

Spezifische Giemsa-Färbung von heterochromatischen Chromosomensegmenten bei *Vicia faba*, *Allium cepa* und *Paeonia tenuifolia*

B. Friebe

Institut für Angewandte Genetik der Freien Universität Berlin

Differential Giemsa Staining of Heterochromatic Regions in the Chromosomes of *Vicia faba*, *Allium cepa* and *Paeonia tenuifolia*

Summary. Hypotheses for the mechanism of differential Giemsa staining of euchromatin and heterochromatin are discussed. The banding-patterns of *Vicia faba*, *Allium cepa* and *Paeonia tenuifolia* are described. Heterochromatic chromosome segments have been identified in metaphase chromosomes to correspond with those to be found in interphase nuclei. The fact that the number of chromocenters is usually smaller than the number of Giemsa bands in the metaphase chromosomes is supposed to be due to fusion of heterochromatic sections during interphase. Within each species non-homologous chromosomes exhibit similar patterns. The significance of this phenomenon, which has been called "aequilocal heterochromacy" by Heitz, is so far unknown.

Zusammenfassung. Im theoretischen Teil werden die verschiedenen Hypothesen über den Mechanismus der unterschiedlichen Giemsa-Färbung von Eu- und Heterochromatin diskutiert. Im experimentellen Teil wird das Giemsa-Bandenmuster bei *Vicia faba*, *Allium cepa* und *Paeonia tenuifolia* beschrieben. Sowohl in den stark kondensierten Metaphase-Chromosomen als auch in den Interphase-Kernen können die heterochromatischen Chromosomensegmente auf Grund der stärkeren Giemsa-Färbung vom Euchromatin unterschieden werden. Die Zahl der Chromocentren ist jedoch in den meisten Fällen kleiner als die der Giemsa-Banden in den Metaphase-Chromosomen, was auf die Fusion heterochromatischer Chromosomenabschnitte in der Interphase hinweist.

Innerhalb einer Art zeigen auch nicht-homologe Chromosomen ein ähnliches Giemsa-Bandenmuster. Diese für eine Art charakteristische Verteilung von Eu- und Heterochromatin wurde von Heitz (1935) als "äquilokale Heterochromatie" bezeichnet. Die Bedeutung dieser Erscheinung ist weitgehend unbekannt.

1. Einleitung

Die von Giemsa 1935 entwickelte Azur-Eosin-Lösung findet seit langem ihre Anwendung in der Färbung von Protozoen und Blutaussstrichen. Die spezifische Giemsa-Färbung von heterochromatischen Chromosomensegmenten wurde zuerst von Pardue und Gall 1970 im centromerischen Chromatin der Maus beobachtet. Darauf aufbauend konnten Färbetechniken entwickelt werden, die eine Identifizierung einzelner Chromosomen auf Grund ihres Giemsa-Bandenmusters ermöglichen. Damit wurde eine genauere Analyse von chromosomalen Aberrationen möglich, was besonders für die Humancytogenetik von großer Bedeutung ist. Eine weitere Anwendung finden die Banden-Techniken in der Züchtungsforschung, so zum Beispiel bei der Genomanalyse von *Triticale*, wo man Weizen- und Roggen-Chromosomen auf Grund charakteristischer Giemsa-Banden unterscheiden kann. Weiterhin sei auf die große Bedeutung dieser Methoden bei taxonomischen und phylogenetischen Untersuchungen hingewiesen.

Nach Heitz 1935 bezeichnet man Chromosomenabschnitte, die in der Interphase und in der mitotischen

und meiotischen Prophase auf Grund der stärkeren Kondensation des Chromatins eine intensivere Färbung als die übrigen Chromosomenabschnitte aufweisen, als heterochromatisch. Fakultatives Heterochromatin zeigt in homologen Chromosomensegmenten einen unterschiedlichen Kondensationsgrad, während konstitutives oder strukturelles Heterochromatin in beiden homologen Chromosomen auf Grund der stärkeren Kondensation vom Euchromatin unterschieden werden kann.

Heterochromatische Chromosomensegmente lassen sich durch folgende Eigenschaften charakterisieren:

1. DNA-Replikation findet später als im Euchromatin statt
2. hoher Gehalt an repetitiven DNA-Sequenzen
3. starke unspezifische Paarungstendenzen
4. spezifische Reaktionen auf Kälte-Behandlung
5. nach Applikation von chemischen Mutagenen bevorzugt an Aberrationen beteiligt
6. charakteristische Färbeeigenschaften.

Heterochromatische Chromosomenabschnitte sind weitgehend transcriptionsinaktiv und enthalten nur selten Major-Gene (Barigozzi und Di Pasquale 1953).

Genetische Experimente (Baker 1958) zeigen weiterhin, daß innerhalb heterochromatischer Chromosomensegmente kein Crossing-over stattfindet wodurch Unterschiede in den Kartenabständen beim Vergleich von Rekombinationskarten und cytologischen Chromosomenkarten hervorgerufen werden. Auch cytologischen Beobachtungen bestätigen, daß die Ausbildung von Chiasmata im Heterochromatin unterdrückt wird (Linnert 1955; Fox et al. 1973; Marks 1974).

Frenster (1969) konnte keine signifikanten Unterschiede im DNA-Histon-Verhältnis und in der Histonzusammensetzung im Eu- und Heterochromatin feststellen. Dagegen unterscheiden sich eu- und heterochromatische Chromosomenabschnitte im Gehalt an Nicht-Histon-Proteinen, Phosphoproteinen und Phospholipiden.

Nach Arrighi und Hsu (1971a, 1971b) zählt man Chromosomensegmente mit intensiver Giemsa-Färbung zum konstitutiven Heterochromatin. Die bevorzugte Giemsa-Färbung von centromerischem Heterochromatin bezeichnet man auch als C-Banden, während stark gefärbte interkalare und terminale Chromosomenabschnitte auch als G-Banden bezeichnet werden.

Neben der Giemsa-Färbung ermöglicht auch die von Caspersson et al. (1968) entwickelte Fluoreszenz-Banden-Technik eine unterschiedliche Färbung von Eu- und Heterochromatin. Nach der Färbung mit Fluorochromen können im UV-Fluoreszenz-Mikroskop charakteristische Banden beobachtet werden, die eine weitgehende Übereinstimmung mit den Giemsa-Banden und den spät replizierenden Chromosomenabschnitten erkennen lassen (Caspersson et al. 1969; Vosa, 1970; Ganner und Evans 1971; Evans et al. 1971). Auch die von einigen Autoren (Rodman und Tahiliani, 1973; Yunis und Sanchez 1973; Greilhuber 1974) beschriebenen Feulgen-, Alcianblau- und Karmin-Banden sind weitgehend mit den Giemsa- und Fluoreszenz-Banden identisch.

