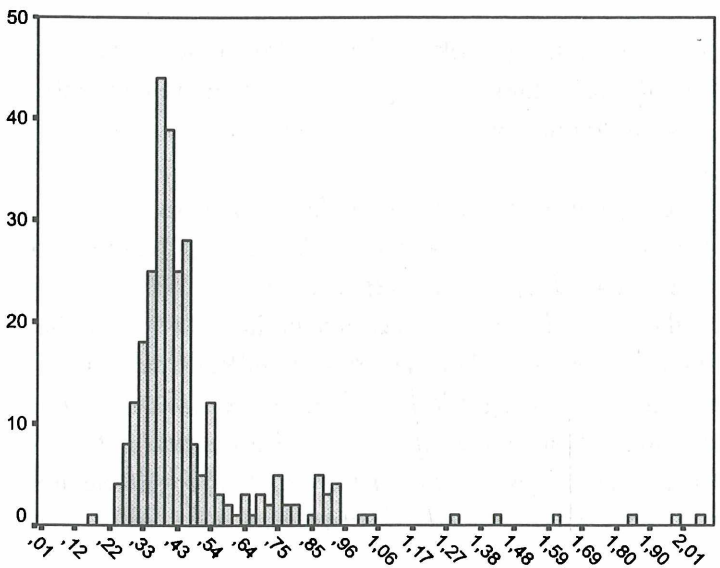

Abb. 1. 1C pg Werte aller gemessenen Laubmoosherkünfte. 1C pg values of all accesions measured.

Relative Konstanz der Genomgröße ist nicht nur auf die Arten beschränkt, sondern ist oft auch bei Gattungen oder sogar Familien zu beobachten. Abb. 3 zeigt ein typisches Beispiel für eine Familie mit geringer Genomgrößenvariation. Manchmal ist die Genomgröße etwas variabler mit 2 oder mehr angrenzenden Peaks (Abb. 4). Diese Variation ist interessanterweise meist nicht mit bekannten Chromosomenzahlen korreliert.

© Biologiezentrum Linz, Austria; download unter www.biologiezentrum.at

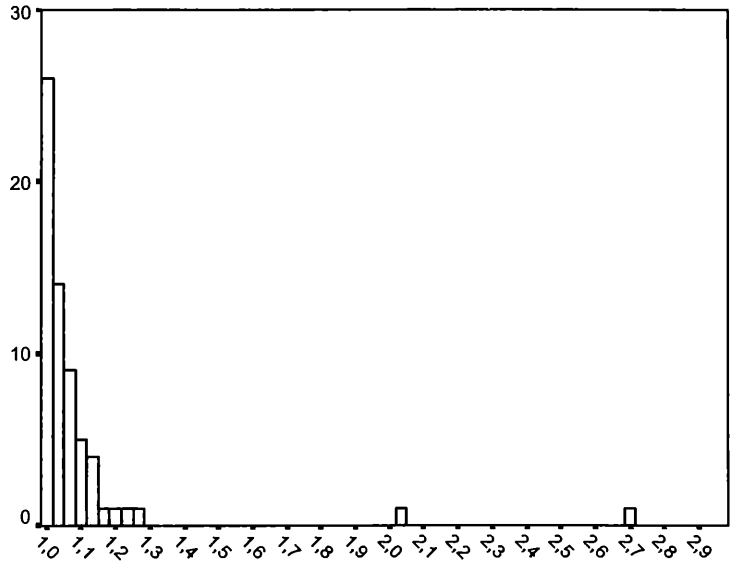

Abb. 2. Quotient des höchsten/tiefsten Mittelwertes bei arten mit mehreren Herkünften. Quotient of max./min. mean of species with more than one accesion.

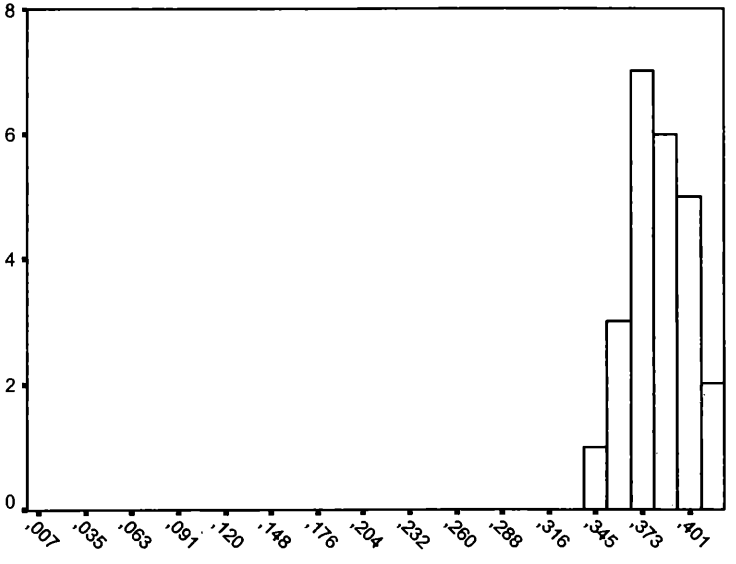

Abb. 3. 1C pg Werte aller gemessenen Herkünfte der *Thuidiaceae*. 1C pg values of all measured accesions of *Thuidiaceae*.

