

Durchflusszytometrie

Anwendung in der Pflanzen-Reproduktionsbiologie

Dr. Diego H. Hojsgaard*),
Dr. Elmar Herbig**)

Das Verständnis über die Biodiversität in der Natur und welche Auswirkungen der menschliche Eingriff darauf hat, spielt heute eine Hauptrolle in der Erhaltung der Lebensräume. Bei der Analyse der Biodiversität ist es wesentlich, die Dynamik und die geographische Verteilung der genetischen Variabilität in natürlichen Populationen zu verstehen.

Blütenpflanzen (Angiospermen) zeigen unterschiedliche Formen der Vererbung und Muster der genetischen Information zwischen Individuen. Hauptursachen genetischer Variationen sind die unterschiedlichen Reproduktionsstrategien der Pflanzen, von zwangsläufig erfolgter Kreuzbestäubung bis zu asexueller Reproduktion mittels Samen (Apomixis) über verschiedene Zwischenzustände (Syndrome) (siehe z.B. [1]). Anders als sich rein sexuell fortpflanzende Arten, können fakultativ apomiktische Arten durch die Bildung von unreduzierten, weiblichen Gametophyten sowohl sexuell als auch asexuell Samen erzeugen [2].

Bis vor einigen Jahrzehnten war der Gebrauch zeitaufwendiger Mikro-Sektionsverfahren der einzige Weg, diese Reproduktionsprozesse in Pflanzen zu untersuchen. Basierend auf diesen Er-

kenntnissen wurden die meisten der heute existierenden unterschiedlichen Reproduktionsmodelle abgeleitet [vergleiche dazu 3, 4].

Moderne spezielle Technologien und Methoden wie z.B. die Durchflusszytometrie erlauben es, leichter und schneller die Haupt-Reproduktionswege der Pflanzen (sexuell versus asexuelle Reproduktion siehe Bild 1) zu enträtseln. Obwohl das erste Patent für einen Prototypen bereits 1953 vergeben wurde, ist das erste auf Fluoreszenz beruhende Durchflusszytometer 1968 von Wolfgang Göhde an der Universität Münster entwickelt und 1968-69 erstmalig von der Firma Partec über die Phywe AG, Göttingen, weltweit vermarktet worden [5, 6].

Die Durchflusszytometrie wurde anfänglich für medizinische Anwendungen entwickelt, ist aber später auch für an-

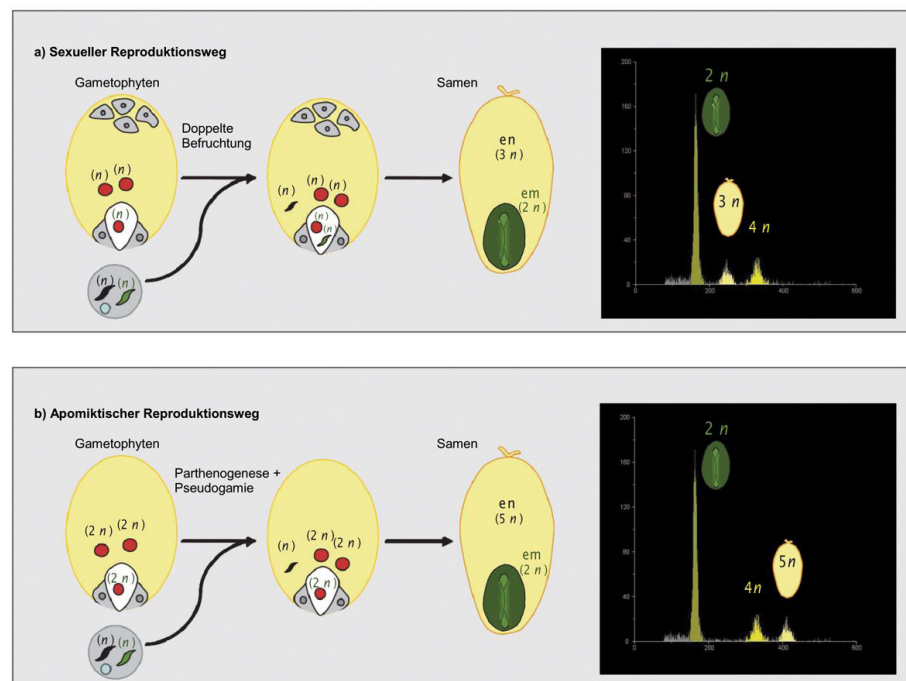


Bild 1. Schematische Darstellung der Reproduktionswege in fakultativ apomiktischen Arten.

