Methodik cytochemischer Analysen bei pflanzlichen Objekten

IV. Einfluss methodischer Faktoren auf cytophotometrische Kern-DNA-Bestimmungen von *Vicia faba*-Wurzelspitzen-Zellen

C. U. Hesemann

Lehrstuhl für Allgemeine Genetik der Universität Hohenheim,
Garbenstr. 30, 7000 Stuttgart 70 (Hohenheim), Bundesrepublik
Deutschland

Eingegangen am 18. März 1980

Bei tierischen Organismen wurden bereits grundlegende Arbeiten zur Methodik der Feulgenfärbung und photometrisch-quantitativen Auswertung gefärbter Präparate veröffentlicht (Böhm 1968, Decosse und Aiello 1966, Kiefer *et al.* 1972, Lohmann 1975, Müller 1966, Vahs 1973). Bei pflanzlichen Objekten hingegen liegen bisher nur sehr wenige den tierischen Befunden vergleichbare Resultate vor (Bennett und Smith 1976, Heller 1973, Hesemann und Bubán 1973, Nagl 1976).

Mit den vorliegenden Befunden werden die 1973 begonnenen Untersuchungen zur Methodik cytochemischer Analysen bei Pflanzen fortgesetzt, um auch bei pflanzlichem Material wie *Vicia faba* zuverlässige Informationen zu sammeln, in welchem Ausmaß methodische Faktoren Bestimmungen des Kern-DNA-Gehalts von Pflanzenzellen beeinflussen. Böhm (1968) konnte bei tierischen Zellen nachweisen, daß eine reproduzierbar optimale Feulgenfärbung der Kerne von Temperatur, Säurekonzentration und Zeitdauer der HCl-Hydrolyse sowie dem verwendeten Fixierungsmittel abhängig ist. Beim pflanzlichen Material wurde in den Vorliegenden Untersuchungen erstens die Wirkung von zwei unterschiedlichen Hydrolysezeiten auf *Vicia faba*-Zellkerne geprüft, die zuvor mit einem für besonders Pflanzen geeigneten Fixiergemisch abgetötet worden waren. Zweitens wurden aus aktuellem Anlaß zwei verschiedene Feulgen-Farbstoffe erprobt. Da von der Firma Chroma (Stuttgart) der für die Feulgenfärbung vielfach verwendete Farbstoff „Pararosanilin (C.I. Nr. 42 500)“ nicht mehr hergestellt wird, wurde an seiner Stelle „Fuchsin basisch·HCl (C.I. Nr. 42 500)“ der Firma Serva (Heidelberg) zu Vergleichsmessungen herangezogen. Die morphologisch-anatomischen Gegebenheiten bei pflanzlichen im Gegensatz zu tierischen Zellen bedingen, daß man zur Eliminierung der Absorption des Untergrundes in der Umgebung des Kerns Schwellenwerte einsetzen muß. Aus diesem Grunde wurde drittens die Bedeutung unterschiedlicher Schwellenwerte analysiert. Bei tierischen Zellen liegen bereits quantitative Daten über das Ausbleichen von Feulgen-gefärbten Präparaten bei längerer Belichtung vor (vgl. z.B. Speiser 1973). Dagegen wurden noch keine quantitativen Befunde über die Wirkung kurzzeitiger Belichtungen veröffentlicht. Deshalb wurden viertens Kern-DNA-Messungen nach kurzen wiederholten Belichtungen des Präparates in die Untersuchungen einbezogen.