2. Theoretische Betrachtungen zur differentiellen Giemsa-Färbung

2.1. Zusammensetzung und Eigenschaften der Giemsa-Lösung

Die Giemsa-Lösung enthält die Farbstoffe Eosin Y, Methylenblau und dessen Oxidationsprodukte Azur A, B und C. Als Lösungsmittel dient ein aus gleichen Teilen bestehendes Gemisch von Methanol und Glyce-

rin. Mit Ausnahme des Eosins rechnet man die übrigen Farbstoffkomponenten zur Gruppe der Thiazine, die sich untereinander nur in der Anzahl der Methylgruppen unterscheiden. Die Thiazinfarbstoffe zeichnen sich durch stark ausgeprägte metachromatische Eigenschaften aus, das heißt mit steigender Farbstoffkonzentration oder Bindung an geeignete Substrate tritt eine Abnahme des Extinktionskoeffizienten und eine Wellenlängenverschiebung infolge von hydrophoben Stapelwirkungen und Dimer- bzw. Polymer-Bildung auf. Die von Comings (1975a) beobachteten Wellenlängenverschiebungen nach der Bindung einzelner Farbstoffkomponenten an DNA eröffnen Möglichkeiten zur Analyse der molekularen Mechanismen der differentiellen Giemsa-Färbung von Eu- und Heterochromatin.

Comings (1975a) konnte auch nach der Färbung mit Methylenblau oder Azur A, B und C charakteristische Chromosomen-Banden beobachten. Die Färbung mit Thionin, das keine Methylgruppe enthält, ergab nur in einzelnen Fällen ein schwaches Bandenmuster, was darauf schließen läßt, daß das Vorhandensein von wenigstens einer Methylgruppe zur unterschiedlichen Giemsa-Färbung von Eu- und Heterochromatin erforderlich ist. Eosin Y erwies sich als nichtwirksamer Bestandteil der Giemsa-Lösung, da es keine Bindung mit DNA einzugehen vermag.

2.2. Giemsa-Techniken bei tierischen und pflanzlichen Objekten

Für Säuger-Chromosomen konnten zahlreiche Giemsa-Techniken entwickelt werden, die eine differentielle Färbung von centromerischem (Pardue und Gall 1970; Arrighi und Hsu 1971a; Chen und Ruddle 1971; Sumner 1972; Merrick et al. 1973; Fiskesjö 1974a) und interkalarem Heterochromatin (Evans et al. 1971; Schnedl 1971; Shiraishi und Yosida 1972; Seabright 1972; Hansen-Melander et al. 1974) ermöglichen.

Bei den meisten C-Banden-Techniken werden lufttrockene Präparate für kurze Zeit mit Alkali behandelt. Nach dem Entwässern in Alkohol wird in SSC bei 60 bis 65 °C inkubiert und anschließend mit gepufferter Giemsa-Lösung gefärbt. Es sind aber auch C-Banden-Techniken bekannt, die keine Alkali-Behandlung beinhalten (McKenzie und Lubs 1973; McKay 1973; Merrick et al. 1973).

Kato und Moriwaki (1972) konnten nach der Behandlung mit den verschiedensten Agenzien (organische und anorganische Salze, Puffer, Basen, Protein-Dena-

turierungsmittel, Chelatbildner, Detergenzien) G-Banden beobachten. Die Vorbehandlungen sind jedoch wie McKay (1973) und Yunis und Sanchez (1973) zeigen konnten, zur unterschiedlichen Giemsa-Färbung von Eu- und Heterochromatin nicht unbedingt erforderlich.

Vosa und Marchi (1972) und Natarajan und Natarajan (1972) beschreiben erstmals die bevorzugte Giemsa-Färbung von pflanzlichem Heterochromatin. Es folgten weitere Arbeiten von verschiedenen Autoren an unterschiedlichen Objekten (Schweizer 1973; Stack und Clarke 1973a, 1973b; Takehisa und Utsumi 1973; Döbel et al. 1973; Sarma und Natarajan 1973; Merker 1973; Marks und Schweizer 1974; Marks 1974; Fillion 1974; Fiskesjö 1974b; Stack 1974; Merritt und Burns 1974; Weimarck 1974; Gill und Kimber 1974a; 1974b; Vosa 1974; Verma und Rees 1974; El-Gadi und Elkington 1975; Darvey und Gustafson 1975; Hadlaczy und Belea 1975; Singh und Lelley 1975; Weimarck 1975).

Zwischen den Giemsa-Techniken bei Pflanzen und Tieren bestehen nur geringfügige Unterschiede. Nach der Behandlung mit einem c-mitotischen Agens (Colchicin, α -Monobromnaphthalin, 8-Hydroxyquinolin, Eiswasser) und dem Fixieren (Alkohol/Eisessig) folgt in den meisten Fällen die Hydrolyse in Salzsäure. Besondere Schwierigkeiten treten bei der Macerierung und Präparation von pflanzlichem Gewebe auf, da die pektin- und cellulosehaltigen Zellwände die Einwirkungsmöglichkeit der verschiedenen Agenzien herabsetzen. In vielen Fällen ist es erforderlich, die Zellwände durch geeignete enzymatische Behandlung (Pektinase, Cellulase, Cytase) abzubauen. Anschließend werden die isolierten meristematischen Zellen in 45 % iger Essigsäure gequetscht, wobei zu beachten ist, daß die Chromosomen genügend ausgebreitet und dennoch nicht aus dem Metaphase-Verband herausgelöst werden. Nach dem Ablösen der Deckgläser (Trockeneismethode) und dem Entwässern in Alkohol werden die Präparate an der Luft getrocknet und anschließend mit verschiedenen Agenzien (NaOH, Ba(OH)₂, Harnstoff, Ribonuklease, Trichloressigsäure) vorbehandelt. Danach wird in geeigneten Puffergemischen (SSC, McIlvaine-Puffer, Sörensen-Phosphatpuffer) inkubiert und anschließend mit gepufferter Giemsa-Lösung gefärbt.

