© Zool.-Bot. Ges. Österreich; download unter www.biologiezentrum.at
Bryologische Forschung in Österreich
Abh. Zool.-Bot. Ges. Österreich **30** (1999): 159-167

# Genomgrößen-Bestimmung bei *Sphagnum*: ein Methodenvergleich

Eva M. TEMSCH, Johann GREILHUBER, Hermann VOGLMAYR und Robert KRISAI

An 30 österreichischen Taxa von *Sphagnum* wurde die Genomgröße (DNA-Gehalt des Chromosomensatzes) Feulgen-densitometrisch mit dem Cell Image Retrieval and Evaluation System (CIRES; Kontron, München) gemessen. Aus diesen wurden 10 Taxa zufällig ausgewählt und deren DNA-Gehalt zum Vergleich mit dem Mikroskop-Photometer MPV2 (LEITZ) gemessen. Der DNA-Gehalt weiterer 5 Herkünfte (4 Taxa) wurde mit Durchflusszytometern (CA II, PA II; Partec) bestimmt.
Es konnte zwischen den beiden gametophytischen Polyploidiestufen von 0.392 bis 0.506 pg DNA (x, 1C) und 0.814 bis 0.952 pg DNA (2x, 1C) bereits nach der Messung von wenigen Kernen eindeutig unterschieden werden. Das mittlere Verhältnis dieser beiden Polyploidiestufen betrug 1:2.049. Für *S. contortum* und *S. brevifolium* wurde das haploide Niveau erstmals festgestellt. Weiters wurde der Polyploidiegrad einiger Arten mit unterschiedlichen Literaturangaben für die österreichischen Herkünfte bestimmt. Die Korrelation der mit den verschiedenen Methoden gewonnenen Ergebnisse war im Fall von CIRES versus MPV2 hoch signifikant ($r = 0.9613$, $P < 0.001$, $n = 10$) und auch im Fall von CIRES versus Durchflusszytometer signifikant ($r = 0.9109$, $P = 0.032$, $n = 5$).

TEMSCH, E.M., GREILHUBER, J., VOGLMAYR, H. & KRISAI, R. 1999. Genome size determination in *Sphagnum* - a comparison of methods.
Genome size (DNA content of the karyotype) has been determined by Feulgen densitometry in 30 *Sphagnum* taxa of Austrian origin, using the Cell Image Retrieval and Evaluation System (CIRES; Kontron, Munich). In ten arbitrarily chosen taxa, genome size was also measured with the MPV2 (Leitz) scanning densitometer Five accessions (4 taxa) were further measured with flow cytometry (CA II, PA II; Partec).
The gametophytic ploidy levels x and 2x ranging from 0.392 to 0.506 pg DNA (x, 1C) and from 0.814 to 0.952 pg DNA (2x, 1C) could be unambiguously discriminated soon after measuring a few nuclei. The average ratio between the ploidy levels was 1:2.049. For the first time, the haploid level was stated for *S. contortum* and *S. brevifolium*. Furthermore, the ploidy level was determined for the first time for some Austrian taxa, for which divergent or deviating reports exist in the literature. The correlation of the data obtained with the CIRES and the MPV2 was highly significant ($r = 0.9613$, $P < 0.001$). Also the data obtained

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

with the CIRES and flow cytometry were significantly correlated (r = 0.9109, P = 0.032, n = 5).

Keywords: genome size, Feulgen-densitometry, image analysis, flow cytometry, *Sphagnum*.