Material und Methoden

Die Untersuchungen wurden an Wurzelspitzen von *Vicia faba*, Sorte „Kleine Thüringer“ durchgeführt. Die Keimung der Samen sowie die Fixierung und Feulgen-Färbung des Pflanzenmaterials erfolgte nach den bei Hesemann (in Vorbereitung) gemachten Angaben. Von dieser Methodik wurde nur in den folgenden Punkten abgewichen: Eine Vorbehandlung der Wurzelspitzen mit Colchicin wurde bei keinem Versuchsglied vorgenommen. Bei Versuchsglied I wurde die bei allen übrigen Versuchsgliedern verwandte Hydrolyse-Dauer von 55 auf 70 Minuten ausgedehnt. Bei den Versuchsgliedern I, II, IV, VI–VIII wurde als Feulgen-Farbstoff Pararosanilin (Chroma, Stuttgart) herangezogen, bei allen übrigen Versuchsgliedern wurde Fuchsin basisch (Serva, Heidelberg) verwendet. Die Bestimmungen des Kern-DNA-Gehalts wurden mit einem Universal-Mikro-Spektralphotometer (UMSP I) verbunden mit einem Schnellmeßzusatz der Firma Carl Zeiss, Oberkochen, vorgenommen. Die genauen Gerätedaten können der Veröffentlichung von Hesemann (in Vorbereitung) entnommen werden.

Mit Ausnahme der Versuchsglieder IX und X wurde bei allen Versuchsgliedern ausschließlich ein Schwellenwert von 0,06 verwendet. Bei den Versuchsgliedern IX und X wurden bei den Messungen in ansteigender Reihenfolge folgende Schwellenwerte eingesetzt: 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,10; 0,20; 0,30. Bis auf die Versuchsglieder VII und VIII wurden die Kerne aller übrigen Versuchsglieder nur zweimal während des Meßvorgangs für 2 Wiederholungsmessungen selektiv belichtet. Bei den Versuchsgliedern VII und VIII wurde jeder Kern in 10 facher Wiederholung gemessen.

Ergebnisse und Diskussion

Mit cytophotometrischer Technik wurde der Kern-DNA-Gehalt meristematischer Wurzelspitzen-Zellen von *Vicia faba* bestimmt. Für die Messungen wurden Zellen verwendet, deren Kerne sich im Telophase-Stadium befanden. Der DNA-Gehalt der Telophase-Hälften jedes Kerns wurde getrennt erfaßt. Der bei Hesemann (im Druck) wiedergegebene Befund konnte bestätigt werden: Die Unterschiede zwischen den DNA-Werten der Telophase-Hälften eines Kerns sind sehr gering und nicht signifikant. Aus diesem Grunde wurde in der vorliegenden Arbeit nur der Gesamt-DNA-Wert (4C-Niveau) beider Telophase-Hälften angegeben.

In Tabelle 1 wird eine Übersicht über alle Versuchsglieder bezüglich Farbstoff-Typ, Hydrolysezeit und Färbeserie gegeben. In Tabelle 2 sind die Mittelwerte nebst Streuungen der Versuchsglieder I–VI, in Tabelle 3 die Ergebnisse der Tests auf signifikante Unterschiede zwischen diesen Versuchsgliedern aufgeführt.

Bei Versuchsglied I mit einer besonders langen Hydrolysezeit (70 Minuten) weist der Mittelwert im Vergleich zu Versuchsglied II der gleichen Färbeserie und zu Versuchsgliedern IV und VI einer anderen Färbeserie mit normaler Hydrolysezeit (55 Minuten) einen signifikanten Unterschied auf. Bei diesen Versuchsgliedern handelt es sich um Pararosanilin-gefärbte Präparate.

Der Mittelwert von Versuchsglied I lag im Vergleich zu den Mittelwerten der Versuchsglieder II, IV und VI um 19,15, 12, 11 bzw. 15, 23 % niedriger. Bei einem

Tabelle 1. Übersicht über die Versuchsglieder bezüglich Farbstoff-Typ, Hydrolysezeit und Nummer der Färbeserie (F I=Färbeserie I am 24.4.79, F II=Färbeserie II am 26.4.79 durchgeführt)

Bezeichnung der Versuchsglieder	verwendeter Farbstoff	Hydrolysezeit in Minuten	Nummer der Färbeserie
I	Pararosanilin	70	F I
II	"	55	F I
III	Fuchsin	55	F II
IV	Pararosanilin	55	F II
V	Fuchsin	55	F II
VI	Pararosanilin	55	F II
VII	"	70	F I
VIII	"	55	F II
IX	Fuchsin	55	F II
X	"	55	F II