Die Embryosack-Struktur und die Ploidie der Zellen bestimmen das relative Verhältnis zwischen Embryo : Endosperm-DNA-Gehalt. Im sexuellen Weg (a) führt die Befruchtung zur Bildung von einem 2n (2C) Embryo und einem 3n (3C) Endosperm, deren Zellen durch die relative Position der Peaks in den Durchflusszytometrie-Histogrammen unterschieden werden können. Im asexuellen (apomiktischen) Weg (b), kommt es nur in der Zentralzelle des nicht reduzierten Embryosacks zur Befruchtung und ein 2n (2C) parthenogenetischer Embryo und ein 5n (5C) pseudogametisches Endosperm wird gebildet, was sich in unterschiedlichen Histogramm-Peaks zeigt. em: Embryo; en: Endosperm (Schema aus [9, unterstützende Informationen]).

*) Albrecht-von-Haller-Institut für Pflanzenwissenschaften, Abteilung für Systematische Botanik, Georg-August-Universität Göttingen.
E-Mail: diego.hojsgaard@biologie.uni-goettingen.de.

***) Sartorius AG, Göttingen.
E-Mail: info@sartorius.com

dere Aufgaben wie z.B. Ermittlung der Zellzahl, Zell-Sortierung, Biomarker-Erkennung, usw. interessant geworden [6]. Obwohl die erste Arbeit über Pflanzen-Zellkernanalyse mittels Durchflusszytometrie 1973 publiziert wurde [7], kam der Durchbruch für die Pflanzen-DNA-Analyse mittels Durchflusszytometrie erst während der 80er Jahre, als die Wissenschaftler damit begannen, diese Technologie häufiger an Pflanzen anzuwenden.

Im Wesentlichen benutzen Botaniker die Durchflusszytometrie, um den DNA-Gehalt in pflanzlichen Zellkernen zu messen. Für eine detaillierte Beschreibung der Prinzipien und Anwendungen der Durchflusszytometrie für die Zellanalyse bei Pflanzen vergleiche auch [8]. Bild 2a zeigt im Überblick, wie das Durchflusszytometer angefärbte oder andere ausgesuchte und markierte Partikel (Größe zwischen 0,2 und 150 µm) detektiert, indem es sie über einen hydrodynamischen

Flüssigkeitsstrom durch ein elektronisches Erkennungssystem führt.

In der Pflanzenforschung werden Zellkerne (Partikel) mit Fluoreszenzmarkern wie DAPI oder Propidiumjodid für die Durchflusszytometrie angefärbt. Anschließend wird jeder einzelne Zellkern einem Lichtstrahl ausgesetzt (gewöhnlich Laser oder UV-Licht) wobei der auf den Zellkern treffende Lichtstrahl gestreut wird und diese Streuungen durch Detektoren wahrgenommen werden. Die Intensität der Fluoreszenz wird von den Detektoren analysiert und somit werden die gewünschten Informationen über den DNA-Gehalt des Zellkerns erhalten. Die gesammelten Daten von Tausenden von intakten Zellkernen erbringen letztlich die Informationen über das entsprechende Gewebe (siehe Peaks in Bild 1). Da die physikalischen und/oder chemischen Charakteristiken von bis zu Hunderten von Partikeln gleichzeitig pro Sekunde analysiert werden, ist die Qualität und Reinheit der Lösungen für die Probenvorbereitung und die Probenuntersuchung ausschlaggebend.