# Einleitung

Die Landpflanzen (Embryophyta) variieren in ihrer Genomgröße (DNA-Menge im Chromosomensatz) beträchtlich, nämlich nahezu 1000-fach. Die Genomgröße hat Anpassungswert (BENNETT 1972), da sie Zellgröße und Zellzyklusdauer beeinflusst, und ist als quantitatives Merkmal für die Taxonomie wichtig (GREILHUBER & EHRENDORFER 1988). Während Angiospermen und zum Teil auch Gymnospermen in dieser Hinsicht einigermaßen untersucht sind, gab es bisher über Moospflanzen fast keine Daten (GREILHUBER et al. 1999, VOGLMAYR & GREILHUBER 1998) und diese waren vor allem wenig verläßlich. Deshalb wurde in einer Arbeitsgruppe am Botanischen Institut der Universität Wien damit begonnen, die Genomgrößenvariation der Moospflanzen mit verschiedenen Methoden zu untersuchen. Der Gattung *Sphagnum* (x = 19 plus eine gewisse Anzahl von Mikrochromosomen) wurde wegen ihrer Einzigartigkeit und ökologischen Bedeutung Priorität eingeräumt (TEMSCH, GREILHUBER & KRISAI 1998).
Zur Genomgrößen-Bestimmung werden gegenwärtig hauptsächlich die zwei folgenden Methoden in verschiedenen Varianten eingesetzt: (1) Feulgen-Densitometrie mit Scanning-Geräten oder Bildanalysegeräten auf Videobasis; (2) Durchflusszytometrie von Zellkernisolaten unter Verwendung von DNA-spezifischen Fluorochromen. Bei all diesen Methoden wird die DNA der Zellkerne stöchiometrisch gefärbt, wobei ein Organismus mit bekannter Genomgröße als innerer Standard dient. Die relative Intensität der Färbung der Kerne des Testorganismus ist ein Maß für die im Genom vorhandene DNA-Menge.

# Material und Methoden

## Feulgen-Densitometrie

Bei 30 Arten (66 zumeist österreichischen Herkünften) von *Sphagnum* wurde die Genomgröße Feulgen-densitometrisch an gametophytischen Mitosen aus meristematischen Astspitzen bestimmt. *Pisum sativum* mit einer bekannten

 ©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at 

Genomgröße (GREILHUBER & EBERT, 1994) von 4.42 pg DNA (1C, d.h. bezogen auf das haploide unreplizierte Genom) diente als interner Standard. Primäre Wurzelspitzen von *Pisum sativum* als Standardmaterial und Köpfchen von *Sphagnum* spp. als Probenmaterial wurden parallel in einem Gemisch aus Methanol und Eisessig (ME 3:1) über Nacht bei 4 °C oder zum Vergleich (GREILHUBER 1988) in 4 %iger Formaldehyd-Lösung (pH 7) 1.5 h fixiert. Die ME fixierten Gewebe wurden zur weiteren Aufbewahrung im Tiefkühlschrank bei -20 °C einfach in Ethanol (96 %) transferiert, während die in Formaldehyd fixierten Gewebe vor der Transferierung mehrmals mit ME gewaschen werden mussten, um das nicht gebundene Formaldehyd restlos zu entfernen. Das zu färbende Material (meristematische Astspitzen und Standard) wurde mit Aqua demin. gewaschen, in 5N HCl 60 Minuten bei genau 20.0 °C hydrolysiert, wieder gewaschen und in Feulgen Reagens 1.5 h bei Zimmertemperatur oder über Nacht bei 4 °C gefärbt. Danach wurde der nicht gebundene Farbstoff mit einer Lösung aus 0.5 g $K_2S_2O_5$, 5 ml 1N HCl und 95 ml Aqua demin. gründlich ausgewaschen. Aus dem gefärbten Material wurden in 45 %iger Essigsäure Quetschpräparate hergestellt. Als Messgerät diente einerseits das CIRES, andererseits zum Vergleich bei 10 zufällig ausgewählten Arten zusätzlich das Mikroskop-Photometer MPV2.
Es wurden je 10 Metaphasekerne (2C) von je 3 Präparaten von *Sphagnum* spp. und parallel dazu dieselbe Anzahl an Telophasekernen (2C) von *Pisum sativum* gemessen. Aufgrund des gemessenen Verhältnisses der integrierten optischen Dichte von Objekt und Standard wurde auf Basis des bekannten DNA-Gehaltes pro 1C von *Pisum sativum* der DNA-Gehalt pro 1C von *Sphagnum* spp. berechnet.

