

ANDRZEJ JOACHIMIAK

METODY RÓŻNICOWEGO BARWIENIA CHROMOSOMÓW

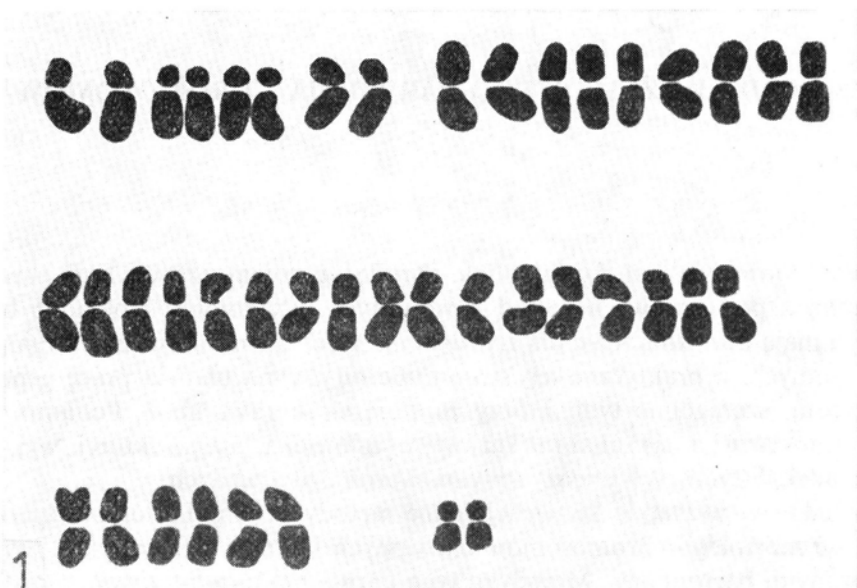
Wstęp

Analiza kariotypu jest dzisiaj obok określenia somatycznych liczb chromosomów jedną z podstawowych metod stosowanych w cytologii. Dokładne badania kariotypu mają duże znaczenie dla zrozumienia mechanizmów ewolucji organizmów eukariotycznych, a praktyczne ich stosowanie od dawna ułatwia pracę genetykom i hodowcom, szczególnie tym, którzy zajmują się uprawą zbóż. Ponadto bardzo dynamicznie rozwija się analiza kariotypu człowieka, dzięki której wyjaśniono wiele zagadek dotyczących między innymi chorób dziedzicznych.

Do niedawna wszystkie konwencjonalne metody analizy kariotypu oparte były na analizie morfologii chromosomów barwionych kilku podstawowymi, powszechnie używanymi barwnikami. Metodyka tych barwień składa się z dwóch podstawowych etapów — stosunkowo prostego traktowania wstępnego mającego najczęściej na celu najdogodniejsze dla dalszych badań przykurczenie chromosomów i nagromadzenie metafaz w przeznaczonym do analizy materiale, oraz na właściwym barwieniu jednym z szeroko stosowanych barwników. W niektórych badaniach stosowano jeszcze dodatkowo macerację materiału w stopniu umożliwiającym wykonanie rozgniotów (tkanki roślinne). Barwienie tego typu daje niezależnie od użytego barwnika efekt jednolitego wybarwienia chromosomów prawie na całej ich długości. Jedyne strefy przewężeń pierwotnych (centromerów) i wtórnych (organizatorów jąderek) pozostają niewybarwione lub słabo wybarwione. Ich położenie w obrębie chromosomów stanowi obok całkowitej długości chromosomów podstawowe kryterium klasyfikacji typów morfologicznych chromosomów w obrębie badanego kompleksu.

W przypadku szerokiej skali zróżnicowania chromosomów w obrębie kompleksu metody te umożliwiają przeprowadzenie analizy kariotypu z zadowalającymi wynikami, w wielu jednak przypadkach zawodzą. Tak na przykład u wielu gatunków występują duże grupy chromosomów tak bardzo do siebie zbliżonych, zarówno pod względem długości jak i położenia centromeru, że identyfikacja poszczególnych

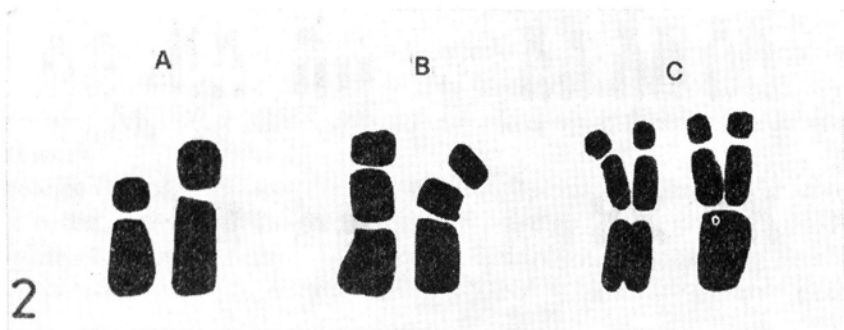
par chromosomów (lub grup chromosomów homologicznych w przypadku poliploidów) w materiale barwionym konwencjonalnymi metodami napotyka wielkie trudności (ryc. 1). Skąpa liczba punktów orientacyjnych w obrębie chromosomu dostępnych obserwacji mikroskopowej utrudnia, a niejednokrotnie nawet uniemożliwia zaobserwowanie drobniejszych zmian w kariotypie, mimo iż zmiany te mogą odgrywać dużą rolę w ewolucji. Duże trudności przedstawia również przy konwencjonalnej analizie kariotypu sprawa pochodzenia kompleksów chromosomowych gatunków poliploidalnych i form mieszańcowych oraz ewolucji kariotypu w obrębie grup gatunków blisko ze sobą spokrewnionych.



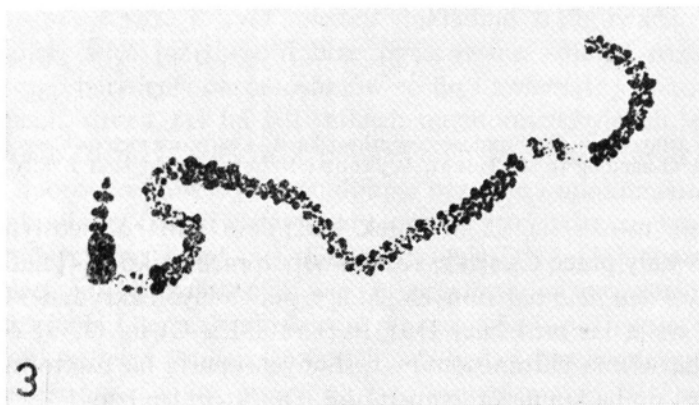
Ryc. 1. *Phleum pratense*, $2n = 42$; Chromosomy barwione orceiną octową

Dodatkowym aspektem utrudniającym wyciąganie wniosków natury ewolucyjnej na podstawie analizy kariotypu prowadzonej konwencjonalnymi metodami jest wielokrotnie stwierdzony fakt nierównomiernej kontrakcji chromosomów homologicznych w obrębie jednej płytki metafazowej (ryc. 2). W związku z tym analiza kariotypu przeprowadzona być może jedynie na podstawie pomiarów wielu płytek metafazowych, a jej wyniki przedstawiane są w postaci wartości średnich. Często nie ułatwia to wcale identyfikacji poszczególnych typów chromosomowych w konkretnym preparacie.

Do niedawna istniała tylko jedna metoda badań kariotypu oparta na analizie wewnętrznej struktury chromosomów — metoda wyznaczania wzorów chromomerowych poszczególnych chromosomów w pachytenie, a więc w profazie pierwszego podziału mejotycznego [44, 58, 59]. Przykład wzoru chromomerowego jednego z B-chromosomów żyta przedstawia ryc. 3. Ze względu na duży stopień trudności metoda ta nie znalazła szerokiego zastosowania. Jej podstawowym mankamentem jest znaczna długość chromosomów pachytenowych (szczególnie roślinnych).