© Zool.-Bot. Ges. Österreich, Austria; download unter

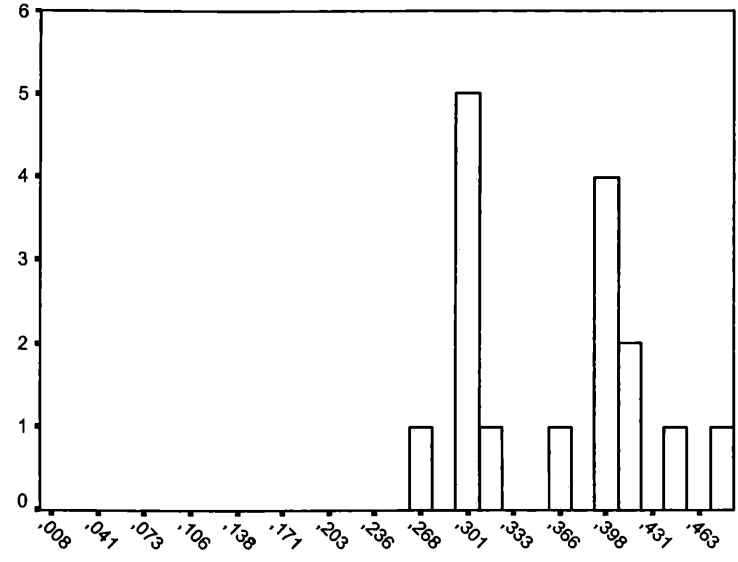

Abb. 4. 1C pg Werte aller gemessenen Herkünfte der Gattung *Hypnum*. 1C pg values of all measured accesions of *Hypnum*.

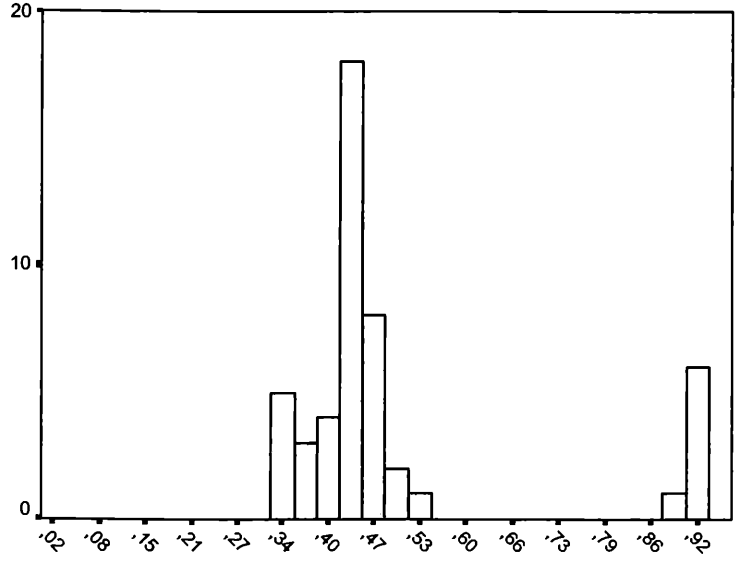

Abb. 5. 1C pg Werte aller gemessenen Herkünfte der *Brachytheciaceae*. 1C pg values of all measured accesions of *Brachytheciaceae*.

 Austria; download unter www.biologiezentrum.at

In einigen Fällen ist auch das Auftreten von Diploidie ersichtlich (Abb. 5), was auch durch bekannte Chromosomenzahlen belegt ist. In diesen Fällen konnten vorherige Hypothesen über Polyploidie bestätigt werden. Nur selten ist die Genomgröße kontinuierlich über einen weiten Bereich verteilt (Abb. 6).
Eine detaillierte Publikation der zugrundeliegenden Daten ist in Vorbereitung.