Tabelle 2. Kern-DNA-Mittelwerte in Arbeitseinheiten (AE) der Versuchsglieder I-VI. Zur Ermittlung der DNA-Einzelwerte wurden beide Telophase-Hälften (4C-Niveau) herangezogen

Bezeichnung der Versuchsglieder	n	$\bar{x}$ in AE	s
I	20	111,32	6,36
II	25	137,69	5,87
III	20	89,98	3,63
IV	30	126,66	5,76
V	11	93,85	4,69
VI	21	131,33	5,20

n: die Anzahl der gemessenen Telophase-Kerne.

s: die Streuung des jeweiligen Mittelwertes $\bar{x}$ bei den sechs Versuchsgliedern.

Tabelle 3. Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den Kern-DNA-Mittelwerten der Versuchsglieder I-VI

Bezeichnung der Versuchsglieder	II	III	IV	VI
I	(19,15)***	—	(12,11)***	(15,23)***
II		(34,65)***	(8,01)***	(4,62)***
III	—		(28,96)***	(31,49)***
IV	—	—		(3,56)***
V	(31,84)***	(4,12)**	(25,91)***	(28,54)***

Es bedeuten: **=signifikant bei 2%; ***=signifikant bei 1%; —=nicht auf Signifikanz geprüft. Die unter der Signifikanzangabe in Klammern aufgeführte Zahl gibt den Prozentsatz an, in dem sich die jeweiligen beiden Mittelwerte voneinander unterscheiden, bezogen jeweils auf den höheren Wert.

Vergleich der Versuchsglieder II, III und VI untereinander ergibt sich, daß sowohl zwischen den Mittelwerten von Präparaten verschiedener Färbeserien als auch von Präparaten der gleichen Färbeserie signifikante Unterschiede bestehen. Die Unterschiede zwischen den Mittelwerten dieser drei Versuchsglieder sind mit Prozentwerten von 3,56, 4,62 bzw. 8,01 % im Gegensatz zu den zuvor angegebenen Prozentsätzen beim Vergleich von Versuchsglied I mit den Versuchsgliedern II, IV und VI geringer. Vergleiche zwischen unter gleichen Behandlungs-Bedingungen hergestellten Pararosanilin- und Fuchsin-Präparaten der gleichen Färbeserie, den

Tabelle 4. Prüfung der Wirkung von kurzer, wiederholter Belichtung auf das Ergebnis von Kern-DNA-Messungen. Jeder Kern der beiden Versuchsglieder VII und VIII wurde in 10 facher Wiederholung gemessen; von den ersten 9 Wiederholungsmessungen wurde der Mittelwert gebildet und mit dem Wert der 10. Wiederholungsmessung verglichen

Bezeichnung der Versuchsglieder	Kern- Nummer	Kern-DNA- Werte in AE Mittelwerte von 9 Messungen eines Kerns		Kern-DNA- Wert in AE der 10. Messung	Prozentuale Abweichung des 10. Wertes vom Mittelwert der übrigen 9 Werte
		$\bar{x}$	s		
VII	1	109,46	0,87	111,12	1,52
	2	105,49	0,80	106,76	1,20
	3	103,16	0,20	103,26	0,10
	4	100,93	0,12	101,24	0,31
	5	101,76	0,17	101,88	0,12
VIII	1	134,83	0,43	134,75	0,08
	2	129,99	0,48	130,86	0,67
	3	131,17	0,83	132,44	0,97
	4	134,91	1,32	138,15	2,40
	5	126,73	1,57	126,32	0,32
	6	129,71	0,98	128,37	1,03
	7	136,69	1,29	138,14	1,06
	8	124,97	1,80	123,52	1,16
	9	131,52	0,45	131,78	0,20
	10	128,71	0,32	127,90	0,63
	11	137,34	0,26	138,22	0,64

Faßt man die Prozentwerte der letzten Spalte zusammen, dann ergeben sich folgende Mittelwerte: für Versuchsglied VII, $\bar{x}=0,65 \pm 0,66$ und für Versuchsglied VIII, $\bar{x}=0,83 \pm 0,63$.