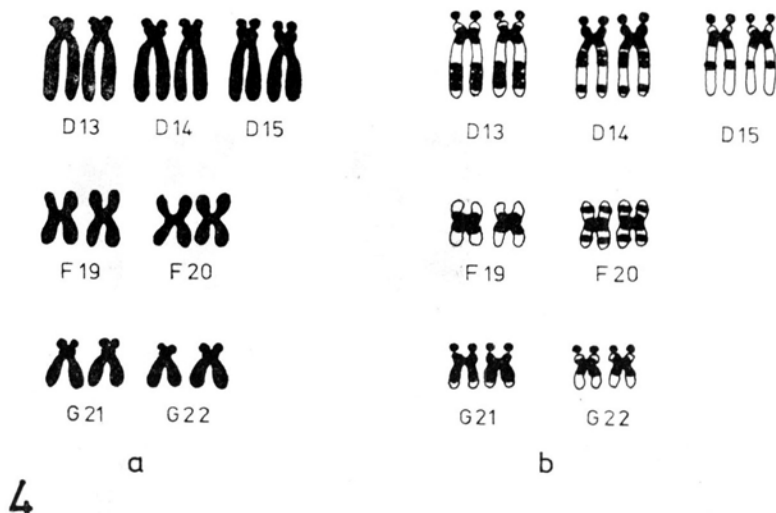
Ryc. 2. Pary wybranych chromosomów homologicznych obserwowanych w obrębie jednej płytki metafazowej. A, B — *Phleum alpinum*, C—*P. Michelii*. Barwione wg Feulgena



Ryc. 3. Struktura chromomerowa pachytenowego bivalentu utworzonego przez standartowe B-chromosomy żyta. Wg Lima-de-Faria, Hereditas 1949

Dokładna analiza morfologii chromosomów możliwa była także w pewnych innych wyjątkowych wypadkach — np. analiza prążków w obrębie chromosomów politenicznych.

W ostatnich latach opracowano, a następnie udoskonalono szereg nowych metod analizy kariotypu. Bazują one na fakcie, że chromatyna organizmów eukariotycznych nie jest frakcją jednorodną, ale jest zróżnicowana strukturalnie, chemicznie i funkcjonalnie. Od dawna dzielono już chromatynę na eu- i heterochromatynę [29]. Ostatnio stwierdzono, że także i w ich obrębie występuje duże zróżnicowanie, które znajduje odbicie w ułożeniu poszczególnych typów chromatyny w obrębie chromosomów i może być wykrywane metodami biochemicznymi i cytologicznymi. Szereg wysoce specyficznych dla określonych typów chromatyny metod barwienia chromosomów umożliwia (w odróżnieniu od metod poprzednio stosowanych) uzyskanie preparatów, w których chromosomy wykazują nierównomierne (różnicowe) zabarwienie. Pewne strefy chromosomów barwią się słabo, inne zaś obserwowane są w formie intensywnie zabarwionych prążków. Poszczególne typy chromosomów, występujące u badanego gatunku, wykazują charakterystyczne ułożenie prążków, co umożliwia dokładne rozróżnienie par (grup) nawet w wypadku, gdy ich identyfikacja nie była możliwa przy użyciu metod klasycznych (ryc. 4).



Ryc 4 a, b. Trzy grupy (D, F, G) chromosomów człowieka: a — barwione metodą klasyczną, b — barwione metodą G-banding (b wg Hecht, Wyandt i Erbe: New England J. Med. 1972)

Powszechnie uważa się, iż początek badaniom nad różnicowym barwieniem chromosomów dały prace Casperssona i współpracowników [4] nad fluorescencją chromosomów *Vicia faba* barwionych jedną z pochodnych akrydyny. Należy jednak zaznaczyć, iż wiele lat wcześniej Darlington i La Cour [8, 9] opisali metodę różnicowego barwienia chromosomów roślinnych opartą na traktowaniu materiału przeznaczanego do badań niską temperaturą. Obiektem ich badań były chromosomy *Trillium* i *Paris*. Metoda ta ujawnia pewne jaśniej zabarwione segmenty w obrębie chromosomów i zostanie dokładniej omówiona w dalszej części niniejszego opracowania. Drugą, stosunkowo wcześniej opracowaną metodą różnicowego barwienia chromosomów jest metoda traktowania materiału gorącymi kwasami. Jej autorem jest Yamasaki, który w 1956 roku [87] zastosował ją w badaniach nad chromosomami *Cypripedium debile* (*Orchidaceae*). Obydwie te metody nie spowodowały jednak przełomu w cytogenetyce i dopiero lata siedemdziesiąte można za okres, w którym metody różnicowego barwienia chromosomów zostały docenione i rozwinięte.

Dzisiaj istnieje już wiele metod różnicowego barwienia różniących się znacznie pod względem traktowania wstępnego chromosomów, używanych barwników oraz samych wyników barwienia. Ponieważ metoda bazująca na wykorzystaniu fluorescencji odpowiednio dobranych fluorochromów wykazuje szereg niedogodności, szybko doszło do opracowania innych metod barwienia opartych na barwnikach niefluorescencyjnych, przede wszystkim na roztworze Giemzy.

Już w 1970 roku Pardue i Gall opublikowali pracę donoszącą o możliwości różnicowego barwienia chromosomów zwierzęcych roztworem Giemzy, po zastosowaniu specjalnie opracowanej metody traktowania wstępnego chromosomów [65]. Obiektem ich badań był kariotyp myszy, a opracowaną przez nich metodykę określa

się dzisiaj powszechnie jako „C-banding”. Od 1972 roku zaczęły się pojawiać doniesienia o możliwości stosowania tej metody w odniesieniu do chromosomów roślinnych [49, 72, 85]. Stwierdzono, iż metodyka ta może znaleźć zastosowanie w analizie jąder interfazowych, szczególnie dotyczy to określania ilości heterochromatyny konstytutywnej.

Równoległe ulepszano metody barwienia fluorescencyjnego chromosomów zwierząt i roślin, przede wszystkim na drodze wprowadzania nowych, do tej pory nie stosowanych fluorochromów, różniących się zarówno jasnością w promieniach UV jak i powinowactwem do różnych frakcji DNA i białek w obrębie chromosomów.

Dyskusja nad mechanizmami różnicowego barwienia chromosomów trwa [2, 5, 12, 31, 52, 54, 55, 88, 89, 90, 91], jednak ze względu na charakter tego artykułu nie może być ona w tym miejscu dokładnie zreferowana.

Obecnie istnieją więc już dwie dobrze opracowane i nadal rozwijane grupy metod różnicowego barwienia chromosomów roślin i zwierząt: jedna z nich bazuje na fluorochromach, druga zaś na barwnikach niefluorescencyjnych, przede wszystkim na roztworze Giemzy. Większość powszechnie dziś stosowanych do barwienia chromosomów fluorochromów wykazuje dobrze poznane i udokumentowane powinowactwo do określonej frakcji chromatyny, przede wszystkim ze względu na proporcje poszczególnych par zasad (AT:GC) w obrębie DNA [55]. Roztwór Giemzy nie wykazuje tego typu specyficzności, więc o specyficzności poszczególnych metod różnicowego barwienia Giemzą wnioskować można jedynie pośrednio, przez porównanie z wynikami barwień fluorescencyjnych lub badań biochemicznych. Ciekawe wyniki daje stosowanie różnych metod na tym samym materiale. Umożliwia ono po pierwsze ustalenie powinowactwa poszczególnych barwień niefluorescencyjnych do określonych frakcji chromatyny, po drugie zaś bardziej szczegółową klasyfikację heterochromatyny występującej w obrębie chromosomów *Eukaryota*.

Ze względu na specyficzne cechy materiału roślinnego — przede wszystkim obecność ścian komórkowych — badania chromosomów roślinnych wyżej wymienionymi metodami napotykać szereg trudności nie występujących w wypadku materiału zwierzęcego. W związku z tym badania te rozwijają się nieco wolniej. Główną trudnością jest otrzymanie obnażonych chromosomów w preparacie, co jest warunkiem koniecznym dla przeprowadzenia barwień roztworem Giemzy z zadowalającymi wynikami. Ponadto pewnych, niezwykle przydatnych metod różnicowego barwienia chromosomów nie udało się przystosować do badań materiału roślinnego. W związku z tym większość badaczy zajmujących się problemami różnicowego barwienia szczególnie wiele uwagi poświęca chromosomom zwierzęcym. Wnioski, które zostały z tych badań wyciągnięte, obowiązują jednak przypuszczalnie w odniesieniu do materiału roślinnego. Nie ma bowiem podstawy po temu, aby uważać, iż pod względem struktury i innych ważnych cech chromosomy roślinne różnią się w sposób zasadniczy od chromosomów zwierzęcych. Stąd też, o ile okaże się to konieczne przy omawianiu poszczególnych metod, odwoływać się będą w tym artykule także do badań nad chromosomami zwierząt.

