

Aus dem Botanischen Institut der Universität Wien

Differentielle Heterochromatinfärbung und Darstellung von Schraubenbau sowie Subchromatiden an pflanzlichen somatischen Chromosomen in der Meta- und Anaphase

Von

Johann Greilhuber, Wien

Mit 4 Abbildungen

(Eingegangen am 7. April 1972)

Einleitung

Über die Erzielung konstanter Färbungsmuster an tierischen Metaphasechromosomen und ihre Verwendung zur Kennzeichnung des Karyotyps erschien in neuester Zeit ein breites Schrifttum. An pflanzlichen Chromosomen wird gegenwärtig hauptsächlich die von CASPERSSON und Mitarbeitern eingeführte Fluorochromierungsmethode angewendet (CASPERSSON et al., 1969a, b; VOSA, 1970, 1971). YAMASAKI konnte jedoch schon 1956 und zuletzt 1971 überzeugende Färbungsmuster an somatischen Metaphasechromosomen von *Cypripedium debile* und *Trillium kamschaticum* darstellen (YAMASAKI, 1956, 1959, 1961, 1965, 1971), und noch früher hatte LEVAN unter anderem an einigen *Allium*-Arten durch Vorfixierung mit Quecksilber-Nitrat eine differentielle Darstellung des Heterochromatins während der mittleren Mitosestadien erzielt (LEVAN, 1945, 1946). Er erwähnt auch das deutliche Hervortreten der Subchromatiden im Anaphasechromosom.

Die vorliegende Untersuchung beschäftigt sich einerseits mit der longitudinalen Differenzierung der Chromosomen von *Allium cepa* und *Fritillaria imperialis* in Eu- und Heterochromatin und ihrer Sichtbarmachung während der Meta- und Anaphase. Andererseits wird auf die transversale Differenzierung der Chromosomen von *Allium cepa* kurz eingegangen, da die angewendete Methode die Darstellung des Spiralbaus somatischer pflanzlicher Chromosomen mit bemerkenswerter Klarheit gestattet und dabei stellenweise ein Doppelbau der Anaphasechromosomen zutage tritt.

Material und Methode

Die Untersuchungen wurden an einer nicht näher bestimmten Sippe des Handels von *Allium cepa* und an *Fritillaria imperialis* aus dem Botanischen Garten der Universität Wien durchgeführt. Colehizinierte (0,25% Colehizin, 1—3 Stunden) und nicht vorbehandelte Wurzelspitzen wurden der Länge nach halbiert und über Nacht in Alkohol-Eisessig (3:1) fixiert, dann für 5 (*A. cepa*) bzw. 10 min (*F. imperialis*) in 0,007 n NaOH und anschließend in ein auf 80 °C erhitztes Gemisch aus 9 Teilen Karmin-Essigsäure (KE) und 1 Teil HCl übertragen. Die Reaktion wurde nach 5 bzw. 8 min durch Eintauchen der Wurzeln in kalte KE abgestoppt. Anschließend wurden Quetschpräparate angefertigt.

Zur Darstellung der Chromosomenspiralen von *A. cepa* bewährte sich folgende leicht modifizierte Methode etwas besser: Nach der NaOH-Behandlung wird ein Gemisch aus reiner 45%iger Essigsäure und n HCl (9:1, 80 °C) verwendet, dann wird zuerst in kalte 45%ige Essigsäure und nach wenigen Minuten für ca. 12 h in 70%igen Alkohol überführt; anschließend wird in KE gefärbt. Neben einer etwas deutlicheren Darstellung der Spiralen werden störende Lipidtropfen im Cytoplasma beseitigt und der Quetschvorgang erleichtert.

Zur Kontrolle wurde auch die von YAMASAKI (1971) angegebene Methode in einer leicht modifizierten Form angewendet. Lebende Wurzelspitzen wurden halbiert und sofort in ein auf 80 °C erhitztes Gemisch aus 9 Teilen KE und 1 Teil n HCl gebracht. Nach 5 bzw. 8 min wurde in kalte KE überführt und nach einigen weiteren Minuten gequetscht.