**Durchflusszytometrie**

Die Genomgrößen von 5 Herkünften (4 Taxa) wurden zum Vergleich mit Durchflusszytometern von Partec (CA II und PA II) mit einer Quecksilberlampe als Lichtquelle gemessen. Dazu wurden Capitula von *Sphagnum* spp. in Aqua demin. gewaschen und zusammen mit dem Standard, nämlich jungen Blättchen von *Glycine max*, in Isolationspuffer (BARANYI & GREILHUBER 1996) mit einer Rasierklinge bei Raumtemperatur zerkleinert. Die Kernsuspension wurde mittels eines Nylonnetzes mit 30 µm Maschenweite von den größeren Zellwandfragmenten getrennt, 30 Minuten mit RNase bei 37 °C behandelt und mit Propidiumjodid-Färbelösung (PI) mindestens 20 Minuten unter Lichtabschluss gefärbt. Es wurden mindestens 3 Messungen pro Präparation durchgeführt.

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

Die Genomgröße wurde aus dem Verhältnis der Fluoreszenzintensität von Objekt und dem bekannten Standard (*Glycine max*, 1C = 1.134 pg) berechnet.

## Ergebnisse und Diskussion

Zwei gametophytische Polyploidiestufen, haploid und diploid, konnten unzweideutig unterschieden werden (Abb. 1). 26 haploide Arten ergaben Werte zwischen 0.392 und 0.506 pg DNA (1C) und vier diploide Arten zwischen 0.814 und 0.952 pg DNA (1C). Das durchschnittliche Verhältnis der Ploidiestufen war 1:2.049, was der theoretischen Erwartung der Verdoppelung des Grundgenoms sehr genau entspricht. Der Variationskoeffizient innerhalb eines Präparates war nie größer als 3 %, und die Variation zwischen Präparaten einer Herkunft war fast nie größer als 4 %. Aus der scharfen Trennung der Ploidiestufen in der Gattung *Sphagnum* ergibt sich, dass mit Densitometrie schon an wenigen Zellkernen eine Bestimmung des Ploidiegrades möglich ist. Dies ist eine praktische Alternative zur Chromosomenzählung, die bei *Sphagnum* insbesondere an Gametophyten sehr schwierig ist.

Die Gattung *Sphagnum* ist also in ihrer Grundgenomgröße sehr einheitlich. Dies passt zur Einheitlichkeit des morphologischen Erscheinungsbildes, überrascht aber dennoch in Anbetracht des vermutlich hohen phylogenetischen Alters dieser Gruppe.

Die gefundenen Polyploidiegrade der Taxa stimmten weitgehend mit den Literaturdaten überein (NEWTON 1993). Bei *S. contortum* und *S. brevifolium* wurde erstmals der Polyploidiegrad, nämlich haploid, bestimmt. Bei vier Arten mit unterschiedlichen Angaben in der Literatur wurden folgende Ergebnisse erzielt: *S. magellanicum*, x (BRYAN 1955, MAASS & HARVEY 1973, FRITSCH 1991); *S. papillosum*, 2x (SMITH & NEWTON 1968, MASS & HARVEY 1973); *S. denticulatum*, x (SMITH & NEWTON 1968, BRYAN 1955, FRITSCH 1991); *S. squarrosum*, x (FRITSCH 1991, SORSA 1955). Verschiedene Herkünfte einer Art waren zumeist kaum oder nicht signifikant verschieden, nur bei *S. magellanicum* und *S. papillosum* waren Unterschiede (1.088-fach bzw. 1.063-fach) deutlich signifikant ($P < 0.01$). Eine statistische Analyse zeigte, dass die Arten innerhalb einer Sektion weniger variierten als zwischen den Sektionen, wodurch die systematische Bindung der Genomgröße selbst bei so kleinen Unterschieden sichtbar wird.