Metody różnicowego barwienia chromosomów

Metoda traktowania chromosomów niskimi temperaturami

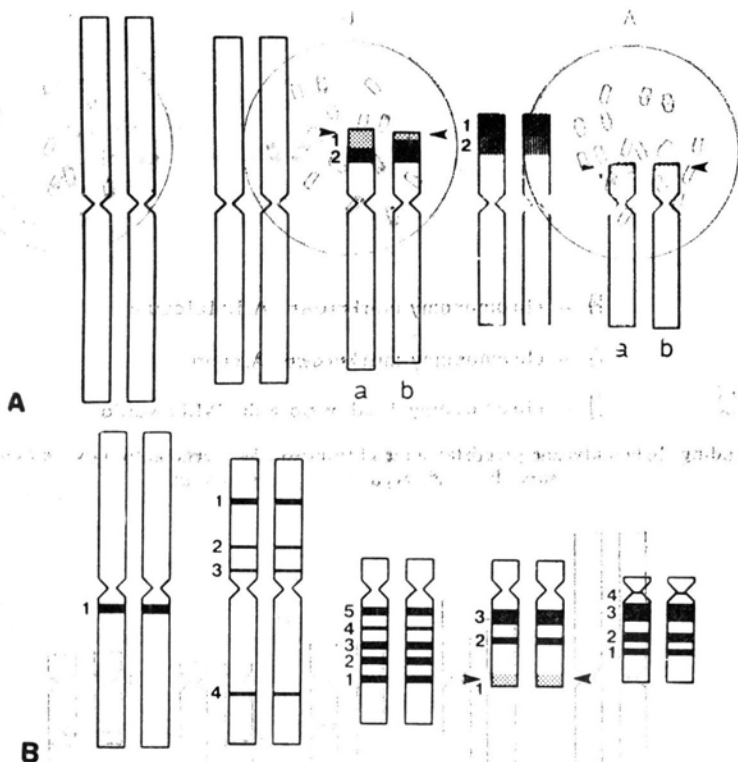
Darlington i La Cour [8, 9] stwierdzili, iż chromosomy *Trillium* i *Paris* traktowane przez pewien czas niską temperaturą (ok. 0°C) wykazują różnicowe zabarwienie po użyciu barwienia metodą Feulgena. Pewne ich segmenty barwią się słabo, mimo iż niczym nie różniły się od pozostałych części chromosomu przy zastosowaniu klasycznych metod barwienia. W tym samym czasie Geitler [17] potwierdził te obserwacje badając chromosomy *Adoxa moschatellina*. Badania późniejsze (dokładniejsze dane: [25]) potwierdziły przydatność tej metody w analizie kariotypu roślin. Stwierdzono, że najczęściej jasno barwiące się segmenty ujawnione przy użyciu tej metody odpowiadają heterochromatynie konstytutywnej barwiącej się C-pozytywnie.

Prążki C (C-banding)

Jest to metoda umożliwiająca identyfikację heterochromatyny konstytutywnej w obrębie chromosomów metafazowych i jąder interfazowych. Została ona po raz pierwszy zastosowana przez Pardue i Gall w 1970 roku [65] w badaniach nad chromosomami myszy. Procedura barwienia opierała się na traktowaniu utrwalo-nych uprzednio chromosomów 0.07N NaOH przez kilka minut, a następnie $2 \times \text{SSC}$ (NaCl+cytrynian sodu) w podwyższonej temperaturze przez kilkanaście godzin. Materiał barwiono roztworem Giemzy. W wyniku tego barwienia wysoko-repetytywny, satelitarny DNA chromosomów myszy, zlokalizowany w okolicach centromerów barwił się bardzo intensywnie dając charakterystyczne prążki. Pozostałe części chromosomów barwiły się słabo. Początkowo sądzono, że rejony silnie barwiące się reprezentują obszary zreasocjowanego, a więc dwuniciowego DNA. Zgodnie z tym referowano technikę C-banding jako specyficzną procedurę opartą na denaturacji (NaOH), a następnie renaturacji ($2 \times \text{SSC}$) DNA. Późniejsze badania wykazały, że wyżej opisany mechanizm nie może być odpowiedzialny za powstawanie C-prążków w obrębie chromosomów [5].

Metodyka C-banding została szybko przystosowana do badań chromosomów roślinnych. Vosa i Marchi [85], Schweizer [72] oraz Marks [49] pierwsi stosowali ją z powodzeniem do barwienia chromosomów roślin. W odróżnieniu od materiału zwierzęcego, u roślin często poza prążkami w okolicach centromerów obserwować można ciemno barwiące się segmenty heterochromatynowe na końcach ramion chromosomów (heterochromatyna telomeryczna) oraz w innych miejscach (heterochromatyna interkalarna) — ryc. 5.

Badania chromosomów roślinnych tą metodą rozwijają się w ostatnich latach bardzo dynamicznie [1, 12, 13, 24, 27, 28, 36, 38, 62, 75, 92, i in.]. Często jednak stwierdza się, że w przypadku, gdy wzory prążkowe chromosomów kompleksu są podobne, jak to ma miejsce u gatunków ubogich w heterochromatynę interkalarną, identy-

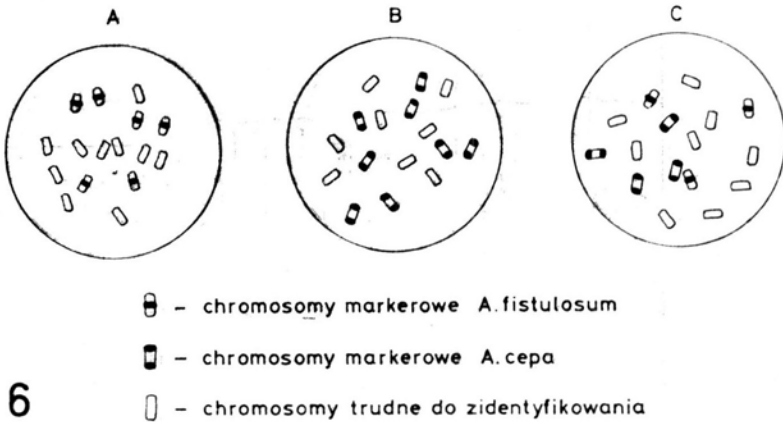


Ryc. 5. C-banding: A — kariotyp *Scilla bisotunensis*, trzy z pięciu par chromosomów posiadają heterochromatynę telomeryczną. B — Kariotyp *Scilla greilhuberi*, wszystkie typy chromosomowe posiadają heterochromatynę interkalarną. Graficzne zróżnicowanie w przedstawieniu poszczególnych prążków oddaje różnice w intensywności ich zabarwienia w preparatach. Wg Greilhubera i Spety: Plant Syst. Evol. 1976

fikacja poszczególnych par w materiale barwionym z zastosowaniem metody C-banding jest bardzo trudna lub nawet niemożliwa [75].