Befunde

Allium cepa. — Führt man an Wurzelspitzen der Küchenzwiebel die von YAMASAKI (1971) beschriebene Methode — wie oben angegeben — durch, so erhält man eine differentielle Darstellung winziger stark gefärbter Endabschnitte an sehr blaß befärbten, etwas gequollenen Meta- und Anaphasechromosomen. Verwendet man nicht lebendes, sondern in Alkohol-Eisessig fixiertes Material, schlägt die Methode fehl (vgl. YAMASAKI, 1956). Durchtränkt man jedoch vor der hydrolytischen Behandlung die Wurzelspitzen 5 min lang mit 0,007 n NaOH, so treten in einem großen Prozentsatz der Mitosen die gleichen Färbungsmuster wieder hervor. In Meta- und Anaphasen lassen sich an sämtlichen Chromosomenschenkeln verschieden kurze stark gefärbte Endabschnitte feststellen; die Satelliten verhalten sich ebenso (die Pflanzen besaßen 3 oder 4 SAT-Chromosomen im diploiden Chromosomensatz; vgl. BATTAGLIA, 1957). Alle — oder zumindest die meisten

Chromosomen haben außerdem schwächer gefärbte, unterschiedlich ausgedehnte und weniger scharf abgegrenzte proximale Banden (Abb. 1, *c, d*). Es zeigen sich also die von der Interphase und Prophase bekannten

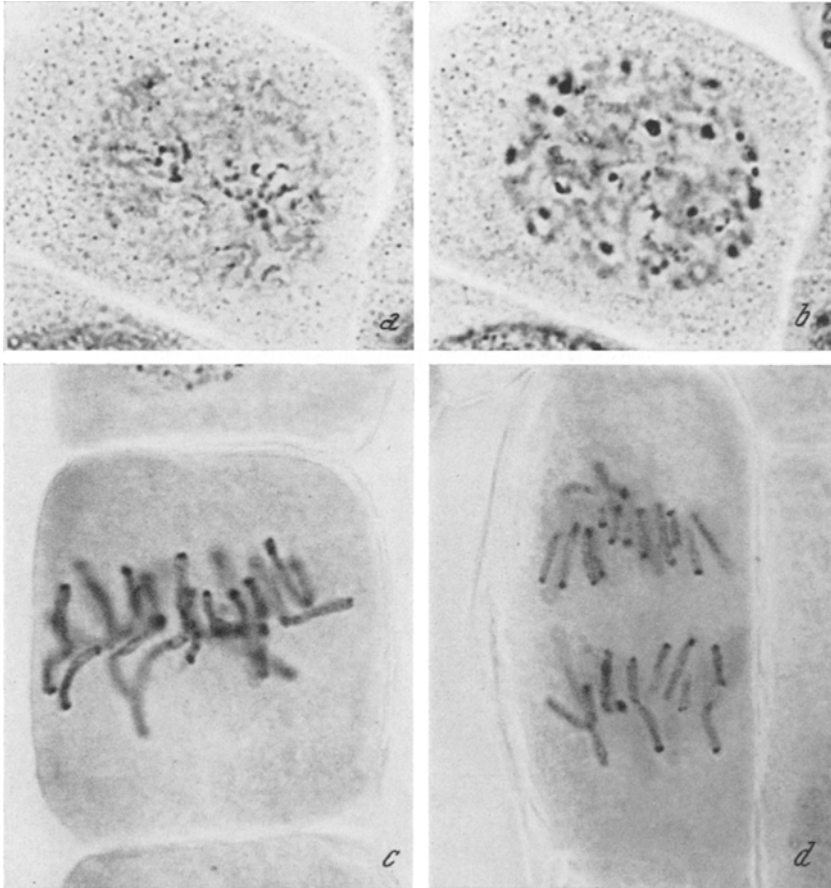


Abb. 1. *Allium cepa*. Mitosen aus dem Wurzelmeristem: *a—b* Kern in früher Prophase in zwei verschiedenen Schärfeebenen mit verstärkt hervortretendem Heterochromatin, in *a* lockeres proximales, in *b* kompaktes distales Heterochromatin abgebildet; *c* Metaphase; *d* Anaphase mit selektiv dargestelltem Heterochromatin. — *a—b* AE, NaOH, KE-HCl; *c—d* AE, modifizierte Methode. Vergrößerung 1460 ×