2.3. Hypothesen über den Mechanismus der unterschiedlichen Giemsa-Färbung von Eu- und Heterochromatin

Die molekulare Grundlage der unterschiedlichen Giem-

sa-Färbung von Eu- und Heterochromatin ist weitgehend unbekannt. Zur Zeit werden folgende Hypothesen diskutiert:

Denaturierung und spezifische Renaturierung von repetitiven DNA-Sequenzen

Durch Hybridisierung mit markierter Nukleinsäure gelang es Pardue und Gall (1970), in den C-Banden der Maus die Satelliten-DNA zu lokalisieren, die sich durch einen besonders hohen Gehalt an repetitiven DNA-Sequenzen auszeichnet. Britten und Kohne (1968) konnten zeigen, daß diese Satelliten-DNA unter geeigneten Bedingungen schneller renaturiert als die übrige DNA. Auch für andere heterochromatische Chromosomenabschnitte konnte ein hoher Anteil an repetitiven DNA-Sequenzen nachgewiesen werden. Verschiedene Autoren (Arrighi und Hsu 1971a, 1971b; Schnedl 1971; Evans et al. 1971) vertreten die Auffassung, daß Denaturierung und spezifische Renaturierung von repetitiven DNA-Sequenzen die unterschiedliche Giemsa-Färbung von Eu- und Heterochromatin hervorruft. Diese Hypothese setzt voraus, daß die Farbstoffkomponenten der Giemsa-Lösung eine besondere Affinität gegenüber renaturierter Doppelstrang-DNA aufweisen.

Comings et al. (1973) konnten zeigen, daß die DNA in centromerischem Heterochromatin in einer kürzeren Zeit (20 s) renaturiert als die DNA in den Chromosomenarmen (3 bis 5 min). Weiterhin konnte jedoch für native, denaturierte und renaturierte DNA sowohl intensive als auch schwache Giemsa-Färbung nachgewiesen werden.

Cullis und Schweizer (1974) untersuchten den DNA-Gehalt von verschiedenen *Anemone*-Arten und verglichen ihn mit dem Gehalt an repetitiven DNA-Sequenzen und der Menge an Giemsa-positivem Heterochromatin. Es zeigte sich, daß der Gehalt an repetitiven DNA-Sequenzen (zwischen 53 und 67 Prozent) weder mit dem DNA-Gehalt pro Zelle noch mit der Anzahl und Größe der Giemsa-Banden korreliert ist.

Weitere Einwände gegen diese Hypothese ergaben sich durch Arbeiten über die unterschiedliche Färbung von Doppelstrang- und Einzelstrang-DNA mit Acridinorange. Stockert und Lisanti (1972) konnten mit zunehmender Renaturierungsdauer keine adäquate Zunahme in der Anzahl und Größe der Giemsa-Banden feststellen. Auch bewirkt die Nachfixierung mit Formaldehyd den Verlust der differentiellen Giemsa-Färbung, obwohl weiterhin De- und Renaturierungsvor-

gänge beobachtet werden konnten. Diese Beobachtungen zeigen, daß De- und Renaturierungsvorgänge, wenn überhaupt, nur einen geringen Einfluß auf die spezifische Giemsa-Färbung von heterochromatischen Chromosomensegmenten ausüben.

Selektive Extraktion von DNA

Comings et al. (1973) konnten bei den verschiedenen C-Banden-Techniken sowohl bei der Alkali-Behandlung als auch bei der Inkubation in SSC eine starke Extraktion von DNA beobachten (insgesamt bis zu 81 Prozent). Biochemische und elektronenmikroskopische Befunde zeigen, daß diese DNA vorwiegend aus den Chromosomenarmen extrahiert wird, während die centromerische DNA weitgehend gegen Extraktion geschützt ist. Im Gegensatz dazu wird bei den meisten G-Banden-Techniken weniger als 9 Prozent der chromosomalen DNA extrahiert. Gegen die selektive Extraktion von DNA als Ursache der unterschiedlichen Giemsa-Färbung von Eu- und Heterochromatin spricht jedoch die Beobachtung, daß auch nach der Behandlung mit Trypsin Giemsa-Banden beobachtet werden konnten, obwohl bei dieser Technik nur eine sehr geringe Extraktion von DNA (1,3 Prozent) zu verzeichnen war.

Spezifische Wechselwirkungen zwischen DNA und chromosomalen Proteinen

Nach der Behandlung mit verschiedenen proteolytischen Agenzien lassen sich eu- und heterochromatische Chromosomenabschnitte auf Grund ihrer charakteristischen Giemsa-Färbung unterscheiden, was auf den Einfluß von bestimmten Proteinen bei der differentiellen Giemsa-Färbung hinweist. Nach Comings et al. (1973) handelt es sich dabei vorwiegend um Nicht-Histon-Proteine, da die Histone bei der Säurefixierung und Hydrolyse weitgehend entfernt werden. Weiterhin gibt es Hinweise dafür, daß sowohl quantitative als auch qualitative Unterschiede in der Zusammensetzung der Nicht-Histon-Proteine im Eu- und Heterochromatin bestehen (Frenster 1969; Comings et al. 1973). Durch den bei verschiedenen Behandlungen beobachteten Entzug von bivalenten Kationen, wie Ca^{2+} und Mg^{2+} , könnten diese Proteine im Eu- und Heterochromatin in unterschiedlicher Art und Weise sterisch verändert werden. Dadurch könnte es zu lokalen Änderungen in der Anordnung der Chromatinfibrillen und damit zur Ausbildung von Chromosomen-Banden kommen.

Caspersson et al. (1969) beobachteten nach der Färbung mit Fluorochromen eine starke UV-Fluoreszenz in A/T-reichen DNA-Sequenzen, während in DNA-Sequenzen mit hohem G/C-Gehalt eine verminderte UV-Fluoreszenz festgestellt werden konnte. Die Arbeiten von Comings et al. (1975b) zeigen jedoch, daß auch die Fluoreszenz-Banden eher durch spezifische DNA-Protein-Wechselwirkungen oder durch Unterschiede im DNA-Gehalt als durch Unterschiede in der Basenzusammensetzung der DNA hervorgerufen werden.

Unterschiedlicher Kondensationsgrad der Chromatinfibrillen

Durch Phasenkontrast- und UV-Mikroskopie gelang es McKay (1973) und Marks (1974), ohne Vorbehandlung und Färbung Chromosomen-Banden nachzuweisen, die weitgehend mit den Giemsa-Banden identisch sind.