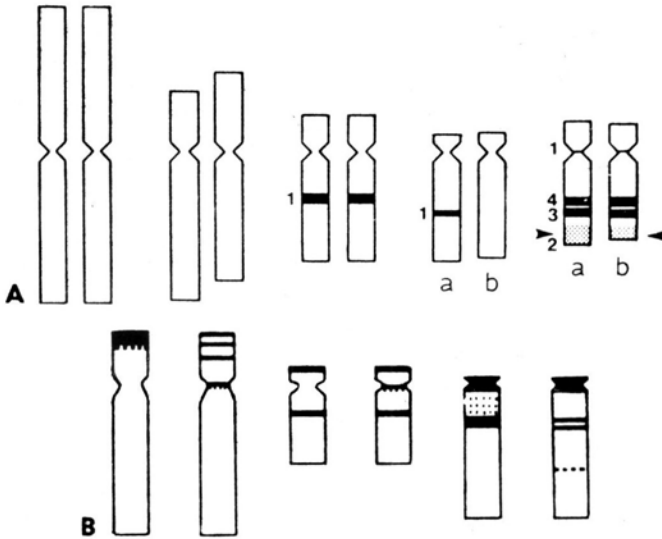
W pewnych, jak do tej pory rzadkich wypadkach stosowanie metodyki C-banding w szczegółowej analizie kariotypu może okazać się jednak niezwykle owocne. Dobrym przykładem są badania Fiskesjö [14] nad pochodzeniem *Allium proliferum*, co do którego istniało podejrzenie, iż jest mieszańcem pomiędzy *A. cepa* a *A. fistulosum*. Podobieństwo morfologiczne chromosomów tych trzech gatunków uniemożliwiło zweryfikowanie tej hipotezy przy zastosowaniu klasycznej analizy kariotypu. Autorka stosując metodę C-banding wyróżniła w obrębie kompleksów chromosomowych hipotetycznych gatunków rodzicielskich chromosomy markerowe charakterystyczne dla wymienionych gatunków: trzy pary w obrębie *A. fistulosum* i cztery w obrębie *A. cepa*. Markery te zostały następnie zidentyfikowane w kariotypie *A. proliferum* (ryc. 6).

Badania chromosomów metafazowych różnych roślin wykazały, że nawet w obrębie jednego gatunku mogą mieć miejsce pewne zmiany zawartości heterochromatyny w obrębie poszczególnych typów chromosomowych. Często obserwuje się heterozygotyczność strukturalną poszczególnych osobników pod względem



6

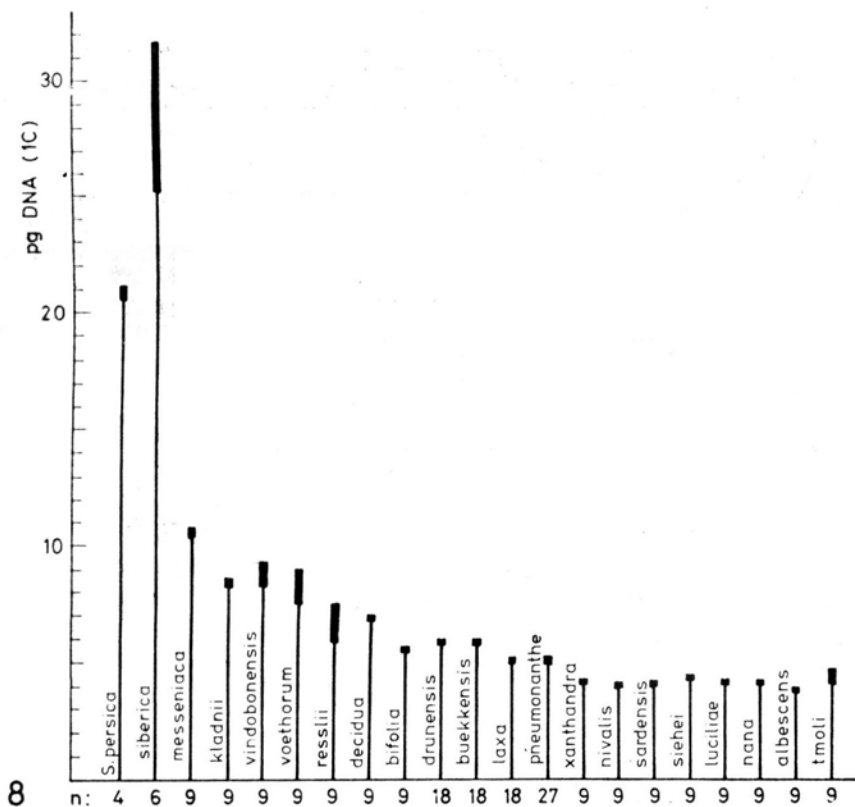
Ryc. 6. C-banding: Schematyczne przedstawienie chromosomów trzech gatunków *Allium*. A — *A. fistulosum*, B — *A. cepa*, C — *A. proliferum*



Ryc. 7. C-banding. a — kariotyp *Scilla hohenackeri*. Dwie ostatnie pary chromosomów wykazują heterozygotyczność strukturalną pod względem zawartości heterochromatyny. Według Greilhubera i Spety: *Plant Syst. Evol.* 1976. b — Kariotyp *Crepis capillaris*. Wszystkie pary chromosomów wykazują heterozygotyczność strukturalną. Według Schweizera: *Chromosoma* 1973

zawartości heterochromatyny i jej położenia w obrębie pary chromosomów homologicznych [47, 72, 93] (ryc. 7). Sugeruje to, że heterochromatyna konstytutywna barwiąca się C-pozytywnie jest frakcją nie zawierającą kodujących genów i zmiany ilościowe w jej obrębie zwykle nie pociągają za sobą ujemnych skutków w odróżnieniu od zmian w obrębie euchromatyny, zawierającej kodujące geny.

Także blisko ze sobą spokrewnione gatunki mogą znacznie różnić się między sobą zawartością silnie barwiącej się metodą C-banding heterochromatyny konstytutywnej [26, 28, 75, 92]. Przypuszcza się, że ilościowe zmiany w zawartości tej frakcji mogą odgrywać dużą rolę w ewolucji [60, 61]. Ryc. 8 przedstawia stosunki

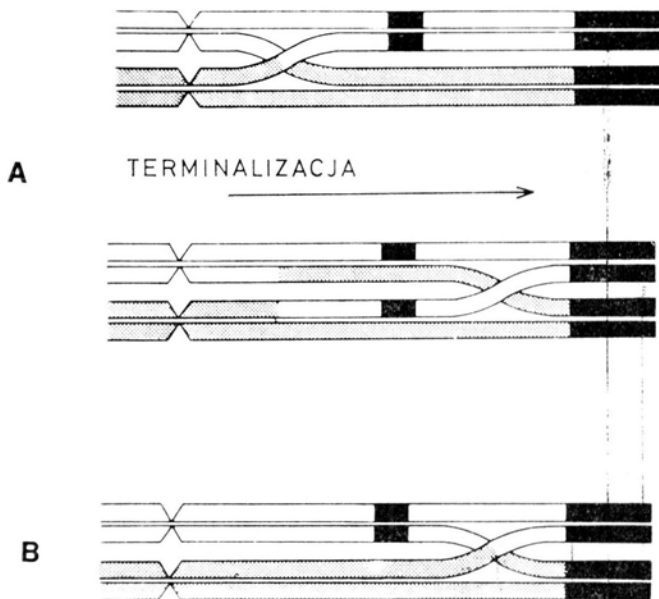


Ryc. 8. Relacje pomiędzy ogólną ilością DNA a zawartością heterochromatyny konstytutywnej u różnych gatunków *Scilla*. Grubą linią zaznaczono pozytywnie C-barwiącą się heterochromatynę, cienką euchromatynę. Wg Greilhubera: Plant Syst. Evol. 1979

pomiędzy ogólną zawartością DNA a zawartością heterochromatyny u różnych gatunków *Scilla* [wg Greilhubera, 26].

Oprócz badań chromosomów metafazowych metoda C-banding bywa stosowana w coraz większym zakresie w analizach chromosomów mejotycznych. Badania te rzucają światło na zagadnienie zachodzenia crossing-over oraz wznawiają dyskusję nad zjawiskiem terminalizacji chiazm. Występowanie terminalizacji chiazm u niektórych gatunków jest ostatnio kwestionowane. Loidl [47] postuluje, że chiazmy ulegają rozerwaniu w tym samym miejscu, w którym powstają, a nie przesuwają się ku końcom bivalentów. Wniosek ten opiera na podstawie analizy heteromorficznych bivalentów u *Allium fistulosum*. Niektóre osobniki tego gatunku wykazują heterozygotyczność strukturalną pod względem występowania subterminalnie położonych segmentów heterochromatynowych w obrębie chromosomów homologicznych (ryc. 9). Morfologia bivalentów barwionych metodą C-banding sugeruje, że w obrębie badanego gatunku terminalizacja chiazm nie występuje.