zweierlei Sorten von Heterochromatin. Die interkalaren euchromatischen Chromosomenteile sind im wesentlichen gleichmäßig schwach gefärbt; wo Strukturen auftreten, handelt es sich um Schraubenumgänge. Auch an den interphasischen und prophasischen Kernen stellen

sich charakteristische Veränderungen ein. Während das Euchromatin fast ungefärbt ist, treten alle heterochromatischen Teile echt — nicht nur etwa relativ — verstärkt hervor, was sich vor allem in der gesteigerten Lichtbrechung der Chromozentren bemerkbar macht und wahrscheinlich auf eine zusätzliche Kondensation zurückgeht. Abb. 1 *a, b* zeigt an ein- und demselben Kern die verschiedenartige Beschaffenheit des verstärkt hervortretenden Chromatins in einer frühen Prophase. Der Vergleich mit unbehandelten Kernen lehrt, daß sich mit der beschriebenen Methode alle Chromosomenabschnitte, die im Interphasekern als Heterochromatin vorhanden sind, auch an Meta- und Anaphasechromosomen darstellen lassen, also nicht nur einzelne bestimmte wie im Fall von *Fritillaria* (siehe unten).

Außerdem machen sich in nahezu allen Meta- und Anaphasen in den blaß gefärbten Chromosomenabschnitten Schraubenstrukturen bemerkbar; an colchiziniertem Material und nach Anwendung der modifizierten Methode treten sie besonders deutlich hervor, und zwar vor allem bei mittleren Färbungsgraden — die Färbung fällt nämlich je nach der Entfernung der Zellen von der Schnittfläche oder der Oberfläche der Wurzelspitzen verständlicherweise etwas verschieden aus. Offensichtlich werden durch die Behandlung mit Natronlauge und Säure die C-mitotisch verkürzten Chromosomen etwas gedehnt, wobei sich die zuerst eng gewickelten Spiralen auflockern. Während an vielen Stellen der spreizenden Chromatiden von spät c-metaphasischen Chromosomen anscheinend nur eine einzige Schraube vorliegt (Abb. 2 *b*, Pfeile), die vermutlich aus zwei gemeinsam spiralisierten, eng vereinigten Längshälften besteht, ergeben sich an anderen Stellen Bilder, die nur im Sinne des Vorhandenseins von zwei Subchromatiden gedeutet werden können, die sich seitlich auseinander geschoben haben (Abb. 2 *a, b*, Doppelpfeile). Vollständige Trennung der Subchromatiden unter Ausbildung eines Spaltes, wie man sie bei paranematischer Schraubung erwarten könnte, wurde nicht festgestellt. Ob nur eine begrenzte Verschiebung möglich ist und damit plektonematische Schraubung vorliegt, muß offenbleiben.

***Fritillaria imperialis*.** — Die Struktur unbehandelter Interphasekerne von *Fritillaria imperialis* zeigt Abb. 3 *a*. Von einer rein euchromatischen Struktur zu sprechen, wie LA COUR (1951) es tut, fällt schwer. Es ist nämlich eine Unzahl von größeren und kleineren Chromozentren und dazwischen gelagert fädiges Euchromatin vorhanden. Insgesamt macht das Chromatin den Eindruck einer etwas schmierigen Beschaffenheit. Abb. 3 *b* zeigt einen diploiden Interphasekern nach Anwendung der eingangs beschriebenen Methode. Fast alles Chromatin erscheint blaß, nur konstant 4 isodiametrische Chromozentren treten scharf