Nach McKay (1973) sind die Giemsa-Banden Ausdruck einer unterschiedlichen Kondensation von Eu- und Heterochromatin *in vivo*. Die zwischen den einzelnen Banden-Techniken beobachteten Unterschiede im Bandenmuster ließen sich dann durch den modifizierenden Effekt der Vorbehandlungen auf den Kondensationsgrad der Chromatinfibrillen *in situ* erklären. Dabei könnten spezifische Wechselwirkungen zwischen chromosomalen Proteinen und repetitiven DNA-Sequenzen eine hervorragende Rolle spielen.

Auch Comings und Okada (1974) gelangten auf Grund eines Vergleichs zwischen dem G-Bandenmuster mitotischer Metaphase-Chromosomen und dem Chromomerenmuster meiotischer Pachytän-Chromosomen zu der Auffassung, daß die stärkere Kondensation von centromerischem und interkalarem Heterochromatin als Ursache der differentiellen Giemsa-Färbung anzusehen ist.

Eine weitere Bestätigung findet diese Hypothese durch die Arbeiten von Merritt und Burns (1974), die den Einfluß von verschiedenen c-mitotischen Agenzien auf die differentielle Giemsa-Färbung bei *Nicotiana* analysierten. Sie beobachteten zwar einen steigernden Effekt dieser Agenzien auf die unterschiedliche Kondensation von Eu- und Heterochromatin, konnten aber auch in unbehandelten Präparaten diese Unterschiede im Phasenkontrast feststellen.

Die oben genannten Beobachtungen sprechen für diese Hypothese, jedoch müssen weitere Arbeiten zeigen, inwieweit sie aufrecht erhalten werden kann.

3. Beobachtungen zur differentiellen Giemsa-Färbung

3.1. Material und Methoden

Vicia faba: Verschiedene Autoren (Vosa und Marchi 1972; Schweizer 1973; Takehisa und Utsumi 1973; Döbel et al. 1973) untersuchten das Giemsa-Bandenmuster bei *Vicia faba*. Beim Vergleich der verschiedenen Methoden zeigte sich jedoch, daß die beobachteten Banden nur eine geringe Reproduzierbarkeit aufwiesen. Die besten Ergebnisse konnten mit der in einigen Punkten abgeänderten Methode von Schweizer erzielt werden:

1. Samen von *Vicia faba* ('Ackerperle', Ernte 1975) auf feuchtem Perlit ankeimen
2. nach fünf Tagen Primärwurzeln abschneiden und für zwei Stunden mit einer 0,05 %igen Colchicin-Lösung behandeln
3. 3 h fixieren in Äthanol/Eisessig (3:1)
4. 15 - 20 h in 96 %igen Äthanol
5. 5 min Hydrolyse in 0,2 N HCl bei 60 °C
6. 4 h in 10 %iger Pektinase-Lösung bei 37 °C
7. 1 bis 3 h in 45 %iger Essigsäure
8. quetschen in 45 %iger Essigsäure
9. Deckglas absprennen (Trockeneismethode)
10. 5 min in 45 %igen Äthanol
11. 5 min in 96 %igen Äthanol
12. lufttrocknen (ca. 72 h)
13. 1 h inkubieren in McIlvaine-Puffer pH 7,2 bei 65 °C
14. 3 mal 3 min waschen in aq. dest.
15. 5 min in 45 %igen Äthanol
16. 5 min in 96 %igen Äthanol
17. lufttrocknen (ca. 24 h)
18. 10 bis 15 min färben in 2 %iger Giemsa-Lösung (Merck Art 9204 verdünnt mit Sörensen-Phosphatpuffer pH 7,2)
19. 1 min waschen in aq. dest.
20. lufttrocknen (ca. 1 h)
21. differenzieren in Xylol (ca. 12 h)
22. lufttrocknen (ca. 1 h)
23. einbetten in Euparal

McIlvaine-Puffer pH 7,2: 2,75 g Zitronensäure-mono-hydrat + 62,25 g Na₂HPO₄ × 12 H₂O/L aq. dest.
Sörensen-Phosphatpuffer pH 7,2: 8,62 g Na₂HPO₄ × 2 H₂O + 2,49 g KH₂PO₄/L aq. dest.

Allium cepa: Zwiebeln von *Allium cepa* wurden auf feuchtem Perlit angekeimt. Nach fünf bis acht Tagen wurden die Wurzeln abgeschnitten und für zwei Stunden mit einer 0,05 %igen Colchicin-Lösung behandelt. Die Weiterbehandlung erfolgte nach der von Singh und Lelley (1975) modifizierten Technik von Gill und Kimber (1974a), die sich durch relative Einfachheit auszeichnet und gut reproduzierbare Ergebnisse liefert, und nach der bei *Vicia faba* beschriebene Methode.

Paeonia tenuifolia: Zur Analyse der differentiellen Giemsa-Färbung in den meiotischen Chromosomen von *Paeonia tenuifolia* wurden die Pollenmutterzellen aus den Antheren präpariert. Die Färbung erfolgte nach der Methode von Singh und Lelley (1975), mit der die besten Ergebnisse erzielt werden konnten.

3.2. Ergebnisse und Diskussion

Vicia faba: *Vicia faba* besitzt fünf akrocentrische Chromosomenpaare und ein metacentrisches Chromosomenpaar, das den Nukleolus-Organisator enthält. In allen Chromosomen konnten charakteristische Giemsa-Banden beobachtet werden. Die mitotischen Metaphase-

Chromosomen lassen sich auf Grund des Giemsa-Bandenmusters in vier Gruppen einteilen (Abb. 1a u. b):

1. das Satellitenchromosomenpaar mit fünf scharf voneinander abgegrenzten Banden: eine im centromerischen Chromatin, zwei im Sat-Chromosomenarm in der Nähe des Centromers, eine im Bereich des Nukleolus-Organisators und eine im anderen Chromosomenarm in der Nähe des Centromers,
2. drei Chromosomenpaare mit einer Bande in der Mitte des langen Arms,
3. ein Chromosomenpaar mit einer starken und einer schwachen Bande in der Mitte des langen Arms,
4. ein Chromosomenpaar mit drei Banden im centromer-nahen bis mittleren Abschnitt des langen Arms.

Auch in den weitgehend entspiralisierten Prophase-Chromosomen konnten zahlreiche Chromosomensegmente mit intensiver Giemsa-Färbung beobachtet werden, deren Zahl mit zunehmendem Kondensationsgrad der Chromosomen abnimmt. Die Interphase-Kerne enthalten stark gefärbte Chromocentren von unterschiedlicher Anzahl und Größe (Abb. 4a).