Wann auch immer Wasser von geringer oder ungeeigneter Qualität für das System genutzt wird, führt die Anwesenheit von Kontaminationen (Partikeln) im Wasser, die nicht zur Probe gehören, zu zusätzlicher Fluoreszenz und erzeugt Hintergrundrauschen/Störungen, die nicht der Probe zugeschrieben werden können und damit das Ergebnis verfälschen. Daher ist qualitativ hochwertiges Reinstwasser unbedingt erforderlich, damit derartige Verfälschungen ausgeschlossen werden können.

Das Unternehmen Sartorius aus Göttingen bietet eine ganze Reihe von Reinstwassergeräten an, die ASTM Klasse-I-Wasser (ArUP_{H2O}) produzieren. In diesem Artikel werden die Effekte von Reinstwasser auf die Qualität der Testergebnisse, die bei der Durchflusszytometrie gewonnen werden, untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Reproduktionswege zur Samenerzeugung bei fakultativ apomiktischen Angiospermen unter Verwendung von arium pro VF Reinstwasser (ArUP_{H2O}) getestet und die erzielten Ergebnisse in den durchflusszytometrischen Probeläufen mit den Resultaten der Standardmethode verglichen (Sheat-Fluid-Lösung, angesetzt mit 0,04 % Natrium-Azid und 0,01 % Detergenz).

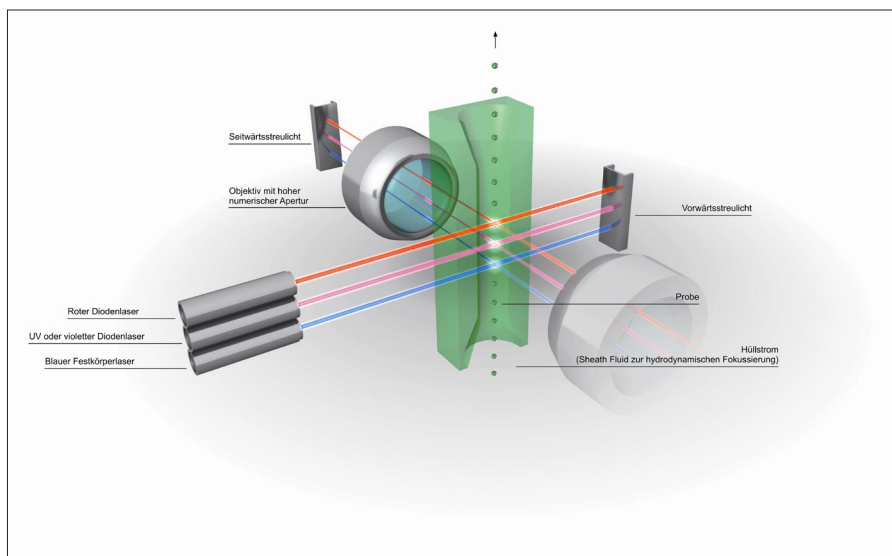


Bild 2a: Schematische Übersicht eines typischen Durchflusszytometers (mit freundlicher Genehmigung von M. Steinberg, Partec GmbH, Münster).

Informationen von jedem einzelnen Pflanzenzellkern werden von unterschiedlichen Detektoren gesammelt, wobei einer dem vorwärts gerichteten Lichtstrahl (Vorwärtsstreuung) und mehrere andere dem Lichtstrahl rechtwinklig zum zu messenden Partikel (Seitwärtsstreuung) zugeordnet sind.