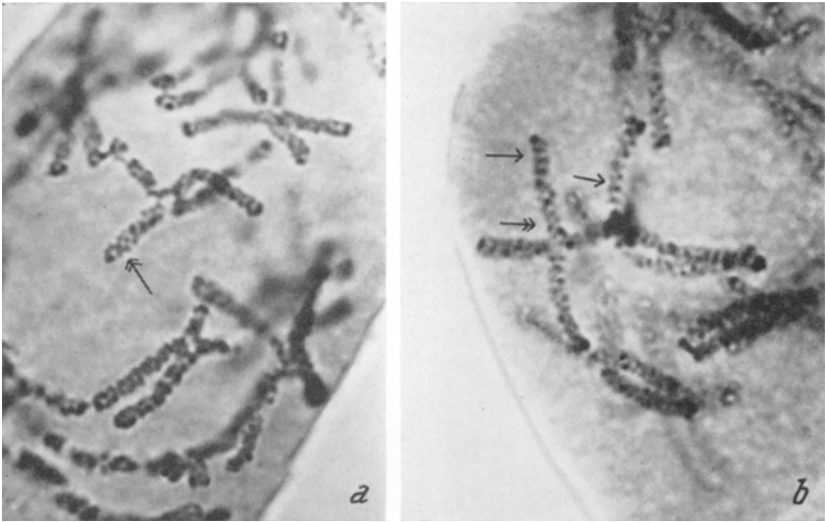


Abb. 2. *Allium cepa*. *a*—*b* späte C-Metaphasen aus dem Wurzelmeristem; Stellen mit scheinbar einfacher Spirale sind durch Pfeile, Stellen mit Doppelspirale durch Doppelpfeile gekennzeichnet. — AE, modifizierte Methode (s. Text). Vergrößerung 2300×

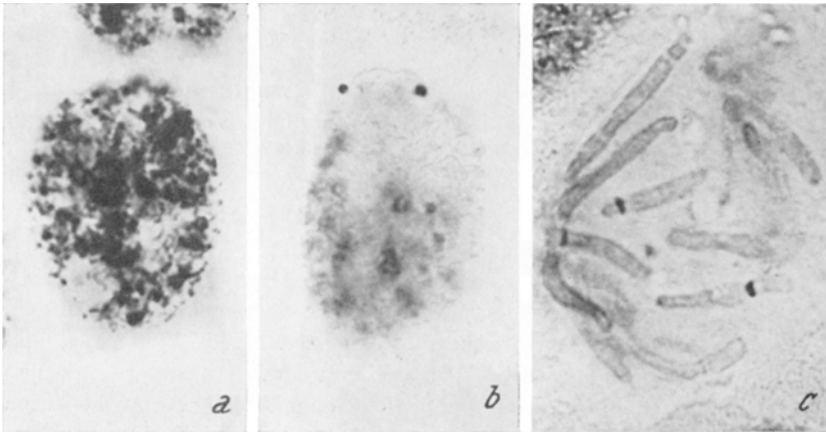


Abb. 3. *Fritillaria imperialis*. Kerne aus dem Wurzelmeristem: *a* Interphasestruktur unbehandelter Kerne; *b* Interphasekern, *c* frühe C-Metaphase mit differentiell gefärbten Nucleolus-Organisatoren. — *a* AE, KE; *b* AE, NaOH, KE-HCl; *c* nach YAMASAKI. Vergrößerung 1460×

hervor (zwei davon in Abb. 3 *b* in der Schärfenebene). Dieselben Abschnitte lassen sich während des gesamten Kernzyklus, also auch in der Meta- und Anaphase, differentiell anfärben. Es handelt sich um

kurze Stücke, die an die SAT-Zonen distal anschließen [*F. imperialis* besitzt nach DARLINGTON (1930) zwei Paare von SAT-Chromosomen]. Eine schematische Darstellung der SAT-Chromosomen gibt Abb. 4. Alle übrigen Chromosomen, einschließlich eines im vorliegenden Material häufig auftretenden kurzen B-Chromosoms, verhalten sich wie die schwach gefärbten Teile der SAT-Chromosomen. Das heißt also: die nicht Nukleolus-assoziierten heterochromatischen Abschnitte erfahren dieselben Veränderungen wie die euchromatischen und treten nicht hervor. Ein völlig analoges Ergebnis erhält man bei Anwendung der Methode YAMASAKI: Abb. 3c zeigt eine frühe C-Metaphase, in der drei der vier SAT-Chromosomen in der Schärfenebene liegen und sehr

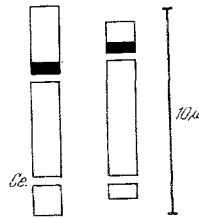


Abb. 4. Schematische Darstellung der beiden SAT-Chromosomen des haploiden Satzes von *Fritillaria imperialis* und ihrer stark gefärbten Abschnitte

distinkte Banden aufweisen. An nicht colchizinierten Mitosen kann man mitunter feststellen, daß diese Banden sich aus zwei dicht hintereinander liegenden Teilen, beide distal von der SAT-Zone, zusammensetzen.