Nach einer geringfügigen Änderung der oben beschriebenen Technik (bei Punkt 10., 11., 15. und 16. statt 5 min nur 2 min entwässern in Alkohol und Reduzierung der Färbedauer auf 8 bis 10 min) weisen vorwiegend die Centromere und das mit dem Nukleolus-Organisator assoziierte Chromatin des Satelliten-Chromosoms eine intensive Giemsa-Färbung auf (Abb. 1c).

Die beobachteten Chromosomenabschnitte mit starker Giemsa-Färbung sind weitgehend mit den von anderen Autoren beschriebenen Giemsa-Banden identisch. Keine der bisher bekannten Giemsa-Techniken ermöglicht jedoch den Nachweis aller bei *Vicia faba* beobachteten Giemsa-Banden. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Methoden treten besonders bei der differentiellen Giemsa-Färbung im Bereich des Nukleolus-Organisators und im centromerischen Chromatin hervor. So konnte in Übereinstimmung mit Vosa und Marchi (1972), Takehisa und Utsumi (1973) sowie Döbel et al. (1973) im Bereich des Nukleolus-Organisators eine starke Bande beobachtet werden, während Schweizer (1973) in diesem Chromosomensegment keine intensive Giemsa-Färbung feststellen konnte. Schweizer und Döbel et al. konnten im centromerischen Chromatin von *Vicia faba* keine Giemsa-Banden lokalisieren. Nach der oben beschriebenen Technik weisen jedoch auch die Centromere eine intensive Giemsa-Färbung auf. Auch die Methode von Takehisa und Ut-

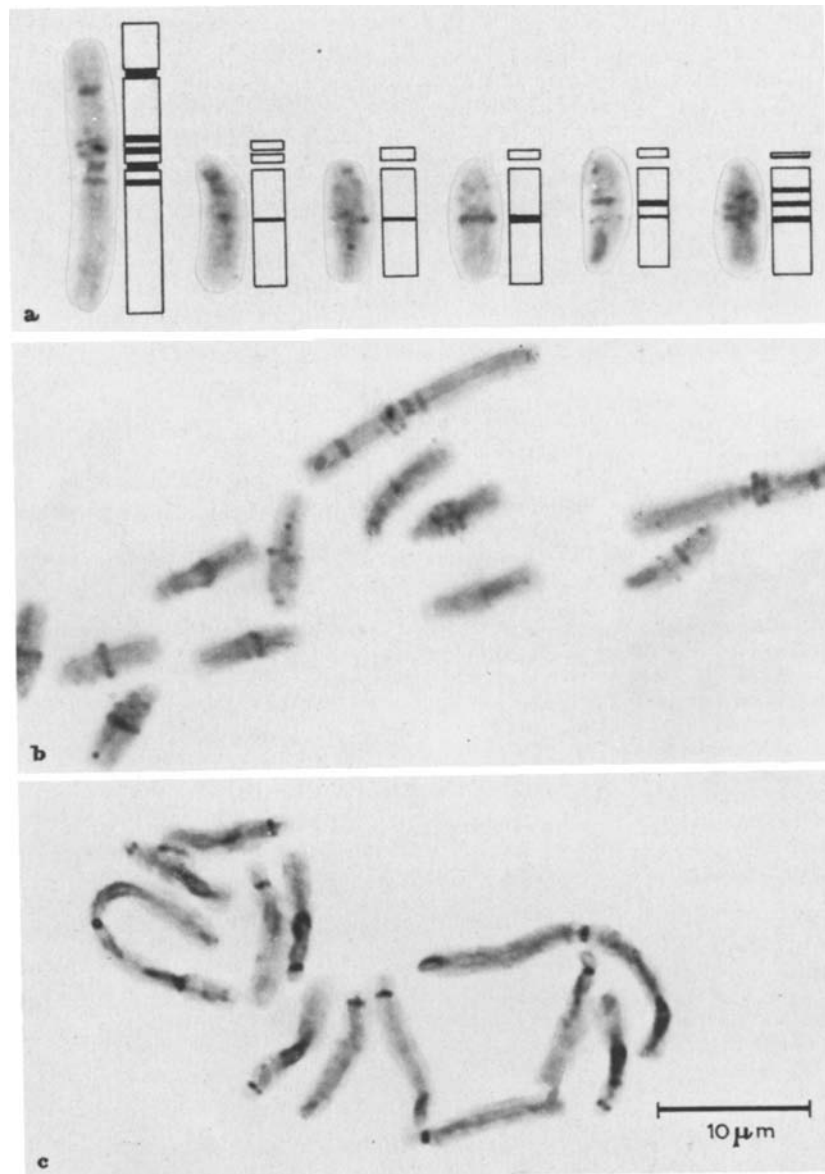


Abb.1. *Vicia faba*; a) Karyotyp mit G-Banden; b) mitotische Metaphase mit G-Banden; c) mitotische Metaphase mit C-Banden

sumi gestattet u. a. eine spezifische Giemsa-Färbung von centromerischem Chromatin.

Die meisten Giemsa-Banden entsprechen den von Heitz (1935) bei *Vicia faba* beschriebenen heterochromatischen Chromosomensegmenten. Autoradiographische Untersuchungen (Evans 1964; Lima-de-Faria 1969) zeigen, daß Chromosomenabschnitte mit intensiver Giemsa-Färbung auch eine späte DNA-Replikation und nach der Färbung mit Fluorochromen eine charakteristische UV-Fluoreszenz aufweisen (Caspersson et al. 1969; Vosa 1970).

Trotz zahlreicher Versuche konnten in den meiotischen Chromosomen von *Vicia faba* keine Giemsa-Banden beobachtet werden. Die unterschiedliche Giemsa-Färbung von heterochromatischen Chromosomensegmenten in der Mitosis und Meiosis von *Vicia faba* deutet auf eine besondere Struktur des Heterochromatins bei dieser Art hin.