 ia; download unter www.biologiezentrum.at 

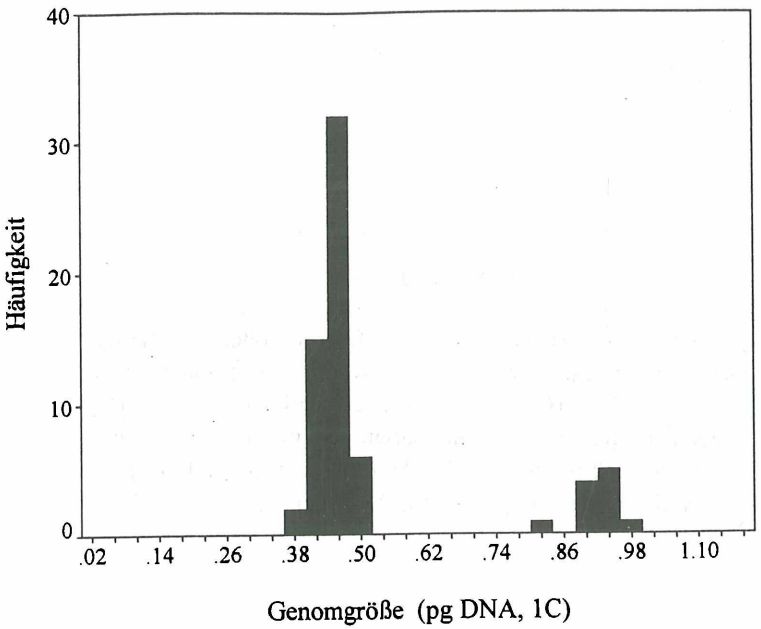


Abb. 1. Häufigkeitsverteilung der Genomgrößen (pg DNA, 1C) von 66 *Sphagnum*-Aufsammlungen aus 26 haploiden und 4 diploiden Taxa. Die Polyploidie-Niveaus sind klar voneinander abgegrenzt. (Aus TEMSCH et al. 1998). - Frequency distribution of genome size (pg DNA, 1C) in 66 *Sphagnum* accessions of 26 haploid and 4 diploid taxa. The two levels of polyploidy are clearly separated. (From TEMSCH et al. 1998).

Da mit der Genomgrößen-Bestimmung auf Videobasis allgemein noch wenig Erfahrung existiert, wurden bei zehn Taxa Präparate aus der selben Charge auch auf dem Scanning-Mikroskop-Photometer MPV2 (Leitz) gemessen (Abb. 2). Die Werte waren hoch korreliert ($r = 0.9613$, $P < 0.001$) und mit dem MPV2 nur um 2.2 % höher (n.s.). Bei einer nur 1.147-fachen Streuung zwischen den Proben ist dies ein sehr zufriedenstellendes Ergebnis.
Als drittes Verfahren wurde Durchflusszytometrie eingesetzt. Diese Methode ist bisher nur bei Verwendung von Lebendmaterial effizient, was die Anwendbarkeit in der Praxis einschränkt. Die Qualität der Ergebnisse (Debris, Streuung) wird bei *Sphagnum* durch degeneratives Kernmaterial sowie Commensalen negativ beeinflusst.