W cytologii zwierząt metoda C-banding odgrywa dużą rolę w analizie chromosomów płci. U wielu gatunków chromosomy te są zbudowane w znacznej części



Ryc. 9. C-banding, *Allium fistulosum*. A — przypuszczalna morfologia heteromorficznego bivalentu po zajściu terminalizacji chiazm. B — obserwowana morfologia heteromorficznych bivalentów. Wg Loidla: Chromosoma 1979

z heterochromatyny konstytutywnej, barwią się więc intensywniej, co ułatwia ich identyfikację w obrębie płytek metafazowych oraz w obrębie jąder interfazowych.

Podsumowując: C-banding jako metoda umożliwiająca identyfikację segmentów chromosomu zbudowanych z konstytutywnej heterochromatyny odgrywa niezwykle ważną rolę w analizach struktury, funkcji i ewolucji kariotypu zwierząt i roślin. Jednak ze względu na małą liczbę C-pozytywnych prążków w obrębie chromosomów zwierzęcych i niewiele większą w obrębie chromosomów roślinnych metoda C-banding nie znajduje szerszego zastosowania w bardziej szczegółowej analizie kariotypu. Zwykle dostarcza ona jednak nieco więcej informacji na temat jego zróżnicowania niż konwencjonalne metody barwienia.

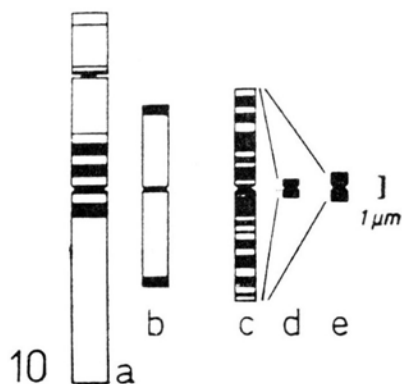
Prążki G (G-banding)

Jest to barwienie niezwykle przydatne w analizie kariotypu zwierząt. Istnieje szereg różniących się szczegółami metodyk tego barwienia, z których najpowszechniej stosuje się metodykę wprowadzającą trawienie chromosomów trypsyną [86]. Uwidacznia ono, w odróżnieniu do C-banding, dużą liczbę interkalarnie położonych prążków, ciemno barwiących się roztworem Giemzy. Każdy z typów chromosomów kompleksu posiada charakterystyczny wzór prążkowy umożliwiający jego identyfikację w obrębie analizowanego materiału. Metodyki G-banding są nadal ulepszane, ostatnio doniesiono o możliwości otrzymania około 1500 prążków w obrębie kario-

typu człowieka [37]. Tak duża liczba charakterystycznie położonych prążków umożliwia dość dokładne śledzenie nawet bardzo drobnych zmian w kariotypie, niewykrywalnych innymi metodami oraz zupełnie pewną identyfikację poszczególnych typów chromosomowych w badanym materiale. Ma to olbrzymie znaczenie, szczególnie w diagnostyce cytogenetycznej człowieka (np. związek niektórych drobnych zmian chromosomowych ze zwiększoną skłonnością do zapadania na niektóre rodzaje raka) oraz w badaniach dotyczących ewolucji kariotypu niektórych grup zwierząt. Szczególnie zaawansowane są badania tego typu w obrębie kariotypów wyższych hominoidów [80].

Okada i Comings [64], Comings i Okada [6] oraz Luciani i Morazziani [48] wykazali, że G-prążki odpowiadają ściśle chromomerom obserwowanym w obrębie chromosomów pachytenowych w mejozie.

Niestety, w odniesieniu do roślin metody G-banding nie znajdują zastosowania. Chromosomy roślinne traktowane w specyficzny dla G-banding sposób wykazują jednolite wybarwienie roztworem Giemzy. Przez długi czas stanowiło to zagadkę dla cytologów, którzy pragnęli opracować metodykę prążków G dla materiału roślinnego, a to ze względu na jej wielką przydatność w analizie kariotypu. Nie udało się jednak otrzymać G-prążków u roślin, a Greilhuber [23] wyjaśnił przyczyny tego zjawiska. Jest ono następstwem niezwykle silnej kontrakcji chromosomów mitotycznych roślin w porównaniu z ich kontrakcją u zwierząt. W metafazie mitotycznej roślin są one około 10 razy krótsze niż w pachytenie i w związku z tym poszczególne, dobrze widoczne w pachytenie obszary chromomerowe zlewają się ze sobą, dając w mitozie jednolite, silne wybarwienie całych chromosomów (ryc. 10). Chromosomy zwierzęce są natomiast w metafazie mitozy średnio tylko 2.5 raza krótsze od pachytenowych. Słaba ich kontrakcja nie powoduje zlania się poszczególnych obszarów chromomerowych i w konsekwencji możliwe jest różnicowe zabarwienie chromosomów. Czasem obserwuje się w materiale zwierzęcym fuzję blisko leżących chromomerów w jeden większy G-prążek.



Ryc. 10. Retacja wielkości pomiędzy: a — jednym z chromosomów *Vicia faba* (C-banding), b — chromosomem nr 1 żyta (C-banding) oraz c — barwionym metodą G-banding chromosomem nr 1 człowieka, d, e — obliczona teoretycznie wielkość chromosomu nr 1 człowieka, gdyby uległ on w metafazie tak silnemu skróceniu jak chromosomy *Vicia faba* (d) lub żyta (e). Według Greilhubera: Plant Syst. Evol. 1977

Prążki R (R-banding)

Jest to metodyka odwrotna do G-banding. Obszary, które w G-banding barwią się silnie, w R-banding pozostają słabo wybarwione i na odwrót. Istnieje szereg znacznie różniących się szczegółowych metodyk tego barwienia, w większości z nich jako barwnika używa się roztworu Giemzy. Po raz pierwszy R-banding opisali Dutrillaux i Lejeune w 1971 roku [11]. Analizowali oni tą metodą chromosomy człowieka. Modyfikacja R-banding dająca ciemno barwiące się prążki jedynie w telomerach nosi nazwę T-banding [10].

Szereg badań [ref. 5] wykazuje, że obszary R-prążków odpowiadają obszarom euchromatynowym chromosomów o stosunkowo wysokiej zawartości par GC w obrębie DNA. Euchromatyna występuje zwykle w interfazie w stanie nie skondensowanym i jest frakcją kodującą białka. Zawiera unikalne i średnio repetytywne sekwencje nukleotydów. Tabela przedstawia propozycję klasyfikacji podstawowych typów chromatyny opartą na ich reagowaniu na metodyki C-, G- i R-banding (wg Comingsa, [5]). Nieco inną klasyfikację przedstawia Nagl [60] oraz Sumner [88].

TABELA I

Trzy główne typy chromatyny w chromosomach

	Centromeryczna konstrytuwna heterochromatyna	„Heterochromatyna” interkalarna	Euchromatyna
Typ prążków Lokalizacja	C-prążki Najczęściej okolice centromerów	G-prążki Ramiona chromosomów	R-prążki Ramiona chromosomów
Stopień kondensacji w interfazie	Skondensowana	Skondensowana	Rozproszona
Aktywność genetyczna	Nieaktywna	Prawdopodobnie nieaktywna	Zwykle aktywna
Czas replikacji DNA Zawartość par AT w DNA	Późna faza S Bogata w pary GC, neutralna lub bogata w pary AT zawarta często w satelitarnym DNA	Późna faza S Bogata w pary AT	Wczesna faza S Bogata w pary GC
Stopień repetytywności DNA	Zwykle satelitarny DNA	Średnio repetytywne lub pojedyncze sekwencje	Średnio repetytywne lub pojedyncze sekwencje

Chromosomy traktowane jak w R-banding, barwione następnie oranżem akrydyny ujawniają zielono fluoryzujące obszary ściśle odpowiadające R-prążkom, oraz obszary czerwono fluoryzujące, leżące pomiędzy nimi i odpowiadające ściśle G-prążkom. Zielone obszary odpowiadają natywnemu (niezdenaturowanemu) DNA, natomiast obszary czerwono fluoryzujące odpowiadają jednoniciowemu, zdenaturowanemu DNA [68, 79].