Allium cepa: Nach Anwendung der Methode von Singh und Lelley (1975) konnten ausschließlich in den terminalen Chromosomensegmenten der acht metacentrischen bis submetacentrischen Chromosomenpaare mehr oder

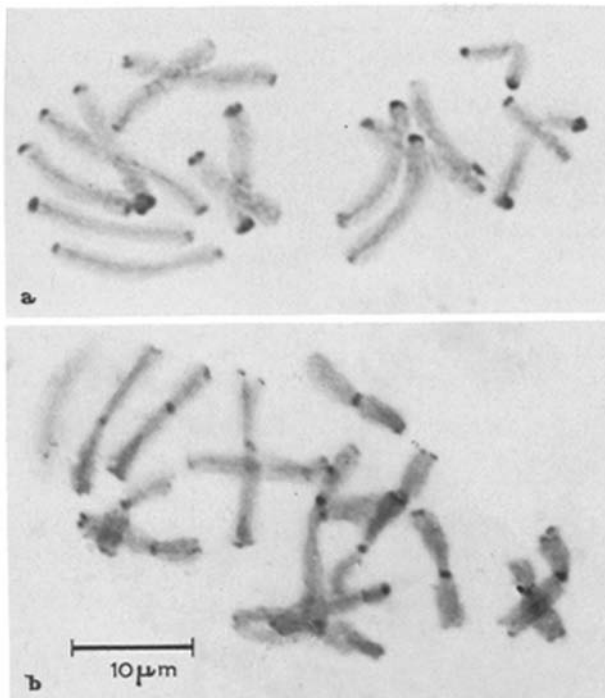


Abb.2. *Allium cepa*; a) mitotische Metaphase mit G-Banden; b) mitotische Metaphase mit G- und C-Banden

weniger starke Giemsa-Banden beobachtet werden (Abb. 2a). Eine intensive Giemsa-Färbung weisen auch die Chromocentren in den Interphase-Kernen auf (Abb. 4b).

Auch nach der bei *Vicia faba* beschriebenen Methode konnten zunächst nur in den terminalen Chromosomenabschnitten Giemsa-Banden beobachtet werden. Nach der Modifizierung dieser Technik (5. 5 min Hydrolyse in 0,1 N HCl bei 60°C; 6. keine Pektinase-Behandlung; 10., 11., 15. und 16. 2 min entwässern in 96 % igen Äthanol; 12. ca. 14 Tage lufttrocknen; 18. 10 min färben in 2 % iger Giemsa-Lösung) zeigen jedoch neben den telomerischen Chromosomenabschnitten auch

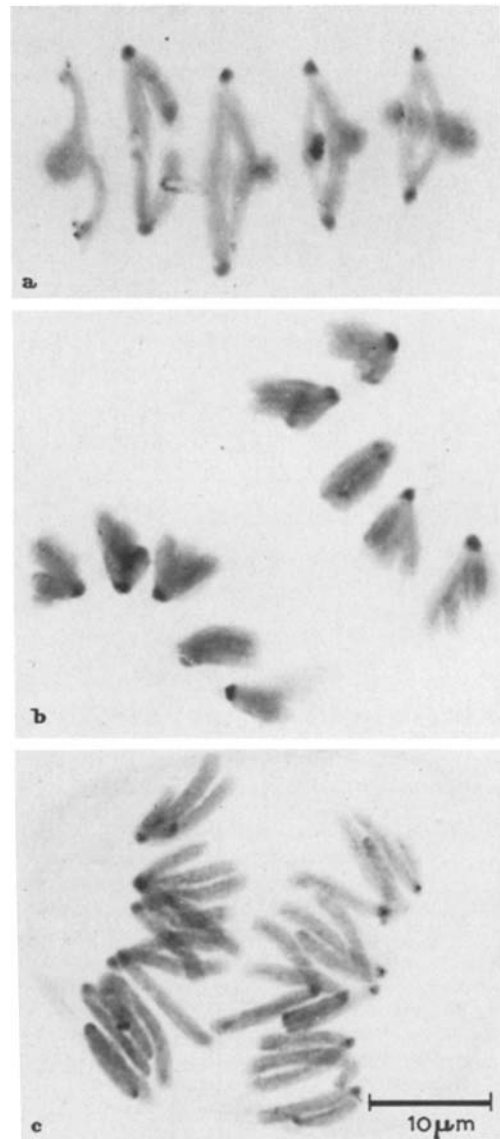


Abb.3. *Paeonia tenuifolia* ; a) meiotische Metaphase I; b) meiotische Anaphase I; c) mitotische Anaphase

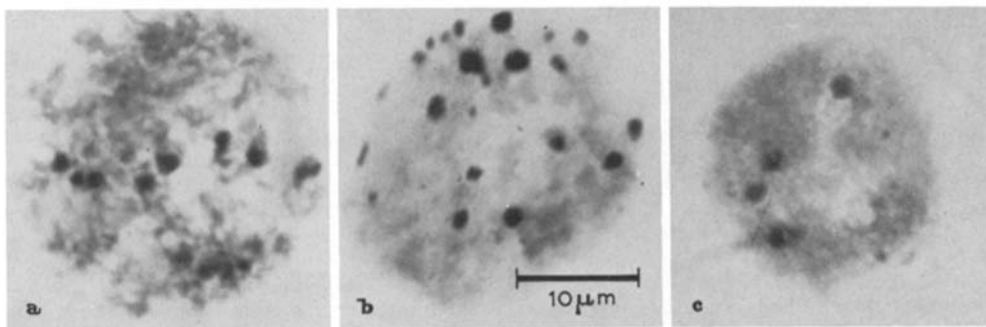


Abb.4. Interphase-Kerne mit Chromocentren; a) *Vicia faba*; b) *Allium cepa*; c) *Paeonia tenuifolia*

die Centromere eine intensive Giemsa-Färbung (Abb. 2b). Weiterhin konnte in einigen Fällen auch im Bereich des Nukleolus-Organisators eine schwache Giemsa-Bande beobachtet werden.

Die beobachteten Chromosomensegmente mit differentieller Giemsa-Färbung zeigen eine große Übereinstimmung mit den von Stack und Clarke (1973a, 1973b), Stack (1974), Fiskesjö (1974b) und El-Gadi und Elkington (1975) beschriebenen Giemsa-Banden. Die von Greilhuber (1974) entwickelte Karmin-Banden-Technik und die Färbung mit Fluorochromen (Vosa 1970) ermöglicht nur die spezifische Färbung der terminalen Chromosomenabschnitte. Dagegen konnten mit Hilfe von autoradiographischen Methoden sowohl in telomerischem als auch in centromerischem Chromatin spät replizierende DNA-Sequenzen nachgewiesen werden.

Paeonia tenuifolia: *Paeonia tenuifolia* besitzt fünf Chromosomenpaare. Sowohl in den meiotischen (Abb. 3a und 3b) als auch in den mitotischen Chromosomen (Abb. 3c) weisen die Centromere eine intensive Giemsa-Färbung auf. Neben diesen centromerischen Banden zeigen zwei Chromosomenpaare eine terminale Bande in einem Chromosomenarm. Auch bei *Paeonia tenuifolia* konnten in den Interphase-Kernen stark gefärbte Chromocentren beobachtet werden (Abb. 4c).