Besprechung

Wie eingangs erwähnt, stellt die färberische Darstellung heterochromatischer Abschnitte an den Chromosomen mittlerer Teilungsstadien kein Novum dar. In mehreren Publikationen zeigte YAMASAKI, daß sich an *Cypripedium debile* in Mitose und Meiose mit verschiedenen Methoden gleichartige Bandenmuster erzeugen lassen. Sowohl durch Behandlung mit heißen Säuregemischen und nachfolgende Feulgen- und Orceinfärbung als auch durch DNase-Einwirkung lassen sich stark färbbare Segmente gegen schwach färbbare abgrenzen. Auch durch die Histon-Färbung mit Fast-Green und die Methylgrün-Pyronin-Färbung können dieselben Abschnitte differentiell dargestellt werden. Anders als *C. debile* verhält sich *Trillium kamtschaticum*; hier treten nach Säurebehandlung die heterochromatischen Abschnitte als schwächer gefärbte Zonen hervor, sind also anscheinend säure-

labiler als das Euchromatin, und nach Fast-Green-Färbung ist keine Differenzierung feststellbar. LEVAN (1945, 1946) erzielte durch Behandlung mit Schwermetallsalzen u. a. an verschiedenen *Allium*-Arten eine Differenzierung von Eu- und Heterochromatin während der mittleren Teilungsstadien. Allerdings tritt dabei bei *A. cepa*, im Unterschied zu meinen Ergebnissen, das proximale Heterochromatin weitaus stärker hervor als das distale. Die verschiedenen Sorten von Heterochromatin scheinen also auf verschiedene Behandlung verschieden zu reagieren.

Von der Säurebehandlung YAMASAKIS unterscheidet sich die hier angegebene Methode in zwei wesentlichen Punkten, nämlich der AE-Fixierung und der NaOH-Behandlung. Daher können auch nicht von vornherein gleichartige Ergebnisse erwartet werden und wären genaue Vergleiche an denselben Objekten nötig. NaOH-Vorbehandlung wird auch zur Denaturierung der DNS bei der Darstellung der „GIEMSA-bands“ an tierischen Chromosomen verwendet (ARRIGHI und HSU, 1971). Man könnte deshalb auch als Grundlage der hier geschilderten differentiellen Färbung unterschiedliche De- und Renaturierungsprozesse in der DNS annehmen. Danach würde durch die NaOH die Lösung der Wasserstoffbrücken zwischen den Strängen der Doppelhelix und durch die saure Hydrolyse die Zerlegung der DNS-Einzelstränge in kurze Stücke bewirkt werden; nach der Abkühlung wäre die Renaturierung repetitiver DNS gefördert und nachher intensive Färbung möglich, während nicht repetitive DNS verlorenginge und keine oder nur schwache Färbung zustande käme. In ähnlicher Weise wurde zunächst jedenfalls das Resultat der GIEMSA-Methode gedeutet (ARRIGHI und HSU, 1971; YUNIS et al., 1971). Später tauchten allerdings Zweifel an der Richtigkeit dieser Interpretation auf (SUMNER et al., 1971; WANG und FEDOROFF, 1972). Eine andere Möglichkeit bestünde darin, daß in bestimmten Chromosomenabschnitten besondere Proteine oder Proteine in besonderer Bindung an die DNS vorliegen und eine unterschiedliche Resistenz der DNS bewirken. Weiters könnte man auch eine größere Stabilität repetitiver DNS allein gegen Denaturierung nach AE-Fixierung annehmen (SUMNER et al., 1971).