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

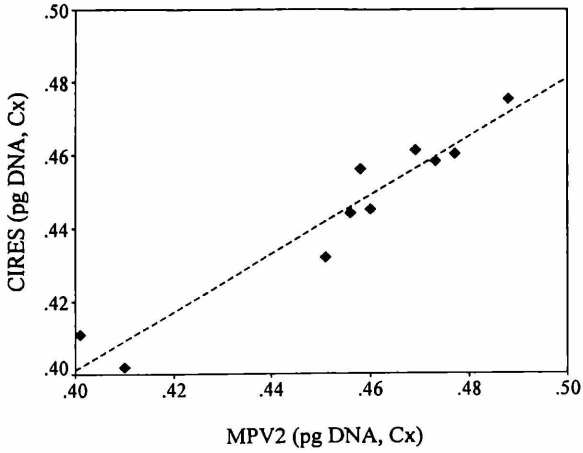


Abb. 2. Vergleichende Feulgen-Messungen der Genomgrößen von *Sphagnum*-Arten mit den beiden Densitometrie-Systemen CIRES und MPV2. Die auf das haploide x-Niveau bezogenen Werte (pg DNA, $1C_x$) korrelieren hoch signifikant ($r = 0.9613$, $P < 0.001$). Comparative Feulgen genome size measurements in *Sphagnum* species using the densitometry systems CIRES and MPV2. The data corresponding to the haploid x-level are highly significantly correlated ($r = 0.9613$, $P < 0.001$).

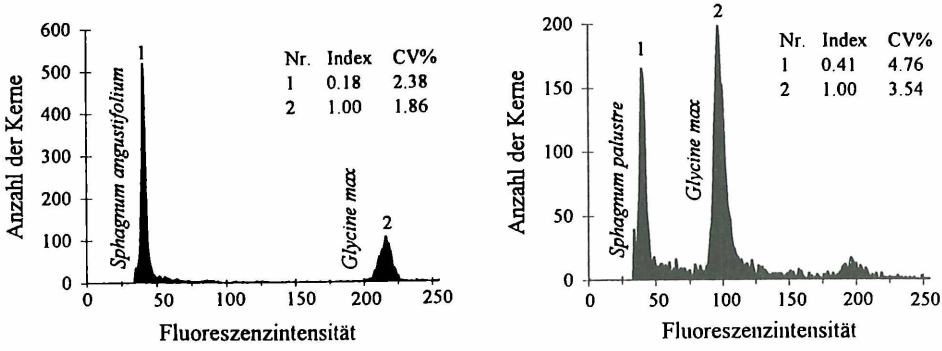


Abb. 3. Durchflusszytometrische-Messungen der Genomgrößen von *Sphagnum angustifolium* und *S. palustre* als Beispiel für haploide und diploide Taxa. Als innerer Standard wurde *Glycine max* (1C = 1.134 pg) verwendet. Flow cytometric measurements of genome size in *Sphagnum angustifolium* and *S. palustre* as examples for haploid and diploid taxa. *Glycine max* (1C = 1.134 pg) served as internal standard.

 ©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at 

Dennoch lässt sich auch bei *Sphagnum* die Durchflusszytometrie zur Genomgrößen-Bestimmung heranziehen (Abb. 3). *Glycine max* wurde als innerer Standard verwendet. Bisher wurden fünf Herkünfte von vier Taxa verglichen (CIRES vs. Durchflusszytometrie, Tab. 1), wobei nur ein Taxon (*S. angustifolium*) durch einen deutlich niedrigeren Wert abwich.

Dennoch war die Korrelation der Werte signifikant (r = 0.9109, P = 0.032). Dies deutet auf echte Genomgrößenunterschiede hin, doch müssen diese Analysen noch ausgeweitet werden. Im Durchschnitt waren die durchflusszytometrischen Werte lediglich 1.013-fach höher als die Werte mit dem CIRES.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bei *Sphagnum* die Bestimmung der Genomgröße und des Polyploidiegrades einfach und präzise mit Feulgen-Densitometrie durchgeführt werden kann. Erforderlich sind Fixierungen von mitotisch aktivem Material, die bei -20 °C jahrelang haltbar sind, ein Zytophotometer und die Kenntnis der Methodik. *Sphagnum* ist auch für Durchflusszytometrie geeignet, doch ist diese Methode in der Praxis nur mit Frischmaterial verlässlich und daher weniger universell einsetzbar.