Poparciem dla koncepcji, iż R-prążki są stosunkowo bogate w pary GC, są wyniki badań Schweizera [76]. Traktował on chromosomy antybiotykiem chromomycyną A₃. Związek ten preferencyjnie łączy się z DNA bogatym w pary GC. Jeśli po traktowaniu chromosomów chromomycyną inkubowano je w roztworze DNA-zy i barwiono roztworem Giemzy, to wykazywały one typowe R-prążki. Postulowany mechanizm jest prosty. Chromomycyna połączona z obszarami DNA bogatymi w pary GC blokuje dostęp do nich DNA-zie. Trawieniu ulegają obszary DNA nie osłonięte przez chromomycynę, a więc ubogie w pary GC (stosunkowo bogate w pary AT) odpowiadające G-prążkom. Obszary prążków R, zawierające dużo DNA barwią się ciemno roztworem Giemzy, obszary prążków G, których DNA uległ w znacznym stopniu wytrawieniu, barwią się słabo.

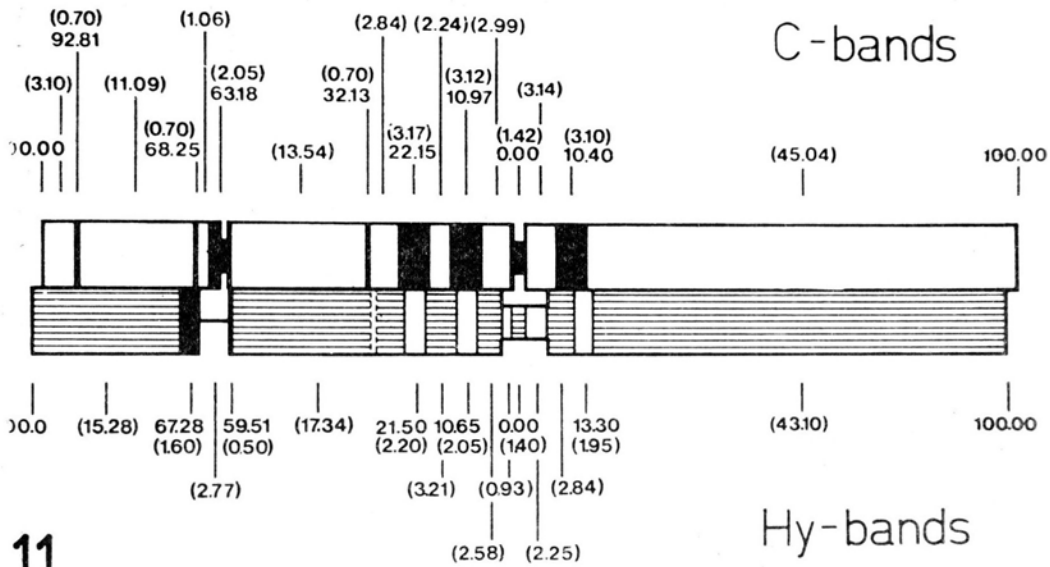
Prążki Hy (Hy-banding)

Jest to metoda różnicowego barwienia chromosomów roślinnych, nie stosowana w odniesieniu do materiału zwierzęcego. Bazuje ona na traktowaniu chromosomów kwasem solnym lub mieszaniną kwasów solnego i octowego, oraz barwieniu ich karminem lub roztworem Giemzy. Po raz pierwszy opisał ją Yamasaki w 1956 roku referując swoje badania nad chromosomami storczyka *Cypripedium debile* [87].

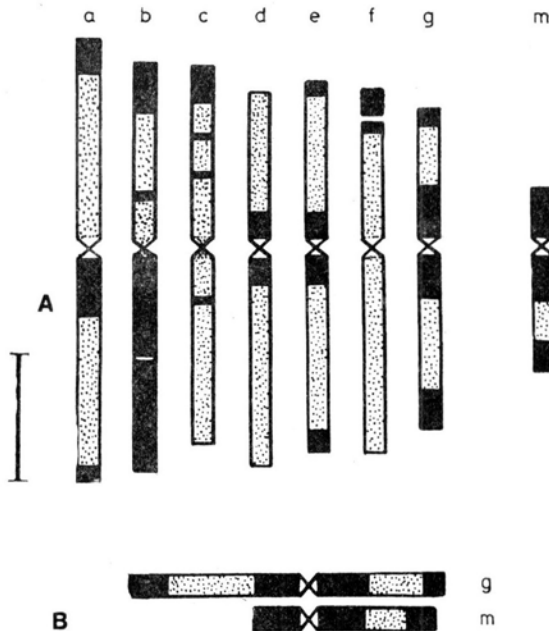
Metodykę tego typu stosował z powodzeniem w analizie chromosomów Takehisa [82, 83] oraz Greilhuber [20, 21], który nazwał ją Hy-banding. W wyniku jej stosowania chromosomy roślinne wykazują często szereg interkalarnie położonych nie barwiących się lub mocno zabarwionych prążków. Stosowanie metodyki Hy-banding oraz C-banding łącznie w analizie chromosomów jednego gatunku [22] umożliwia przeprowadzenie klasyfikacji typów heterochromatyny występujących w danym materiale (ryc. 11). Klasyfikacja typów heterochromatyny w materiale roślinnym przy użyciu innych metod różnicowego barwienia jest utrudniona [60].

Hy-banding jest metodą niezwykle przydatną w analizie kariotypu. Umożliwia ona nie tylko wyróżnianie typów chromosomowych występujących w materiale, ale i dostarczyć może dodatkowych informacji dotyczących występowania heterozygotyczności strukturalnej chromosomów w obrębie kompleksu [20] lub pokrewieństwa pewnych typów chromosomowych (ryc. 12). Z powodzeniem może być stosowana nawet wtedy, gdy kompleks chromosomowy danego gatunku wykazuje mały stopień zróżnicowania przy zastosowaniu metod klasycznej analizy kariotypu.

Mechanizm barwienia metodą Hy-banding nie został do tej pory wyjaśniony. Istnieją sugestie, że na wynik barwienia wpływa rozłożenie białek niehistonowych w obrębie chromosomu [20]. Porównanie wyników badań fluorescencyjnych [74] i badań przeprowadzonych z zastosowaniem metody Hy-banding [22] nad *Vicia faba* sugeruje, że negatywnie barwiące się w HY-banding prążki odpowiadają DNA bogatemu w pary AT.



Ryc. 11. Chromosom M *Vicia faba*. Porównanie wzorów prążkowych po zastosowaniu metodyki Hy- i C-banding. Wg Greilhubera: Plant Syst. Evol. 1975]



12

Ryc. 12. Hy-banding; a — karyotyp *Phleum Boehmeri*, b — podobieństwo wzorów prążkowych chromosomów typu m (B-chromosom) i chromosomu typu g sugeruje, iż B-chromosomy tego gatunku pochodzą od chromosomów typu g

Prążki N (N-banding)

W preparatach barwionych metodami klasycznymi organizator jąderka stanowi jasny, niezabarwiony obszar chromosomu nazywany często przewężeniem wtórnym. Lokalizacja organizatora jąderka w poszczególnych płytkach metafazowych może napotykać jednak szereg trudności. W wielu preparatach przewężenie wtórne może być zupełnie niewidoczne, w wielu innych obserwuje się je w obrębie tylko jednego z chromosomów homologicznych. W przypadku, gdy organizator jąderka położony jest na końcu chromosomu, zaobserwowanie go jest jeszcze trudniejsze. Istnieją sugestie, że wiele gatunków zwierząt może posiadać zwielokrotnione organizatory jąderek, tak małe, że nie mogą być one obserwowane przy użyciu konwencjonalnych metod analizy kariotypu.

Matsui i Sasaki [51], Matsui [50] i Funaki i wsp. [16] opisali metodę różnicowego barwienia organizatorów jąderek w chromosomach, nazwaną N-banding. Po zabarwieniu odpowiednio przygotowanych preparatów roztworem Giemzy obserwowali oni organizatory jąderek w postaci ciemno zabarwionych prążków lub punktów. Metoda ta okazała się przydatna w analizie kariotypu zarówno zwierząt jak i roślin.

Obecnie do barwienia organizatorów jąderek powszechnie stosuje się metodę srebrową, Ag staining, opracowaną przez Goodpasture i Bloom [19]. Technika ta jest ostatnio coraz chętniej stosowana w analizie kariotypu [3, 63, 84 i in.].