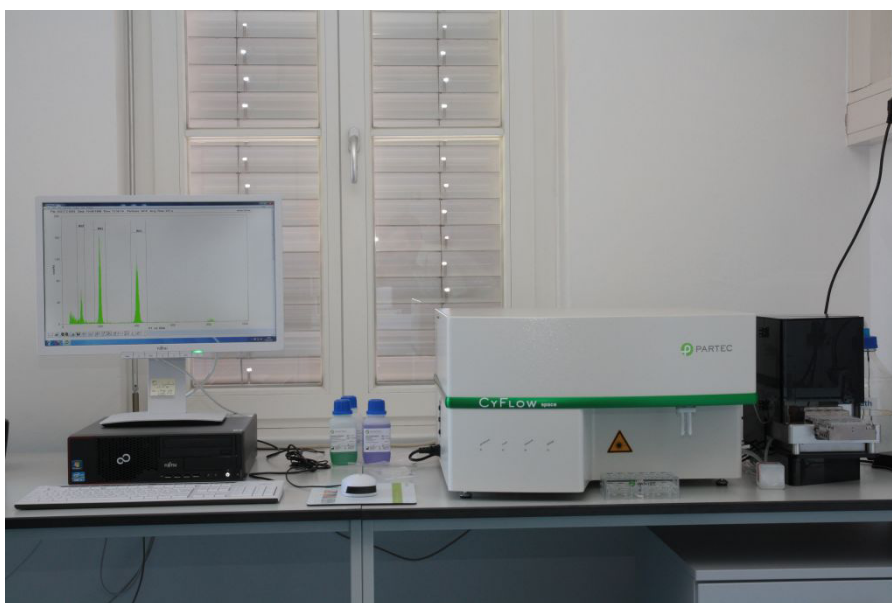


Bild 2b: CyFlow Durchflusszytometer (Partec) in der Abteilung für Systematische Botanik, Albrecht-von-Haller-Institut für Pflanzenwissenschaften, Georg-August-Universität, Göttingen.

Das arium pro VF Reinstwasser-System

Das arium pro VF System wurde zur Herstellung von Reinstwasser aus vorbehand-

deltem Trinkwasser konzipiert und entfernt aus diesem noch vorhandene Verunreinigungen. Die Reinstwasserproduktion erfordert eine kontinuierliche Rezirkulation des Reinstwassers im System sowie einen konstanten Wasserfluss, was durch ein Pumpensystem mit einer Druckregelung erreicht wird. Die Leitfähigkeit des Wassers wird sowohl am Speisewasser-Einlass als auch im Produktwasser (am Wasser-Auslass) gemessen.

Das bei den hier dargestellten Untersuchungen verwendete System arium pro VF (Vorgängergerät mit den gleichen technischen Spezifikationen wie das in Bild 3 gezeigte, redesignede System) arbeitet mit zwei unterschiedlichen Kartuschen. Diese sind mit einem speziellen Aktivkohle-Adsorber und Mischbett-Ionenaustauscherharzen gefüllt, um hochreines Wasser mit einem geringen TOC-Gehalt zu liefern. Weiterhin ist eine UV-Lampe integriert, die bei den Wellenlängen 185 nm und 254 nm oxidierend und keimtötend wirkt.

Beim arium pro VF System ist außerdem ein Ultrafilter-Modul eingebaut, welches als Crossflow-Filter betrieben wird. Die verwendete Ultrafiltrationsmembran hält Kolloide, Mikroorganismen, Endotoxine sowie RNA und DNA zurück.

Ein 0,2-µm-Endfilter ist am Wasser-auslass installiert und dient der Entfernung von Partikeln und Bakterien aus dem erzeugten Reinstwasser während der Dosierung. Der Prozess der gerätespezifischen Wasseraufbereitung ist in Bild 4 (Flussdiagramm arium pro VF) dargestellt.

Material und Methoden

Samen von hexaploiden *Ranunculus carpaticola* Pflanzen wurden nach offener Bestäubung gesammelt. Einzelne Samen wurden in einer Plastik-Petrischale zusammen mit 300 µl Extraktionspuffer (CyStain UV Precise P, Partec) zerkleinert, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und die gewonnenen Zellkerne in ein 5-ml-Plastikröhrchen filtriert (50 µm mash (Netz), CellTric®). Dann wurden 1,2 ml Anfärbepuffer (kit CyStain UV Precise P, Partec) dazugegeben und nach 60 s die Proben in einem Durchflussszytometer (CyFlow Space, Partec GmbH, Münster, siehe Bild 2b) im blauen Fluoreszenzkanal analysiert.