Tab. 1 Genomgrößen-Bestimmung bei *Sphagnum* mit Feulgen-Densitometrie (CIRES) und mit PI-Durchflusszytometrie (PI). Die x-Werte korrelieren signifikant (r = 0.9109, P = 0.032, n = 5). Genome size measurements in *Sphagnum* obtained with Feulgen densitometry (CIRES) and flow cytometry (PI). The data (x-level) are significantly correlated (r = 0.9109, P = 0.032, n = 5).

| | Genomgröße (pg DNA, 1C) | |
|---|---|---|
| Spezies (Ploidiestufe) | Feulgen | PI |
| *S. girgensohnii* (x) | 0.467 | 0.470 |
| *S. girgensohnii* (x) | 0.467 | 0.476 |
| *S. magellanicum* (x) | 0.463 | 0.482 |
| *S. angustifolium* (x) | 0.445 | 0.434 |
| *S. palustre* (2x) | 0.918 | 0.937 |
| | (0.459)[1] | (0.469)[1] |

[1] Auf das haploide x-Niveau bezogener Wert, der für die Korrelation verwendet wurde.

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

## Danksagung

Diese Studie wurde von der Hochschuljubiläumsstiftung der Stadt Wien und dem Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Projekte P11039-BIO und P12674-GEN) unterstützt.

## Literatur

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

BENNETT, M.D. 1972. Nuclear DNA content and minimum generation time in herbaceous plants. *Proc. Roy. Soc. London, Ser. B, Biol. Sci.* 181. 109-135.

BRYAN, V.S. 1955. Chromosome studies in the genus *Sphagnum*. *Bryologist* 58: 16-39.

FRITSCH, R. 1991. *Index to Bryophyte Chromosome Counts*. Bryophytorum Bibliotheca Vol. 40. Verlag J. Cramer, Berlin - Stuttgart.

GREILHUBER, J. 1988. „Self-tanning" a new and important source of stoichiometric error in cytophotometric determination of nuclear DNA content in plants. *Pl. Syst. Evol.* 158: 87-96.

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

GREILHUBER, J. & EHRENDORFER, F 1988. Karyological approaches to plant taxonomy. ISI Atlas Sci.. *Animal Pl. Sci.* 1. 289-297

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

MAASS, W.S.G. & HARVEY, M.J. 1973. Studies on the taxonomy and distribution of *Sphagnum* VII. Chromosome numbers in *Sphagnum* *Nova Hedwigia* 24: 193-205.

NEWTON, M.E. 1993. Cytogenetics of *Sphagnum*. *Advances Bryol.* 5: 61-78.

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



SMITH, A.J.E. & NEWTON, M.E. 1968. Chromosome studies on some British and Irish mosses III. *Trans. Brit. Bryol. Soc.* 5: 463-522.

SORSA, V 1955. Outlines of meiosis in the moss genus *Sphagnum*. *Hereditas* 41. 250-258.

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

VOGLMAYR, H. & GREILHUBER, J. 1998. Genomgrößenanalyse bei Moosen. In: ZECHMEISTER, H.G. (Hrsg.): Bryologische Forschung in Österreich. *Abh. Zool.-Bot. Ges. in Österreich* 30: 169-177

Anschriften der Verfasser: Mag. Eva Maria TEMSCH, Univ. Prof. Dr. Johann GREILHUBER und Mag. Hermann VOGLMAYR, Institut für Botanik der Universität Wien, Rennweg 14, A-1030 Wien; Univ. Prof. Dr. Robert KRISAI, Institut für Botanik der Universität Salzburg, Hellbrunnerstr. 34, A-5020 Salzburg.

# 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): Temsch Eva Maria, Greilhuber Johann, Voglmayr Hermann, Krisai Robert

Artikel/Article: Genomgrößen-Bestimmung bei Sphagnum: ein Methodenvergleich. 159-167