

Ergänzendes Online-Material

Informationen zur Floristischen Kartierung in Thüringen 43 (2024): S. 9–18

A. GERTH

***Alyssum gmelinii* JORD. & FOURR. (Brassicaceae) in Thüringen und Sachsen-Anhalt – Verbreitung, Ploidie und Populationsgrößen**

Präparation der Metaphasen-Chromosomen

Die Präparation der Metaphasen-Chromosomen folgte dem Protokoll von TSUCHIYA & NAKAMURA (1979) mit einigen Modifikationen. Die Wurzelspitzen wurden mit einer 2 mM wässrigen 8-Hydroxychinolin-Lösung für 1 bis 2,5 h bei Raumtemperatur vorbehandelt, um die Zellteilung in der Metaphase zu stoppen. Nach zweimaligem Waschen in entionisiertem Wasser wurden die Wurzelspitzen in einem Ethanol-Eisessig-Gemisch (3:1) für eine Stunde bis zu mehreren Tagen fixiert und anschließend in 1 M HCl bei 60 °C für 15 min hydrolysiert. Die Wurzelspitzen wurden nach erneutem Waschen einige Minuten mit ein bis zwei Tropfen Karminessigsäure (1,5 % Karmin in 45 %iger Essigsäure) auf einem Objektträger gefärbt und anschließend zwischen Objektträger und Deckglas gequetscht. Mindestens drei Zellen eines Individuums wurden gezählt. Die Chromosomen wurden bei 1000-facher Vergrößerung an einem Scope.A1 gezählt und Bilder wurden mit einer AxioCam ICc 3 aufgenommen (beide CARL ZEISS AG, Oberkochen, Deutschland).

Probenvorbereitung und Durchflusszytometrie

Die Probenaufbereitung folgte mit geringen Modifikationen dem Protokoll von DOLEŽEL et al. (2007). Ca. 20 mg frisches oder Silicagel-getrocknetes Blattmaterial wurde mit der gleichen Menge des Standards (*Solanum lycopersicum* L. cv. 'Stupické polní rané', 2C = 1.96 pg, Doležel et al. 1992, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Jaroslav Doležel) in einer Petrischale mit einer Rasierklinge in 1300 µl modifiziertem LB02-Isolationspuffer gehackt (LB02 nach DOLEŽEL et al. 1989, modifiziert: 15 mM Tris (Hydroxymethyl) Aminomethane, 2 mM Na₂EDTA, 80 mM KCl, 20 mM NaCl, 10 mM Ascorbinsäure, 2 % (v/v) Triton X-100; pH 7,5). Die Suspension wurde über einen Filter mit 30 µm Maschenweite (CellTrics®; Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland) gegeben und in einem 2 ml-Reaktionsgefäß mit Propidiumjodid-Stammlösung (1 mg/ml) zu einer Endkonzentration von 70 µg/ml sowie mit RNase Stammlösung (3 mg/ml) zu einer Endkonzentration von 10 µg/ml gefärbt. Die Messungen der Fluoreszenzintensität wurden mit einem CyFlow Ploidy Analyser (Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland) mit einem 532 nm Laser durchgeführt, wobei mindesten 3000 Partikel pro Probe gemessen wurden. Die Auswertung, d. h. der Vergleich der Mittelwerte der Fluoreszenzintensität von Probe und Standard, erfolgte mit dem R-Package „flowPloidy“ (SMITH et al. 2018). Nur Histogramme mit

Variationskoeffizienten von weniger als 5 % wurden berücksichtigt (in Ausnahmefällen wurden >10 % akzeptiert, wenn die Peaks dennoch deutlich waren und die Wiederholung der Probe keine Verbesserung brachte). Der relative DNA-Gehalt wurde berechnet als Verhältnis der Fluoreszenzintensität der Probe zur Fluoreszenzintensität des Standards. Proben mit ähnlichem Verhältnis haben gleiche Ploidie. Das Verhältnis der relativen DNA-Gehalte entspricht dem Faktor der Ploidie (relativer DNA-Gehalte Diploide * 2 = relativen DNA-Gehalte Tetraploide).

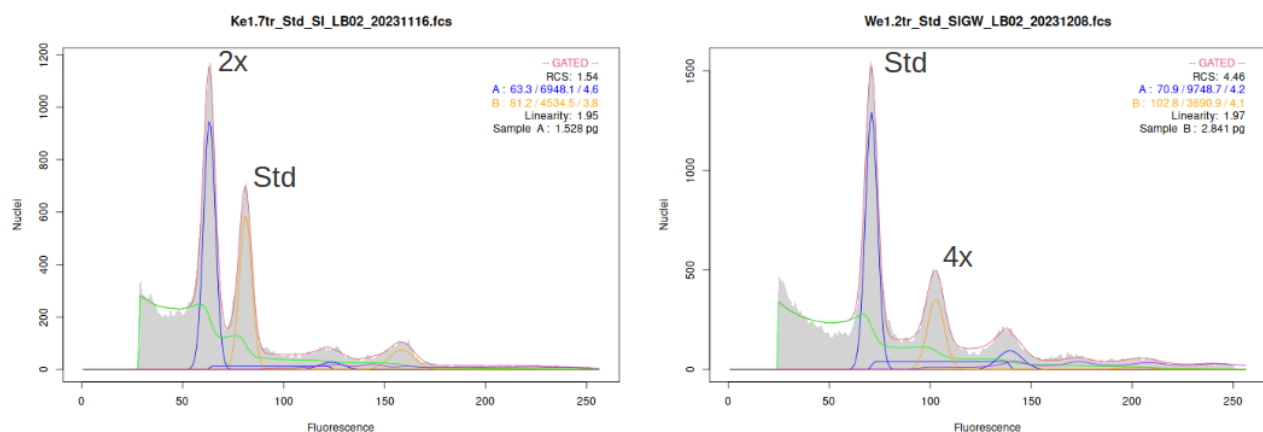


Abb.: Histogramme der Durchflusszytometrie: Messung an einer diploiden Pflanze (links, Ke1) und einer tetraploiden Pflanze (rechts, We1), der interne Standard *Solanum lycopersicum* (Std) im Vergleich zum Peak der Probe (2x bzw. 4x). Vom Verhältnis des Probenpeaks zum Standard kann auf die relative Genomgröße geschlossen werden. Die relativen Genomgrößen stehen zueinander im gleichen Verhältnis wie die Ploidien der Proben.

Literatur

- DOLEŽEL, J., BINAROVÁ, P. & LUCRETTI, S. (1989): Analysis of Nuclear DNA content in plant cells by Flow cytometry. – *Biologia Plantarum* **31**(2): 113–120. <https://doi.org/10.1007/BF02907241>
- DOLEŽEL, J., GREILHUBER, J. & SUDA, J. (2007): Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. – *Nature Protocols* **2**(9): 2233–2244. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.310>
- DOLEŽEL, J., SGORBATI, S. & LUCRETTI, S. (1992): Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. – *Physiologia Plantarum* **85**(4): 625–631. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1992.tb04764.x>
- SMITH, T. W., KRON, P. & MARTIN, S. L. (2018): flowPloidy: An R package for genome size and ploidy assessment of flow cytometry data. – *Applications in Plant Sciences* **6**(7): e01164. <https://doi.org/10.1002/aps3.1164>
- TSUCHIYA, T. & NAKAMURA, C. (1979): Acetocarmine squash method for observing sugar beet chromosomes. – *Euphytica* **28**(2): 249–256. <https://doi.org/10.1007/BF00056582>