Versuchsgliedern III und IV bzw. V und VI machen deutlich, daß zwischen den Mittelwerten der mit verschiedenen Farbstoffen gefärbten Präparate große, signifikante Unterschiede bestehen. Die Mittelwerte weichen zu 28,96 bzw. 28,54 % voneinander ab. Außerdem wurden die Mittelwerte der Fuchsin-gefärbten Präparate, der Versuchsglieder III und V, miteinander verglichen. Es ergab sich auch hier ein signifikanter Unterschied, der allerdings mit nur 4,12 % gering ausfiel.

Des weiteren wurde geprüft, ob wiederholte, kurze Belichtungen eines Kerns zu Veränderungen im Meßergebnis führen können. Zu diesem Zweck wurde jeder Kern in 10 facher Wiederholung gemessen. Der von jedem Kern zuletzt gemessene

10. Wert wurde in Beziehung zu den übrigen neun Meßwerten gesetzt. Vor den neun Meßwerten wurde ein Mittelwert gebildet und dieser mit dem 10. Wert verglichen. Wie man Tabelle 4 entnehmen kann, war die Abweichung dieses 10. Werts vom Mittelwert der übrigen neun Werte sehr gering und betrug von einer Ausnahme abgesehen um 1 %. Auf Grund dieses Befundes kann man schließen, daß auch nach 10 facher Messung eines Kerns der DNA-Wert unverändert erhalten bleibt.

Aufbauend auf diesem Befund über den Einfluß kurzer, wiederholter Belichtung auf das Meßergebnis wurden Kern-DNA-Bestimmungen mit variablen Schwellenwerten vorgenommen. Zuvor wurden Vorversuche durchgeführt, um die Absorption in der Umgebung der Kerne zu ermitteln. Aus diesen Vorversuchen ergab sich 0,06 als geeigneter Schwellenwert zur Eliminierung des Präparat-Untergrundes. Für die Kern-DNA-Messungen wurde folgende Schwellenwert-Reihe verwendet: 0,00; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,10; 0,20; und 0,30. Es wurde festgestellt (Tabelle 5), daß bis zu einem Schwellenwert von 0,10 der Kern-DNA-Wert unverändert erhalten bleibt. Erst bei Schwellenwerten von 0,20 und 0,30 kann man beobachten, daß der Kern-DNA-Wert geringer ausfällt und sich vom höheren Kern-DNA-Wert bei niedrigerem Schwellenwert deutlich unterscheidet.

In jüngster Zeit hat die Bestimmung des DNA-Gehalts von Feulgengefärbten Kernen pflanzlicher Zellen große Bedeutung zur Lösung recht verschiedenartiger Fragestellungen erlangt: Verlauf der Evolution bei höheren Pflanzen (Bennett 1972, Bennett und Smith 1976, Price, Sparrow und Nauman 1973, Price 1976, Rees 1972, Sparrow und Nauman 1973) sowie Vorgänge von Endopolyploidisierung, vom Entstehen gewebespezifischer DNA-Gehalte und von differentieller DNA-Replikation (Frisch und Nagl 1979). Erstaunlicherweise wurden bei den meisten veröffentlichten Befunden über Messungen des Kern-DNA-Gehalts pflanzlicher Zellen den methodischen Faktoren nur wenig Gewicht beigemessen.