Die Einstellungsparameter wurden anhand bekannter diploider (2x) oder tetraploider (4x) *Ranunculus sp.* Geno-

typen angepasst. Die relative Fluoreszenz von wenigstens 2000 individuellen Zellkernen wurde quantifiziert und in einem Histogramm dargestellt.

Die relativen Positionen der Peaks wurden zur Bestimmung der Ploidiegrade von Embryo- und Endosperm-Gewebe herangezogen. Die Reproduktionswege nach der Samenbildung wurden in Anlehnung an [10] rekonstruiert.

Als Flussmittel für die Proben wurden zwei unterschiedliche Flüssigkeiten benutzt:

- A: Sheath Fluid (Hüllflüssigkeit) für die Durchflussszytometrie (Partec) sowie
- B: Reinstwasser vom arium pro VF Reinstwassersystem.

Die statistische Analyse zur vergleichenden Bewertung der Versuche wurden mit Hilfe der Excel-Software (2007, Microsoft Office System) durchgeführt.

Ergebnisse

Die Reproduktionswege von insgesamt 61 einzelnen Samen wurden rekonstruiert. 30 Samen wurden in den Probeläufen mit Sheath Fluid und 31 Samen mit Reinstwasser ArUP_{H2O} (Leitfähigkeit: 0,055 µS/cm oder 18,2 MΩ x cm Wider-

stand, kompensiert auf 25 °C) nach der empfohlenen Standardmethode untersucht.

Von den pro Probe gezählten Partikeln konnten durchschnittlich 73 % dem Embryo- und Endosperm-Peak zugeordnet werden (das entsprach im Mittel 2329 Zellkernen). Die restlichen 27 % der Counts waren Zellkerne in der G₂-Phase oder Hintergrundsignal.

Mittlere Positionen für Embryo- und Endosperm-Peaks wurden für alle analysierten Samen basierend auf der Gesamtanzahl der Zellkerne pro Peak berechnet. Die relativen Positionen der Zellkerne auf der x-Achse im Histogramm-Plot basiert auf deren relativer Ploidie gemäß der Gewebeherkunft (siehe Bild 1). Demzufolge würde ein tetraploider Zellkern (4n) ungefähr zweimal so viel DNA aufweisen wie ein diploider (2n) Zellkern und somit ein zweifach intensiveres Fluoreszenzsignal ergeben und daher einen zweimal so weiten relativen Abstand auf der x-Achse (siehe Bild 5) einnehmen.

Die Reproduktionsherkunft jedes Samens und das Verhältnis von Sexualität und Apomixis wurde nach der Index-

Tabelle 1: Reproduktions-Klassifikation von *R. carpaticola* Samen nach Embryo : Endosperm-Peak-Verhältnis.

Behandlung	Index Peak (Range)	Samen- Typ	%
A	2,67-3,67	Apo	63,3
	1,44-1,96	Sex	36,7
B	2,47-3,85	Apo	71,0
	1,42-2,06	Sex	29,0

Apo: Apomiktisch entstandene Samen; Sex: Sexuell entstandene Samen.

Tabelle 2: Statistische Analyse der durchflussszytometrischen Histogramme von 61 *R. carpaticola* Samen.

Samen Typ	Behandlung	Gewebe	Mittel	St.-Abw.	Skewness	CV% Range	r (p < 0,05)
Apo	A	Em	112,75	24,00	2,07	3,74-8,13	0,82
		En	339,16	46,08	0,77	2,8-10,02	
Sex	B	Em	110,00	18,78	1,58	3,74-10,34	0,76
		En	345,78	58,93	-0,07	3,32-11,92	
Sex	A	Em	190,04	43,00	-0,61	4,04-7,48	0,85
		En	297,64	69,07	0,72	3,93-8,22	
Sex	B	Em	170,78	46,97	0,07	3,91-9,69	0,86
		En	299,46	86,94	0,41	4,13-9,23	

Apo: Apomiktisch entstandene Samen; Sex: Sexuell entstandene Samen; Em: Embryo; En: Endosperm; Mittel: Mittlerer Peak-Wert; St.-Abw.: Standard-Abweichung; r: Pearson's Produkt-Moment-Korrelationskoeffizient.