Danksagung.

Frau Prof: Dr. G. Linnert danke ich für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung der Arbeit; für die freundliche Beratung hinsichtlich methodischer Fragen bin ich den Herren Dr. R. J. Singh und Dr. T. Lelley zu großem Dank verpflichtet.

Literatur

- Arrighi, F.E.; Hsu, T.C.: Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics* **10**, 81-86 (1971a)
- Arrighi, F.E.; Hsu, T.C.: Distribution of constitutive heterochromatin in mammalian chromosomes. *Chromosoma (Berl.)* **34**, 243-253 (1971b)
- Ayonoadu, U.; Rees, H.: DNA synthesis in rye chromosomes. *Heredity* **30**, 233-240 (1973)
- Baker, W.K.: Crossing over in heterochromatin. *Am. Nat.* **XCII**, 59-60 (1958)
- Barigozzi, C.; Di Pasquale, A.: Heterochromatic and euchromatic genes acting on quantitative characters in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* **7**, 389-399 (1953)
- Britten, R.J.; Kohne, D.E.: Repeated sequences in DNA. *Science* **161**, 529-540 (1968)
- Caspersson, T.; Farber, S.; Foley, G.E.; Kudynowski, J.; Modest, E.J.; Simonsson, E.; Wagh, U.; Zech, L.: Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exptl. Cell Res.* **49**, 219-222 (1968)
- Caspersson, T.; Zech, L.; Modest, E.J.; Foley, G.E.; Wagh, U.; Simonsson, E.: Chemical differentiation with fluorescent alkylating agents in *Vicia faba* metaphase chromosomes. *Exptl. Cell Res.* **58**, 128-140 (1969)
- Chen, T.R.; Ruddle, F.H.: Karyotype analysis utilizing differentially stained constitutive heterochromatin of human and murine chromosomes. *Chromosoma (Berl.)* **34**, 51-72 (1971)
- Comings, D.E.; Avelino, E.; Okada, T.A.; Wyandt, H.E.: The mechanism of C- and G-banding of chromosomes. *Exptl. Cell Res.* **77**, 469-493 (1973)
- Comings, D.E.; Okada, T.A.: Mechanisms of chromosome banding. III. Similarity between G-bands of mitotic chromosomes and chromomeres of meiotic chromosomes. *Chromosoma (Berl.)* **48**, 65-71 (1974)
- Comings, D.E.: Mechanisms of chromosome banding. IV. Optical properties of the Giemsa dyes. *Chromosoma (Berl.)* **50**, 89-110 (1975a)
- Comings, D.E.; Kovács, B.W.; Avelino, E.; Harris, D.C.: Mechanisms of chromosome banding. V. Quinacrine banding. *Chromosoma (Berl.)* **50**, 111-145 (1975b)
- Cullis, C.A.; Schweizer, D.: Repetitious DNA in some *Anemone* species. *Chromosoma (Berl.)* **44**, 417-421 (1974)
- Darlington, C.D.; Haque, A.: Organisation of DNA synthesis in rye chromosomes. *Chromosomes Today* **1**, 102-107 (1966)
- Darvey, N.L.; Gustafson, J.P.: Identification of rye chromosomes in wheat-rye addition lines and *Triticale* by heterochromatin bands. *Crop Sci.* **15**, 239-243 (1975)
- Döbel, P.; Rieger, R.; Michaelis, A.: The Giemsa banding patterns of the standard and four reconstructed karyotypes of *Vicia faba*. *Chromosoma (Berl.)* **43**, 409-422 (1973)
- El-Gadi, A.; Elkington, T.T.: Comparison of the Giemsa C-band karyotypes and the relationship of *Allium cepa*, *A. fistulosum* and *A. galanthum*. *Chromosoma (Berl.)* **51**, 19-23 (1975)
- Evans, J.H.: Uptake of ³H-thymidine and patterns of DNA replication in nuclei and chromosomes of *Vicia faba*. *Exptl. Cell Res.* **35**, 381-393 (1964)
- Evans, J.H.; Buckton, K.E.; Sumner, A.T.: Cytological mapping of human chromosomes: Results obtained with quinacrine fluorescence and the acetate-saline-Giemsa technique. *Chromosoma (Berl.)* **35**, 310-325 (1971)
- Fabergé, A.C.: Snail stomach cytase, a new reagent for plant cytology. *Stain Technology* **20**, 1-4 (1945)
- Filion, W.G.: Differential Giemsa staining in plants. I. Banding patterns in three cultivars of *Tulipa*. *Chromosoma (Berl.)* **49**, 51-60 (1974)
- Fiskesjö, G.: C-banded male meiotic chromosomes of *Acheta domestica*. *Hereditas (Lund)* **76**, 157-160 (1974a)
- Fiskesjö, G.: Two types of constitutive heterochromatin made visible in *Allium* by a rapid C-banding method. *Hereditas (Lund)* **78**, 153-156 (1974b)
- Fox, D.P.; Carter, K.C.; Hewitt, G.M.: Giemsa banding and chiasma distribution in the desert locust. *Heredity* **31**, 272-276 (1973)
- Frenster, J.H.: Biochemistry and molecular biophysics of heterochromatin and euchromatin. *Handbook of Molecular Cytology*, 253-276. Amsterdam: North Holland Comp. 1969
- Fussell, C.P.: The position of interphase chromosomes and late replicating DNA in centromere and telomere regions of *Allium cepa* L. *Chromosoma (Berl.)* **50**, 201-210 (1975)