Durch die vorliegenden Ergebnisse und die Resultate einer in Vorbereitung befindlichen Veröffentlichung (Hesemann, in Vorbereitung) wird ein reichhaltiges Anschauungsmaterial geliefert, welchen hohen Stellenwert methodische Faktoren bei der Beurteilung cytophotometrischer Kern-DNA-Meßdaten pflanzlicher Zellen besitzen. Aus den eigenen Befunden ergibt sich, daß außer kurzer wiederholter Belichtung alle bisher geprüften Faktoren bei Kern-DNA-Messungen beachtet werden müssen: a) Vorbehandlung mit Colchicin; b) Kondensationsgrad der Kerne in Abhängigkeit vom Mitose-Stadium; c) Bedingungen der Hydrolyse; d) Typ des Feulgen-Farbstoffs; e) Schwellenwert zur Eliminierung des Untergrundes und f) Umfang der Variabilität zwischen Präparaten derselben und verschiedenen Färbeserien. Es wird deshalb empfohlen, in zukünftigen Untersuchungen, bei denen quantitative Kern-DNA-Bestimmungen pflanzlicher Zellen erforderlich sind, bei der Erfassung und Auswertung von Kern-DNA-Werten den speziellen methodischen Gegebenheiten mehr Beachtung zu schenken, um zu zuverlässigen und mit dem Befunden anderer Autoren vergleichbaren Meßergebnissen zu gelangen.

Mein Dank gilt Herrn Dr. E. v. Kittlitz, Landessaatzuchtanstalt, Universität Hohenheim für die Bereitstellung des Samenmaterials sowie Fräulein M. Dankov für zuverlässige technische Assistenz.

Methodical studies of cytochemical analyses in higher plants. IV. Influence of methodical factors on cytophotometric nuclear DNA measurements of *Vicia Faba* root tip cells.

Summary

The DNA content of nuclei of *Vicia faba* root tip cells was determined by scanning microspectrophotometry. For measuring the nuclei were Feulgen stained using different methodical conditions. If we extend the normally applied hydrolysis time from 55 minutes to 70 minutes, then the DNA mean value was drastically reduced.

Under the same methodical conditions we used for staining Pararosanilin (Chroma, Stuttgart) and Fuchsin (Serva, Heidelberg). The DNA mean value was reduced by 30% in Fuchsin stained preparations.

Comparing Pararosanilin preparations of the same and different staining series between each other and Fuchsin preparations of the same staining series between each other, the DNA mean values were significantly different. Testing the influence of briefly repeated exposure time, the nuclei were measured by tenfold repetition. There were no differences between the ten measurements of a single nucleus. We used threshold values for eliminating the underground absorption. Using a series of different threshold values we investigated the influence of threshold values on the result of the measurements. The DNA values of a nucleus were only influenced by threshold values higher than 0,10.

The frequent deficient consideration of methodical factors in cytophotometrical DNA measurements of plant cell nuclei is discussed.

Zusammenfassung

Mit Hilfe der Scanning-Photometrie wurde der DNA-Gehalt Feulgen-gefärbter Kerne von *Vicia faba*-Wurzelspitzen-Zellen unter verschiedenen methodischen Bedingungen bestimmt.

Wurde die Hydrolysezeit von normalerweise angewandten 55 auf 70 Minuten ausgedehnt, dann wurde bei der längeren Hydrolysezeit ein hoch signifikant erniedrigter DNA-Mittelwert gefunden. Unter sonst gleichen methodischen Bedingungen wurden als Feulgen-Farbstoffe Pararosanilin (Chroma) und Fuchsin basisch (Serva) verwandt. Nach Anfärbung mit Fuchsin wurden DNA-Mittelwerte gefunden, die bei allen Versuchsgliedern um durchschnittlich 30% niedriger lagen als nach Pararosanilin-Färbung.

Bei einem Vergleich Pararosanilin-gefärbter Präparate untereinander der gleichen und verschiedener Färbeserien sowie Fuchsin-gefärbte untereinander der gleichen Färbeserie ergab sich, daß zwischen allen DNA-Mittelwerten signifikante Unterschiede von 3,6 bis 8,0% bestehen.

Um den Einfluß kurzer wiederholter Belichtung auf das Meßergebnis zu prüfen, wurden Kerne mit 10 facher Wiederholung gemessen. Es konnten keine nennenswerten Unterschiede zwischen den 10 Meßwerten eines Kerns festgestellt werden.

Kern-DNA-Messungen bei unterschiedlichen Schwellenwerten erbrachten

folgendes Resultat: Bei Schwellenwerten bis 0,10 bestanden zwischen den DNA-Werten der Kerne nur geringfügige Abweichungen von durchschnittlich 1%. Bei Schwellenwerten von 0,20 und 0,30 wurden im Vergleich zu den DNA-Werten der Kerne der nächst niedrigeren Schwellenwert-Stufe drastische Unterschiede bis zu 8,7% festgestellt.