Bild 3: Reinstwassersystem arium® pro VF (Foto: Sartorius).

Peak-Bestimmung aufgestellt (Tab. 1). Unterschiedliche statistische Parameter wurden für jeden Versuch und Reproduktionsweg herangezogen, um die Behandlungen zu vergleichen (Tab. 2)

Absolute Werte für den Variationskoeffizienten (CV) wurden für die einzelnen Proben erhalten. Die Bereiche pro Versuch und Reproduktionsweg, ebenso wie die Skewness-Werte für jeden Embryo- und Endosperm-Gewebe-Peak aller apomiktischen und sexuellen Proben werden in Tab. 2 dargestellt. Die Pearson-Produkt-Moment-Korrelation wurde unter allen gemessenen Mittelwerten der Embryo- und Endosperm-Peaks pro Probe und Behandlung mit den unterschiedlichen Flüssigkeiten berechnet (Tab. 2).

Diskussion

Die hexaploiden Cytotypen von *Ranunculus carpaticola* sind fakultativ apomiktische Pflanzen, die eine Vielfalt an reproduktiven Strategien besitzen, um neue Individuen in natürlichen Populationen zu entwickeln (e.g. [11]). Das durchflusszytometrische Samen-Screening des

Saatguts ist eine nützliche, komfortabel bedienbare, zeitsparende Technik zur Überprüfung der Reproduktionsstrategien in Samenpflanzen.

Die zwei hier benutzten Behandlungen (Sheath Fluid versus Reinstwasser ArUP_{H₂O}) zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Peak-Qualität, Peak-Position oder des Index-Peak-Bereiches (Range).

Der Variationskoeffizient ist eine normalisierte Berechnungsmethode, die dazu benutzt wird, quantitative Aussagen darüber zu machen, wie zerstreut oder gebündelt die gemessenen Ereignisse im Vergleich zur Standard-Wahrscheinlichkeits-Verteilung oder Häufigkeitsverteilung sind (angenommenes statistisches Modell). Die absoluten Werte des Variationskoeffizienten (CV) (oder Relative Standardabweichung, RSD) in Prozent angegeben.

In unserem Falle, obwohl der maximale Variationskoeffizient (CV %) etwas höher bei Verwendung von Reinstwasser war, ist der Unterschied zur Behandlung mit Sheath-Flüssigkeit jedesmal kleiner als der

minimale Variationskoeffizient gewesen. Dies deutet auf ein ähnliches Streuungsniveau der Werte bei den Behandlungen hin.

Obwohl die glockenförmigen Peaks mehr dazu tendieren, längere rechte Ausläufer zu haben, (positive Skewness), sind die Werte nahe Null, was anzeigt, dass der Peak eine nahezu symmetrische Form um den Mittelwert besitzt.

Darüber hinaus zeigen die hohen Übereinstimmungen sowohl bei den Embryo- als auch bei den Endosperm-Peaks an, dass die Verwendung von Reinstwasser keine Auswirkung auf die gemessene mittlere relative Fluoreszenzintensität bei Auswertung der Zellkern-Populationen hat. Verzerrte Korrelation sind nicht vorhanden und die Streuung der Werte bewegt sich im Bereich der erwarteten Embryo- zu Endosperm-Peak-Verhältnisse.

Auf der anderen Seite sind die Anteile sexueller und asexueller Samen in Variante A und B ähnlich, wie es zu erwarten ist, wenn zufällig ausgewählte Proben verwendet werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Bestimmung der Reproduktionsherkunft nicht durch unproportionale Verschiebungen der Peak-Positionen im Vergleich beider Messvarianten beeinflusst wird.