Metoda różnicowego barwienia chromatyd siostrzanych

Perry i Wolff [66] stwierdzili, że po inkorporacji bromodezoksyurydyny przez okres dwóch cykli komórkowych chromosomy wykazują różnicowe wybarwienie chromatyd siostrzanych roztworem Giemzy. Jedna z nich barwi się silnie, druga zaś słabo. Umożliwia to obserwację wymian pewnych odcinków pomiędzy chromatydami siostrzanymi (SCE) oraz wpływu różnych mutagenów na ich częstość [18, 32, 33, 34, 35, 46, 67, 70, 71, 78, 81, 94]. Kanda i Kato [33] analizując tą metodą chromosomy mejotyczne u myszy stwierdzili, iż ich wybarwienie sugeruje brak terminalizacji chiasm u tego gatunku.

Prążki Q (Q-banding)

Badania Casperssona i wsp. [4] wykazały, że chromosomy *Vicia faba* ujawniają po zabarwieniu atebryną lub jej pochodnymi szereg segmentów jasno fluoryzujących w promieniach UV. Sąsiadują one z segmentami wykazującymi wygaszoną fluorescencję, a ich położenie jest charakterystyczne dla poszczególnych typów chromosomowych występujących w materiale. Barwienie tego typu nazwano Q-banding i znajduje ono szerokie zastosowanie w analizie chromosomów zwierząt i roślin. Stwierdzono [dokładniejsze dane: 5, 7, 39, 55, 73], że atebryna łączy się z DNA

bogatym w pary AT i szczególnie silną fluorescencję po zastosowaniu tego barwnika wykazują te rejony chromosomów, które zbudowane są z wysokorepetytywnych, bogatych w pary AT heterochromatynowych sekwencji. O ile metoda C-banding dostarcza nam informacji na temat rozłożenia i ilości całej konstytutywnej heterochromatyny w obrębie chromosomów, o tyle metoda Q-banding umożliwia określenie, które z segmentów heterochromatynowych są bogate w pary AT. Stanowić to może podstawę dla klasyfikacji heterochromatyny i potwierdza, iż nie jest ona frakcją jednorodną, jak to poprzednio sądzono. Niektóre segmenty heterochromatyny konstytutywnej barwiące się C-pozytywnie nie wykazują zwiększonej fluorescencji w barwieniu Q. Szczególnie dobrze można to obserwować w materiale zwierzęcym, np. u *Drosophila* [43].

W diagnostyce cytogenetycznej człowieka barwienie Q znajduje szerokie zastosowanie. Szczególnie interesujące są badania dotyczące ludzkiego chromosomu Y. Jest on w znacznej części zbudowany z heterochromatyny konstytutywnej bogatej w pary AT. Przy użyciu Q-banding możliwa jest jego obserwacja nawet w jądrach interfazowych [45].

Późniejsze badania wielu autorów umożliwiły zastosowanie szeregu innych fluorochromów do różnicowego barwienia obszarów chromosomów bogatych w pary AT [30, 40, 41, 42, 56, 57, 74, 77]. W związku z tym termin Q-banding rozszerzono także i na inne AT specyficzne barwienia fluorescencyjne chromosomów. Najczęściej stosowanymi w tych badaniach fluorochromami są DAPI i Hoechst 33258, pochodne benzimidazolu.

W przypadku roślin segmenty chromosomów jasno fluoryzujące po zastosowaniu jednego z wyżej wymienionych fluorochromów odpowiadają segmentom pozytywnie barwiącym się w barwieniu C. Świadczy to o tym, że heterochromatyna konstytutywna roślin zbudowana jest najczęściej z sekwencji bogatych w pary AT.

Barwienie fluorochromami łączącymi się z innymi frakcjami chromatyny

Oprócz fluorochromów specyficznych dla bogatego w pary AT DNA istnieją, stosowane w ostatnich latach, fluorochromy barwiące rejony DNA bogate w pary GC. Dokładniejszych informacji na temat klasyfikacji fluorochromów dostarcza praca Moutschena [55], na temat zaś mechanizmów barwienia praca Latta i wsp. [41]. Jednym z fluorochromów preferencyjnie łączących się z bogatym w pary GC DNA jest chromomycyna A₃, o której wspomniano już wcześniej, przy omawianiu R-banding.

Innym fluorochromem niezwykle przydatnym w badaniach struktury chromosomów zwierząt i roślin jest oranż akrydyny (AO). Jego zastosowanie może być niezwykle szerokie i może dać odpowiedź na wiele pytań dotyczących natury i mechanizmów działania różnego rodzaju technik różnicowego barwienia chromosomów. Zastosowanie tego barwnika umożliwia dokonanie rozróżnienia między jedno- i dwuniciowymi kwasami nukleinowymi. Daje to możliwość identyfikacji *in situ* DNA i RNA, a także odróżnienia zdenaturowanego (jednoniciowego) od niezdena-

turowanego (dwuniciowego) DNA. W odpowiednich warunkach pH oranż akrydyny połączony z jednoniciowymi kwasami nukleinowymi fluoryzuje czerwono, natomiast połączony z dwuniciowymi zielono.

LITERATURA

- [1] Ambros P., Schweizer D. 1976. The Giemsa C-banded karyotype of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Arabidopsis Information Service* 13, 167—171.
- [2] Barnett R. I., Gray V. A., MacKinnon E. A. 1980. Effects of acetic acid-alcohol, trypsin, histone H1 and histone fragments on Giemsa staining patterns in chromosomes. *Histochemistry* 65, 207—215.
- [3] Bloom S. E., Goodpasture C. 1976. An improved technique for selective silver staining of nucleolar organizer regions in human chromosomes. *Hum. Genet.* 34, 199—206.
- [4] Caspersson T., Zech L., Modest E. J., Foley G. E., Wagh U., Simonsson E. 1969. Chemical differentiation with fluorescent alkylating agents in *Vicia faba* metaphase chromosomes. *Exp. Cell Res.* 58, 128—140.
- [5] Comings D. E. 1978. Mechanisms of chromosome banding and implications for chromosome structure. *Ann. Rev. Genet.* 12, 25—46.
- [6] Comings D. E., Okada T. A. 1975. Mechanisms of chromosome banding. VI. Whole mount electron microscopy of banded metaphase chromosomes and comparison to pachytene chromosomes. *Exp. Cell Res.* 93, 267—274.
- [7] Comings D. E., Limon J., Ledochowski A., Tsou K. C. 1978. Mechanisms of chromosome banding. XI. The ability of various acridine derivatives to cause Q-banding. *Exp. Cell Res.* 117, 451—455.
- [8] Darlington C. D., La Cour L. F. 1938. Differential reactivity of the chromosomes. *Ann. Bot.* 2, 615—625.
- [9] Darlington C. D., La Cour L. F. 1940. Nucleic acid starvation of chromosomes in *Trillium*. *J. Genet.* 40, 185—212.
- [10] Dutrillaux B. 1973. Nouveau système de marquage chromosomique: Les bandes T. *Chromosoma* 41, 395—402.
- [11] Dutrillaux B., Lejeune J. 1971. Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain. *C. R. Acad. Sci. Paris Ser. D* 272, 2638—2640.
- [12] Fillion W. G., Blakey D. H. 1979. Differential Giemsa staining in plants. VI. Centromeric banding. *Can. J. Genet. Cytol.* 21, 373—378.
- [13] Fiskesjö G. 1974. Two types of constitutive heterochromatin made visible in *Allium* by rapid C-banding method. *Hereditas* 78, 153—156.
- [14] Fiskesjö G. 1975. Chromosomal relationships between three species of *Allium* as revealed by C-banding. *Hereditas* 81, 23—32.
- [15] Fonatsch C. 1979. A technique for simultaneous demonstration of G bands and sister chromatid exchanges. *Cytogenet. Cell Genet.* 23, 144—146.
- [16] Funaki K., Matsui S., Sasaki M. 1975. Location of nucleolar organizers in animal and plant chromosomes by means of an improved N-banding technique. *Chromosoma* 49, 357—370.
- [17] Geitler L. 1940. Temperaturbedingte Ausbildung von Spezialsegmenten und Chromosomenden. *Chromosoma* 1, 554—561.
- [18] Gibas Z., Limon J. 1978. Isolabelling of the long arm of the human Y chromosome demonstrated by the FPG technique. *Chromosoma* 69, 113—120.
- [19] Goodpasture C., Bloom S. E. 1975. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* 53, 37—50.
- [20] Greilhuber J. 1973. Differential staining of plant chromosomes after hydrochloric acid treatments (Hy bands). *Österr. Bot. Z.* 122, 333—351.