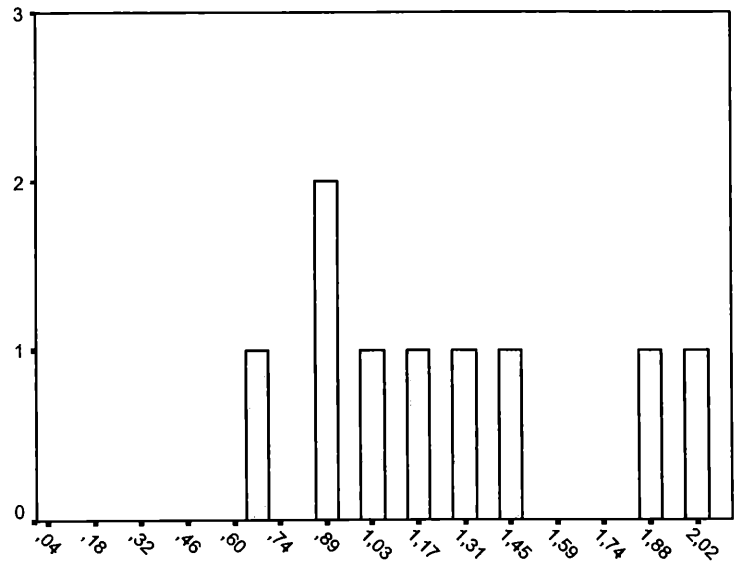

Abb. 6. 1C pg Werte aller gemessenen Herkünfte der *Mniaceae*. 1C pg values of all measured accesions of *Mniaceae*.

Diskussion

Dies ist die erste Arbeit über Genomgrößenverteilung bei Laubmoosen auf einer breiteren Basis; außer *Sphagnum* wurden Herkünfte aus möglichst vielen Familien untersucht. Die einzigen vergleichbaren Arbeiten betreffen die Gattung *Sphagnum*, die von TEMSCH et al. (1998) ausführlich bearbeitet wurde und deshalb hier nicht berücksichtigt ist, und die Arbeit von RENZAGLIA et al. (1995) über nordamerikanische Herkünfte von 8 Laubmoosarten, deren Daten jedoch aufgrund methodischer Mängel zweifelhaft sind.

 © Zool.-Bot. Ges. Österreich, Austria; download unter

Die geringe Variationsbreite der Genomgröße bei den Laubmoosen ist bemerkenswert im Vergleich mit den Angiospermen (mit einer etwa 600-800-fachen Variation!) und weist darauf hin, dass die Akkumulation von repetitiver DNA bei den Laubmoosen nur eine geringe Rolle spielt. Von RENZAGLIA et al. (1995) wurde eine interessante Erklärung für dieses Phänomen gegeben: Da die Moosspermien zweigeißelig sind, können sie nur eine bestimmte Größe erreichen, da sonst ihre Beweglichkeit stark abnehmen würde. Da nun Spermien fast zur Gänze mit dem Zellkern ausgefüllt sind, begrenzt diese maximal mögliche Spermiengröße damit auch die Kerngröße, wodurch eine deutliche obere Grenze der Genomgröße zustande kommt.

Danksagung

Diese Studie wurde von Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Projekt P11039-BIO) gefördert.

Literatur

BARANYI, M. & GREILHUBER, J. 1995. Flow cytometric analysis of genome size variation in cultivated and wild *Pisum sativum* (*Fabaceae*). *Plant Systematics and Evolution* 194: 231-239.

BARANYI, M. & GREILHUBER, J. 1996. Flow cytometric and Feulgen densitometric analysis of genome size variation in Pisum. *Theoretical and Applied Genetics* 92: 297-307

GREILHUBER, J. & EBERT, I. 1994. Genome size variation in *Pisum sativum*. *Genome* 37: 646-655.

GREILHUBER, J., VOGLMAYR, H., TEMSCH, E.M., OBERMAYER, R. & KRISAI, R. 1999. Genomgrößen-Variation bei Moospflanzen – Methoden, Probleme, biologische Bedeutung. In: ZECHMEISTER, H.G. (Hrsg.). Bryologische Forschung in Österreich. *Abh. Zool.-Bot. Ges. in Österreich* 30: 5-15.

GREILHUBER, J. & OBERMAYER, R. 1997 Genome size and maturity group in *Glycine max* (soybean). *Heredity* 78: 547-551.

 © Austria; download unter www.biologiezentrum.at

RENZAGLIA, K.S., RASCH, E.M. & PIKE, L.M. 1995. Estimates of nuclear DNA content in bryophyte sperm cells: phylogenetic considerations. *American Journal of Botany* 82: 18-25.

TEMSCH, E.M., GREILHUBER, J. & KRISAI, R. 1998. Genome size in *Sphagnum* (peat moss). *Botanica Acta* 111. 325-330.

Anschrift der Verfasser: Mag. Hermann VOGLMAYR und Univ. Prof. Dr. Johann GREILHUBER, Institut für Botanik der Universiät Wien, Rennweg 14, A-1030 Wien.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Abhandlungen der Zoologisch-Botanischen Gesellschaft in Österreich

Jahr/Year: 1999

Band/Volume: 30

Autor(en)/Author(s): Voglmayr Hermann, Greilhuber Johann

Artikel/Article: Genomgrößenanalyse bei Laubmoosen. 169-177