Im Diskussionsteil wird die bei cytophotometrischen Kern-DNA-Bestimmungen von pflanzlichen Zellen vielfach mangelhafte Berücksichtigung methodischer Faktoren erörtert.

Literatur

- Bennett, M. D. 1972. Nuclear DNA content and minimum generation time in herbaceous plants. *Proc. R. Soc. Lond. B* **181**: 109–135.
- und Smith, J. B. 1976. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **274**: 227–274.
- Böhm, N. 1968. Einfluß der Fixierung und Säurekonzentration auf die Feulgen-Hydrolyse bei 28°C. *Histochemie* **14**: 201–211.
- Decosse, J. J. und Aiello, N. 1966. Feulgen hydrolysis: Effect of acid and temperature. *J. Histochem. Cytochem.* **14**: 601–604.
- Frisch, B. und Nagl, W. 1979. Patterns of endopolyploidy and 2C nuclear DNA content (Feulgen) in *Scilla* (Liliaceae) Pl. Syst. Evol. **131**: 261–276.
- Heller, F. O. 1973. DNS-Bestimmung an Keimwurzeln von *Vicia faba* L. mit Hilfe der Impuls-cytophotometrie. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* **86**: 437–441.
- Hesemann, C. U. und Bubán, T. 1973. Methodik cytochemischer Analysen bei pflanzlichen Objekten I. Cytophotometrische Bestimmungen des Kern-DNS-Gehalts von Apfelknospen-Schnittpräparaten bei unterschiedlichen Fixierungs- und Hydrolysebedingungen. *Histochemie* **36**: 237–246.
- 1890. Methodik cytochemischer Analysen bei pflanzlichen Objekten III. Quantitative Bestimmungen des Kern-DNA-Gehalts verschiedener Mitose-Stadien von *Vicia faba*-Wurzelspitzen-Zellen. *Biol. Zentralblatt*, in Vorbereitung.
- Kiefer, R., Kiefer, G. und Sandritter, W. 1972. Feulgenhydrolysekinetik in Eu- und Heterochromatin. *Histochemie* **30**: 150–155.
- Lohmann, K. 1975. Hydrolysis behaviour of chromatin of nuclei from early embryonic tissues of *Triturus*-Studies on proportionality of Feulgen values and DNA content. *W. Roux's Arch. Devel. Biol.* **177**: 285–299.
- Müller, D. 1966. Erfahrungen mit der Feulgenfärbung für quantitative cytochemische DNS-Untersuchungen. *Histochemie* **7**: 96–102.
- Nagl, W. 1976. Zellkern und Zellzyklen. Verlag Eugen Ulmer Stuttgart.
- Price, H. J., Sparrow, A. H. und Nauman, A. F. 1973. Evolutionary and developmental considerations of the variability of nuclear parameters in higher plants I. Genome volume, interphase chromosome volume, and estimated DNA content of 236 gymnosperms. *Brookhaven Symp. Biol.* **25**: 390–421.
- 1976. Evolution of DNA content in higher plants. *Bot. Rev.* **42**: 27–52. Price, H. J. 1976.
- Rees, H. 1972. DNA in higher plants. *Brookhaven Symp. Biol.* **23**: 394–418.
- Sparrow, A. H. und Nauman, A. F. 1973. Evolutionary changes in genome and chromosome sizes and in DNA content in the grasses. *Brookhaven Symp. Biol.* **25**: 367–389.
- Speiser, C. 1973. Quantitative DNS-Bestimmungen im Verlauf der Ontogenese von *Acricotopus lucidus* (Chironomide). Dissertation Univ. Hohenheim.
- Vahs, W. 1973. Die Bedeutung der Hydrolyse-Art in der Feulgen-Cytophotometrie von Kernen mit unterschiedlichen Ploidiegraden. *Histochemie* **33**: 341–348.