Bei den stark gefärbten Teilen der Meta- und Anaphasechromosomen von *A. cepa* und *F. imperialis* handelt es sich unzweifelhaft um Heterochromatin. Während jedoch bei *A. cepa* alles Heterochromatin dargestellt wird, reagiert bei *F. imperialis* nur ein kleiner Teil positiv, nämlich die Nucleolus-organisierenden Segmente¹. Daß es

¹ In den bisher untersuchten Fällen konnte im Nucleolus-organisierenden Chromatin ein besonders hoher Grad von Repetitivität der rRNA-Cistrons festgestellt werden (YUNIS und YASMINEH, 1971; INGLE und SINCLAIR, 1972); sein besonderes Verhalten wäre mit der oben angedeuteten Vorstellung vom Mechanismus einer De- und Renaturierung gut vereinbar.

verschiedene Typen von Heterochromatin gibt, ist aus cyto-morphologischen Untersuchungen schon lange bekannt und vielfach belegt. Insbesondere das Nucleolus-assoziierte Heterochromatin ist oft anders, nämlich dichter gebaut als das übrige und auch gegen die natürliche Auflockerung in Mitose und Endomitose widerstandsfähiger (TSCHERMAK-WOESS, 1963). Vertieft wurde die Kenntnis über die Verschiedenartigkeit von Heterochromatin insbesondere durch die Anwendung von Fluoreszenzmethoden. Die damit gegebenen Möglichkeiten zur verfeinerten Kennzeichnung von Karyotypen wurden in neuester Zeit durch die GIEMSA-Methode bereichert, deren Anwendbarkeit an pflanzlichen Chromosomen aber noch nicht belegt ist. Zu ähnlichen Zwecken könnte das hier beschriebene Verfahren mit Vorteil eingesetzt werden. Gegenüber der Methode YAMASAKIS (durchgehend gleiche Ergebnisse vorausgesetzt) besitzt es den Vorteil, daß die allgemein übliche Alkohol-Eisessig-Fixierung angewendet wird und damit der Untersucher von lebendem Material unabhängig ist, was besonders bei karyologischen und cytotaxonomischen Untersuchungen an Material von Wildfundorten ins Gewicht fällt.

Gelegentlich der Darstellung heterochromatischer Abschnitte erwähnt bereits LEVAN (1946) die verbesserte Sichtbarkeit der Längselemente der Chromosomen. Er gelangt zur Ansicht, daß das Anaphasechromosom zwei sich lose umwindende Subchromatiden enthält. Mit dieser Fragestellung sieht man sich auch bei Anwendung der hier beschriebenen Methodik konfrontiert. Bekanntlich gelingt der Nachweis und die Aufklärung des Schraubenbaues von somatischen pflanzlichen Chromosomen der mittleren Mitosestadien weitaus weniger leicht als von meiotischen. Nur bei besonders günstigen Objekten kann er „zufällig“ auch in Zellen im Gewebeverband sichtbar werden (GETTLER, 1938a). Insbesondere an Pollenmitosen mehrerer Objekte zeigte GETTLER, daß das Anaphasechromosom aus einer einzigen eng gewickelten Spirale besteht, wobei das sichtbare Chromonema wahrscheinlich längsgespalten ist (GETTLER, 1935, 1938a, 1943a); analog sind die leichter zu behandelnden tierischen Chromosomen gebaut (GETTLER, 1943b, OHNUKI, 1968). Mit Hilfe der hier angegebenen Methode läßt sich in einem gewissen Prozentsatz der Meta- und Anaphasechromosomen regelmäßig eine Auflockerung in der Art erreichen, daß der Schraubenbau der Chromosomen, insbesondere in C-Mitosen, unmittelbar sichtbar wird. Neben einer einzigen Schraube aus einem scheinbar einfachen Faden (Abb. 2, Pfeile) lassen sich häufig unzweifelhaft zwei Chromonemata, also Subchromatiden, feststellen, die bereits bis zu einem gewissen Grad auseinandergewichen sind (Abb. 2, Doppelpfeile). Ob para- oder plektonematische Umwindung vorliegt, kann nicht mit Sicherheit entschieden werden, doch wäre das nur begrenzte Ausein-

anderweihen der Chromonemata ein Argument für die Annahme einer plektonematischen Umwindung. AISIMAS Abbildungen von somatischen Anaphasen von *Tradescantia* lassen jedoch einen deutlichen Spalt zwischen separat geschraubten Subchromatiden wenigstens entlang kurzer Strecken erkennen (AISIMA, 1941; vgl. KUWADA, 1939). Wie problematisch die Interpretation von Chromosomenspiralen meistens ist, zeigte bereits GETTLER (1938) auf, besonders wenn sichtlich „Zerstörungsartefakte“ infolge mangelhafter Fixierung mit im Spiel sind.