Insgesamt zeigen die vergleichsweise wenigen Diskrepanzen in den erzielten Ergebnissen, dass das arium-Reinstwasser-System als effektive und ökonomische Alternative gegenüber der gebräuchlichen Behandlung mit Sheath-Flüssigkeit für die Analyse der Ploidiegrade in Pflanzenmaterial verwendet werden kann. Die hohe Qualität des partikelfreien arium-Reinstwassers ist sehr gut geeignet, um reproduzierbare Ergebnisse bei durchflusszytometrischen Screenings von Pflanzensamen zu erzielen. Jedoch wird empfohlen, selbst hergestellten Sheath-Flüssigkeiten Additive wie Antibiotika und Detergenzien zuzusetzen. Diese Zusätze haben positive Auswirkungen auf die zuverlässige langfristige Funktion des Durchflusszytometers, da sie die Biofilmbildung verhindern helfen und die Benetzung der inneren Oberflächen der Behälter, Schläuche, Ventile und Durchflusszellen verbessern (persönliche Mitteilung von M. Steinberg, Partec GmbH).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass arium-Reinstwasser ohne Probleme für die Durchflusszytometrie von Pflanzenzellen eingesetzt werden kann.

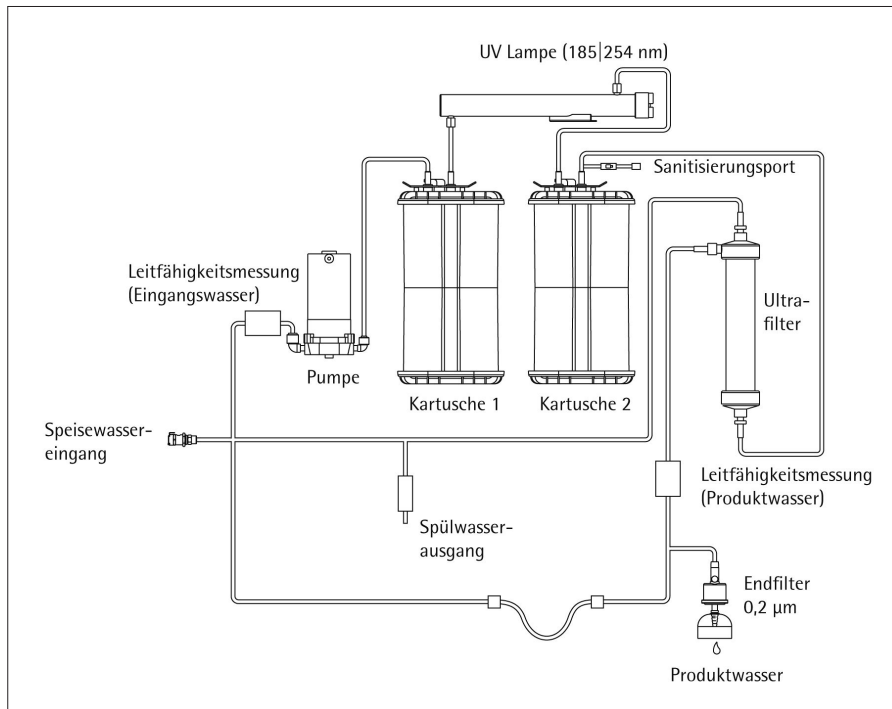


Bild 4: Schematische Darstellung des Flussdiagramms beim Reinstwassersystem arium pro VF. Zur besseren Übersichtlichkeit sind die Ventile und deren Steuerung weggelassen.

Der zunehmende Einsatz dieser Methode in anderen Applikationen wie z.B. der Erkennung von Tumorzellen, der quantitativen Bestimmung und morphologischen Differenzierung von Zellen, Zellzyklus-Analysen, DNA-RNA-Gehaltsbestimmungen, Apoptosis-Messungen, usw., gepaart mit der exzellenten Eignung von arium-Reinstwasser für die Durchflusszytometrie, eröffnen zukünftig neue Anwendungsmöglichkeiten für arium-

Reinstwasser in dieser an Bedeutung gewinnenden Technologie.