- Ganner, E.; Evans, H.J.: The relationship between patterns of DNA replication and of quinacrine fluorescence in the human chromosome complement. *Chromosoma (Berl.)* **35**, 326-341 (1971)
- Gill, B.S.; Kimber, G.: A Giemsa-C-banding technique for cereal chromosomes. *Cereal Res. Comm.* **2**, 87-94 (1974a)
- Gill, B.S.; Kimber, G.: The Giemsa C-banded karyotype of rye. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **71**, 1247-1249 (1974b)
- Greilhuber, J.: Hy-banding: A new quick technique for heterochromatin staining in plant chromosomes. *Naturwiss.* **61**, 170-172 (1974)
- Hadlaczký, G.J.; Belea, A.: C-banding in wheat evolutionary cytogenetics. *Plant Sci. Letters* **4**, 85-88 (1975)
- Hansen-Melander, E.; Melander, Y.; Olin, M.L.: Chromosome preparation by air drying at low temperature and Giemsa banding procedures. *Hereditas (Lund)* **76**, 35-40 (1974)
- Heitz, E.: Chromosomenstruktur und Gene. *Z. Ind. Abst. Vererbgs.* **70**, 402-447 (1935)
- Kato, H.; Moriwaki, K.: Factors involved in the production of banded structures in mammalian chromosomes. *Chromosoma (Berl.)* **38**, 105-120 (1972)
- Lima-de-Faria, A.: Differential uptake of tritiated thymidine into hetero- and euchromatin of *Melanoplus* and *Secale*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **6**, 457-466 (1959)
- Lima-de-Faria, A.: DNA replication and gene amplification in heterochromatin. *Handbook of Molecular Cytology*, 277-325. Amsterdam: North Holland Comp. 1969
- Linnert, G.: Die Struktur der Pachytänchromosomen in Euchromatin und Heterochromatin und ihre Auswirkung auf die Chiasmabildung bei *Salvia*-Arten. *Chromosoma (Berl.)* **7**, 90-128 (1955)
- Marks, G.E.; Schweizer, D.: Giemsa banding: Karyotype differences in some species of *Anemone* and in *Hepatica nobilis*. *Chromosoma (Berl.)* **44**, 405-416 (1974)
- Marks, G.E.: Giemsa banding of meiotic chromosomes in *Anemone blanda* L. *Chromosoma (Berl.)* **49**, 113-119 (1974)
- McKay, R.D.G.: The mechanism of G and C banding in mammalian metaphase chromosomes. *Chromosoma (Berl.)* **44**, 1-14 (1973)
- McKenzie, W.H.; Lubs, H.A.: An analysis of the technical variables in the production of C bands. *Chromosoma (Berl.)* **41**, 175-182 (1973)
- Merker, A.: A Giemsa technique for rapid identification of chromosomes in *Triticale*. *Hereditas (Lund)* **75**, 280-282 (1973)
- Merrick, S.; Ledley, R.S.; Lubs, H.A.: Production of G and C banding with progressive trypsin treatment. *Pediat. Res.* (1973)
- Merritt, J.F.; Burns, J.A.: Chromosome banding in *Nicotiana glauca* without denaturation and renaturation. *J. Hered.* **65**, 101-103 (1974)
- Natarajan, A.T.; Ahnström, G.: Heterochromatin and chromosome aberrations. *Chromosoma (Berl.)* **28**, 48-61 (1969)
- Natarajan, A.T.; Natarajan, S.: The heterochromatin of *Rhoeo discolor*. *Hereditas (Lund)* **72**, 323-330 (1972)
- Pardue, M.L.; Gall, J.G.: Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science* **168**, 1356-1358 (1970)
- Rodman, T.C.; Thahiliani, S.: The Feulgen banded karyotype of the mouse: Analysis of the mechanisms of banding. *Chromosoma (Berl.)* **42**, 37-56 (1973)
- Sarma, N.P.; Natarajan, A.T.: Identification of heterochromatic regions in the chromosomes of rye. *Hereditas (Lund)* **74**, 233-238 (1973)
- Schnedl, W.: Analysis of the human karyotype using a reassociation technique. *Chromosoma (Berl.)* **34**, 448-454 (1971)
- Schweizer, D.: Differential staining of plant chromosomes with Giemsa. *Chromosoma (Berl.)* **40**, 307-320 (1973)
- Seabright, M.: The use of proteolytic enzymes for the mapping of structural rearrangements in the chromosomes of man. *Chromosoma (Berl.)* **36**, 204-210 (1972)
- Shiraishi, Y.; Yosida, T.H.: Banding pattern analysis of human chromosomes by use of a urea treatment technique. *Chromosoma (Berl.)* **37**, 75-83 (1972)
- Singh, R.J.; Lelley, T.: Giemsa banding in meiotic chromosomes of rye, *Secale cereale* L. *Z. Pflanzenzüchtg.* **75**, 85-89 (1975)
- Stack, S.M.; Clarke, C.R.: Pericentromeric chromosome banding in higher plants. *Can. J. Genet. Cytol.* **15**, 367-369 (1973a)
- Stack, S.M.; Clarke, C.R.: Differential Giemsa staining of the telomeres of *Allium cepa* chromosomes: Observations related to chromosome pairing. *Can. J. Genet. Cytol.* **15**, 619-624 (1973b)
- Stack, S.M.: Differential Giemsa staining of kinetochores and nucleolus organizer heterochromatin in mitotic chromosomes of higher plants. *Chromosoma (Berl.)* **47**, 361-378 (1974)
- Stockert, J.C.; Lisanti, J.A.: Acridine-orange differential fluorescence of fast- and slow-reassociating chromosomal DNA after in situ DNA denaturation and reassociation. *Chromosoma (Berl.)* **37**, 117-130 (1972)
- Sumner, A.T.: A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exptl. Cell Res.* **75**, 304-306 (1972)
- Takehisa, S.; Utsumi, S.: Visualization of metaphase heterochromatin in *Vicia faba* by the denaturation-renaturation Giemsa staining method. *Experientia* **29/1**, 120-121 (1973)
- Verma, S.C.; Rees, H.: Giemsa staining and the distribution of heterochromatin in rye chromosomes. *Heredity* **32**, 118-123 (1974)
- Vosa, C.G.: Heterochromatin recognition with fluorochromes. *Chromosoma (Berl.)* **30**, 366-371 (1970)
- Vosa, C.G.; Marchi, P.: Quinacrine fluorescence and Giemsa staining in plants. *Nature New Biol.* **237**, 191-192 (1972)
- Vosa, C.G.: The basic karyotype of rye (*Secale cereale*) analysed with Giemsa and fluorescence methods. *Heredity* **33**, 403-408 (1974)
- Weimarck, A.: Elimination of wheat and rye chromosomes in a strain of octoploid *Triticale* as revealed by Giemsa banding technique. *Hereditas (Lund)* **77**, 281-286 (1974)
- Weimarck, A.: Heterochromatin polymorphism in the rye karyotype as detected by the Giemsa C-banding technique. *Hereditas (Lund)* **79**, 293-300 (1975)
- Yunis, J.J.; Sanchez, O.: G-banding and chromosome structure. *Chromosoma (Berl.)* **44**, 15-23 (1973)

Eingegangen am 5. Dezember 1975

Angenommen durch H. Stubbe

Dipl. Biol. B. Friebe,
Institut für Angewandte Genetik der Freien
Universität Berlin,
Albrecht-Thaer-Weg 6
1 Berlin 33 (West)