Die Frage drängt sich auf, ob die Darstellung des Heterochromatins nicht überhaupt nur auf einer verstärkten Entschraubung des Euchromatins beruht. Dieser Effekt könnte zwar mitbeteiligt sein, die schwache Färbung der entsprechenden Chromosomenabschnitte wird jedoch sicherlich hauptsächlich durch echten Abbau färbbarer Substanz bewirkt. Die Befunde YAMASAKIS sprechen ebenfalls für diese Deutung.

Zusammenfassung

An Wurzelspitzen von *Allium cepa* und *Fritillaria imperialis* lassen sich nach Fixierung in Alkohol-Eisessig, kurzfristiger Behandlung mit NaOH und nachfolgender saurer Hydrolyse heterochromatische Chromosomenabschnitte während des gesamten Kernzyklus und insbesondere in den mittleren Mitosestadien darstellen. Dabei wird bei *A. cepa* das gesamte, bei *F. imperialis* nur ein Teil des im Interphasekern vorhandenen Heterochromatins selektiv angefärbt. An *A. cepa* kann gleichzeitig in den Meta- und Anaphasechromosomen deren Schraubenbau mit einer für somatische Mitosen ungewöhnlichen Deutlichkeit dargestellt werden, wobei stellenweise Subchromatiden getrennt zutage treten.

Summary

Selectively stained bands in chromosomes of the whole nuclear cycle can be obtained in alc.-ac. acid fixed root tips of *Allium cepa* and *Fritillaria imperialis* by a short timed NaOH treatment and subsequent hydrolysis in a mixture of 45% acetic acid and n-HCl (9:1) at 80 °C. In *A. cepa* the intensely stained bands of meta- and anaphase chromosomes correspond to all the chromocentres present in the untreated interphase nuclei. The difference of compact distal and less dense proximal heterochromatin also is noticeable in the chromosomes of the middle mitotic stages. In *F. imperialis* only a small amount of the heterochromatin present in the untreated interphase nuclei is stained selectively, that is the four intercalary nucleolus-organizers of the diploid chromosome complement.

Using the same method in a slightly modified way the coiled architecture of the meta- and anaphase chromosomes can be demonstrated in a noticeably marked manner. In Colchicine-treated root tips of *A. cepa* the chromatids of late metaphase chromosomes at different points show as well a single coil of what appears to be one chromonematic thread as undoubtedly two spiralized subchromatids. Nevertheless, since definite segregation of the subchromatid coils has not been observed the mode of the spiralization (para- vs. plectonematic) is not fully clear.

The possible molecular basis of the different staining behaviour of euchromatin and special sorts of heterochromatin is discussed briefly and the availability of the described method in obtaining refined karyotypes by localization and discrimination of heterochromatin in mitotic and interphase nuclei is pointed out.