Danksagung

An dieser Stelle sei *Matthias Steinberg*, Partec GmbH, Münster, für die hilfreichen Diskussionen und Ratschläge sowie für die Bereitstellung des Durchflusszytometrie-Bildes gedankt. Unser Dank gilt ferner *Prof. Dr. Elvira Hörandl* und *Dr. Simone Klatt*, Abteilung für Systematische

Botanik, Georg-August-Universität, Göttingen, für die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Literatur

- [1] Johri BM. 1984. *Embryology of angiosperms*. Berlin, G: Springer-Verlag.
 - [2] Nogler GA. 1984. *Gametophytic apomixis*. In: Johri BM ed. *Embryology of angiosperms*. Berlin, G: Springer-Verlag, Seiten 475-518.
 - [3] Battaglia E. 1951. *The male and female gametophytes of angiosperms - an interpretation*. *Phytomorphology* 1: 87-116.
 - [4] Asker SE, Jerling L. 1992. *Apomixis in plants*. Boca Raton, USA: CRC Press.
 - [5] Dittrich W, Göhde W. 1968. Patent DE 1815352, *Automatisches Meß- und Zählgerät für die Teilchen einer Dispersion*.
 - [6] http://en.wikipedia.org/wiki/Flow_cytometry
 - [7] Heller FO. 1973. *DNS-Bestimmung an Keimwurzeln von Vicia faba L. mit Hilfe der Impulscytophotometrie*. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 86: 437-441.
 - [8] Doležel J. 1991. *Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants*. *Phytochemical analysis* 2: 143-154.
 - [9] Hojsgaard DH, Martínez EJ, Quarin CL. 2013. *Competition between meiotic and apomictic pathways during ovule and seed development results in clonality*. *New Phytologist* 197: 336-347.
- Unterstützende Informationen in der online Version dieses Artikels.*
- [10] Matzk F, Meister A, Schubert I. 2000. *An efficient screen for the reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots*. *Plant Journal* 21: 97-108.
 - [11] Paun O., Hörandl E. 2006. *Evolution of Hypervariable Microsatellites in Apomictic Polyploid Lineages of Ranunculus carpaticola: Directional Bias at Dinucleotide Loci*. *Genetics* 174: 387-398.

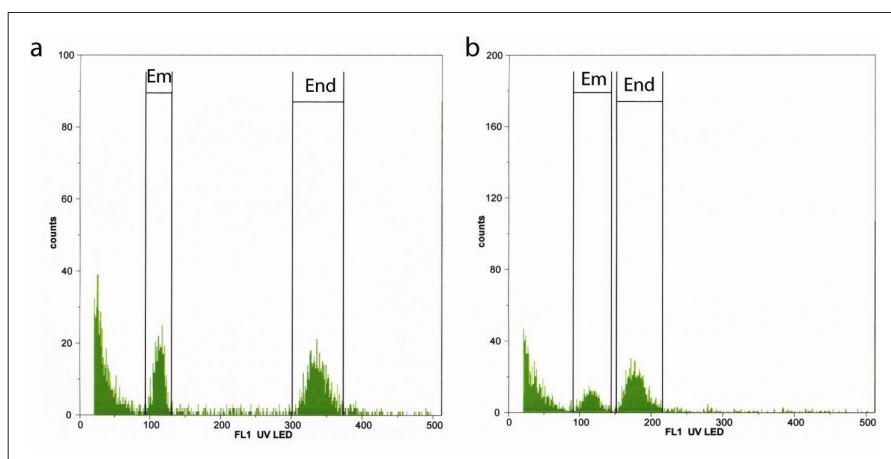


Bild 5: Durchfluss-Histogramme von hexaploiden *R. carpaticola* Samen.

Die x-Achse repräsentiert die relative Fluoreszenz von jedem einzelnen gemessenen Partikel, während die Anzahl der Partikel auf der y-Achse repräsentiert wird.

- a. Histogramm von apomiktisch entstandenen Samen mit einem Peak-Verhältnis Em : En von 3,15.
- b. Histogramm von sexuell entstandenen Samen mit einem Peak-Verhältnis Em : En von 1,48.

 **sartorius**

Sartorius AG, Göttingen
Tel.: 0551.308.0, info@sartorius.com
www.sartorius.com/arium