Literaturverzeichnis

- AISIMA, T., 1941: Studies of mitosis and meiosis in comparison. II. Chromosome structure in the spiral stage and anaphase in mitosis as revealed by means of a maceration method. *Cytologia* **11**, 429—435.
- ARRIGHI, F. E., and T. C. HSU, 1971: Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics* **10**, 81—86.
- BATTAGLIA, E., 1957: *Allium ascalonicum* L., *A. fistulosum* L., *A. cepa* L.: analisi cariotipica. *Caryologia* **10**, 1—28.
- CASPERSSON, T., L. ZECH, E. J. MODEST, G. E. FOLEY, U. WAGH, and E. SIMONSSON, 1969: Chemical differentiation with fluorescent alkylating agents in *Vicia faba* metaphase chromosomes. *Exp. Cell Res.* **58**, 128—140.
- 1969: DNA-binding fluorochromes for the study of the organization of the metaphase nucleus. *Exp. Cell Res.* **58**, 141—152.
- DARLINGTON, C. D., 1930: Chromosome studies in *Fritillaria*. III. Chiasma formation and chromosome pairing in *Fritillaria imperialis*. *Cytologia* **2**, 37—55.
- GEITLER, L., 1935: Der Spiralbau somatischer Chromosomen. *Z. Zellf. u. Mikr. Anat.* **23**, 514—521.
- 1938a: Weitere Untersuchungen über den Spiralbau der Chromosomen. *Z. Zellf. u. Mikr. Anat.* **28**, 305—309.
- 1938: Chromosomenbau. *Protoplasma-Monographien*, Bd. 14, Berlin 1938.
- 1943a: Über eine postmeiotische Teilungsanomalie und den Spiralbau der Chromosomen von *Paris quadrifolia*. *Chromosoma* (Berl.) **2**, 519—530.
- 1943b: Zur Kenntnis des Kern- und Chromosomenbaus der Heuschrecken und Wanzen. *Chromosoma* (Berl.) **2**, 531—543.
- INGLE, J., and J. SINCLAIR, 1972: Ribosomal RNA genes and plant development. *Nature* **235**, 30—32.
- LA COUR, L. F., 1951: Heterochromatin and the organization of nucleoli in plants. *Heredity* **5**, 37—50.

- LEVAN, A., 1945: Cytological reactions induced by inorganic salt solutions. *Nature* **156**, 751—752.
- 1946: Heterochromaty in chromosomes during their contraction phase. *Hereditas* **32**, 449—468.
- OHNUKI, Y., 1968: Structure of chromosomes. I. Morphological studies of the spiral structure of human somatic chromosomes. *Chromosoma (Berl.)* **25**, 402—428.
- SCHNEDL, W., 1971: Analysis of the human karyotype using a reassociation technique. *Chromosoma (Berl.)* **34**, 448—454.
- SUMNER, A. T., H. J. EVANS, and R. A. BUCKLAND, 1971: New technique for distinguishing between human chromosomes. *Nature New Biology* **232**, 31—32.
- TSCHERMAK-WOESS, ELISABETH, 1963: Strukturtypen der Ruhekerne von Pflanzen und Tieren. *Protoplasmatologia V 1*.
- VOSA, C. G., 1970: Heterochromatin recognition with fluorochromes. *Chromosoma (Berl.)* **30**, 366—372.
- 1971: The Quinacrin-fluorescence patterns of the chromosomes of *Allium carinatum*. *Chromosoma (Berl.)* **33**, 382—385.
- YAMASAKI, NORIKO, 1956: Differentielle Färbung der somatischen Metaphasechromosomen von *Cypripedium debile*. *Chromosoma (Berl.)* **7**, 620—626.
- 1959: Differentielle Färbung der Chromosomen der ersten meiotischen Metaphase von *Cypripedium debile*. *Chromosoma (Berl.)* **10**, 454—460.
- 1961: Differentielle Färbbarkeit der somatischen und meiotischen Metaphasechromosomen von *Cypripedium debile* nach DNase-Behandlung. *Chromosoma (Berl.)* **11**, 479—483.
- 1965: Differentielle Färbbarkeit der somatischen Metaphasechromosomen von *Cypripedium debile* durch die Methylgrün-Pyronin-Methode. *Chromosoma (Berl.)* **16**, 411—414.
- 1971: Karyotypanalyse an Hand des Färbungsmusters der Metaphasechromosomen von *Cypripedium debile* und *Trillium kamschaticum*. *Chromosoma (Berl.)* **33**, 372—381.
- YUNIS, J. J., L. ROLDAN, W. G. YASMINEH, and J. C. LEE, 1971: Staining of repetitive DNA in metaphase chromosomes. *Nature (Lond.)* **231**, 532—533.
- and W. G. YASMINEH, 1971: Heterochromatin, satellite DNA, and cell function. *Science* **171**, 1200—1209.
- WANG, H. C., and S. FEDOROFF, 1972: Banding in human chromosomes treated with Trypsin. *Nature New Biology* **235**, 52—53.

Anschrift des Verfassers: JOHANN GREILHUBER, Botanisches Institut der Universität Wien, Rennweg 14, A-1030 Wien, Österreich.