- [21] Greilhuber J. 1974. Hy-banding: a new quick technique for heterochromatin staining in plant chromosomes. *Naturwiss.* 61, 170—171.
- [22] Greilhuber J. 1975. Heterogeneity of heterochromatin in plants: comparison of Hy- and C-bands in *Vicia faba*. *Plant Syst. Evol.* 124, 139—156.
- [23] Greilhuber J. 1977. Nuclear DNA and heterochromatin contents in the *Scilla hohenackeri* group, *S. persica*, and *Puschkinia scilloides* (Liliaceae). *Plant Syst. Evol.* 128, 243—257.
- [24] Greilhuber J. 1978. DNA contents, Giemza banding, and systematics in *Scilla bifolia*, *S. drunensis* and *S. vindobonensis* (Liliaceae). *Plant Syst. Evol.* 130, 223—233.
- [25] Greilhuber J. 1979. C-band distribution, DNA content and base composition in *Adoxa moschatellina* (Adoxaceae), a plant with cold-sensitive chromosome segments. *Plant Syst. Evol.* 131, 243—259.
- [26] Greilhuber J. 1979. Evolutionary changes of DNA and heterochromatin amounts in the *Scilla bifolia* group (Liliaceae). *Plant Syst. Evol. Suppl.* 2, 263—280.
- [27] Greilhuber J., Speta F. 1976. C-banded karyotypes in the *Scilla hohenackeri* group, *S. persica*, and *Puschkinia* (Liliaceae). *Plant Syst. Evol.* 126, 149—188.
- [28] Greilhuber J., Speta F. 1977. Giemsa karyotypes and their evolutionary significance in *Scilla bifolia*, *S. drunensis*, and *S. vindobonensis* (Liliaceae). *Plant Syst. Evol.* 127, 171—190.
- [29] Heitz E. 1928. Heterochromatin der Moose. I. *Jahrb. Wiss. Bot.* 69, 762—818.
- [30] Holmquist G. 1975. Hoechst 33258 fluorescent staining of *Drosophila* chromosomes. *Chromosoma* 49, 333—356.
- [31] Hübner H., Kononowicz A. K. 1977. Postulowane mechanizmy powstawania wzorów prążkowych w chromosomach metafazowych. *Post. Biol. Kom.* 4, 339—370.
- [32] Hübner H., Pojda Z. 1980. Wymiany siostrzanych chromatyd — mechanizmy i zastosowania. *Post. Biol. Kom.* 7, 149—176.
- [33] Kanda N., Kato H. 1980. Analysis of crossing-over in mouse meiotic cells by BrDU labelling technique. *Chromosoma* (Berl.) 78, 113—121.
- [34] Kihlman B. A. 1975. Sister chromatid exchanges in *Vicia faba*. II. Effects of thiopeta, caffeine and 8-ethoxycaffeine on the frequency of SCE's. *Chromosoma* (Berl.) 51, 11—18.
- [35] Kihlman B. A., Kronborg D. 1975. Sister chromatid exchanges in *Vicia faba*. I. Demonstration by a modified fluorescent plus Giemsa (FPG) technique. *Chromosoma* (Berl.) 51, 1—10.
- [36] Klasterškà I., Natarajan A. T. 1975. Distribution of heterochromatin in the chromosomes of *Nigella damascena* and *Vicia faba*. *Hereditas* 79, 006—008.
- [37] Kolata G. B. 1980. Genes and cancer: the story of Wilms tumor. *Science* 207, 970—971.
- [38] Ladzinsky G., Newell C. A., Hymowitz T. 1979. Giemsa staining of soybean chromosomes. *J. Hered.* 70, 415—416.
- [39] Latt S. A., Brodie S., Munroe S. H. 1974. Optical studies of complexes of quinacrine with DNA and chromatin: implications for the fluorescence of cytological chromosome preparations. *Chromosoma* 49, 17—40.
- [40] Latt S. A., Wohlleb J. C. 1975. Optical studies of the interaction of 33258 Hoechst with DNA, chromatin and metaphase chromosomes. *Chromosoma* 52, 297—316.
- [41] Latt S. A., Juergens L. A., Matthews D. J., Gustashaw K. M., Sahar E. 1980. Energy transfer-enhanced chromosome banding. An overview. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 1, 187—196.
- [42] Leemann U., Ruch F. 1978. Selective excitation of Mithramycin or DAPI fluorescence on double-stained cell nuclei and chromosomes. *Histochemistry* 58, 329—334.
- [43] Lemeunier F., Dutrillaux B., Ashburner M. 1978. Relationships within the *Melanogaster* subgroup species of the genus *Drosophila* (Sophophora). III. The mitotic chromosomes and quinacrine fluorescent patterns of the polytene chromosomes. *Chromosoma* 69, 349—361.
- [44] Lima-de-Faria A. 1949. The structure of the centromere of the chromosomes of rye. *Hereditas* 35, 77—85.
- [45] Limon J., Beil B., Lajborek-Czyż I. 1973. Identyfikacja ciała Y w komórkach galarety Whartona. *Polski Tyg. Lekarski* R. 28, 7—9.
- [46] Lin C. C., van de Sande J. H. 1975. Differential fluorescent staining of human chromosomes with daunomycin and adriamycin. The D-bands. *Science* 190, 61—63.

- [47] Loidl J. 1979. C-band proximity of chiasmata and absence of terminalisation in *Allium flavum* (Liliaceae). *Chromosoma* 73, 45—51.
- [48] Luciani J. M., Morazziani M. R., Stahl A. 1975. Identification of pachytene bivalents in human male meiosis using G-banding technique. *Chromosoma* 52, 275—282.
- [49] Marks G. E. 1974. Giemsa banding of meiotic chromosomes in *Anemone blanda* L. *Chromosoma* 49, 113—119.
- [50] Matsui S. 1974. Nucleolus organizer of *Vicia faba* chromosomes revealed by the N-banding technique. *Japan. J. Genet.* 49, 93—96.
- [51] Matsui S., Sasaki M. 1973. Differential staining of nucleolus organizers in mammalian chromosomes. *Nature New Biol.* 246, 148—150.
- [52] Matsui S., Sasaki M. 1975. The mechanism of Giemsa-banding of mammalian chromosomes, with special attention to the role of nonhistone proteins. *Japan. J. Genet.* 50, 189—204.
- [53] Matsukuma S., Utakoji T. 1976. Uneven extraction of proteins in Chinese hamster chromosomes during G-staining procedures. *Exp. Cell Res.* 97, 297—303.
- [54] Matsukuma S., Utakoji T. 1977. Nonhistone protein associated with centromeric heterochromatin in the mouse chromosome. *Exp. Cell Res.* 105, 217—222.
- [55] Moutschen J. 1975. Fine structure of chromosomes as revealed by fluorescence analysis. *Prog. Biophys. molec. Biol.* 30, 1—28.
- [56] Müller W., Gautier F. 1975. Interactions of heteroaromatic compounds with nucleic acids. A-T — specific non-intercalating DNA ligands. *Eur. J. Biochem.* 54, 385—394.
- [57] Müller W., Crothers D. M., Waring M. J. 1973. A non-intercalating proflavine derivative. *Eur. J. Biochem.* 39, 223—234.
- [58] Müntzing A., Lima-de-Faria A. 1949. Pachytene analysis of standard fragments and large iso-fragments in rye. *Hereditas* 35, 253—268.
- [59] Müntzing A., Lima-de-Faria A. 1952. Pachytene analysis of a deficient accessory chromosome in rye. *Hereditas* 38, 1—10.
- [60] Nagl W. 1976. *Zellkern und Zellzyklen*. Stuttgart, Ulmer.
- [61] Nagl W. 1979. Search for the molecular basis of diversification in phylogenesis and ontogenesis. *Pl. Syst. Evol., Suppl.* 2, 3—25.
- [62] Natarajan A. T., Sharma N. P. 1974. Chromosome banding patterns and the origin of the B genome in wheat. *Genet. Res. Camb.* 24, 103—108.
- [63] Nielsen K., Marcus M., Gropp A. 1979. Localization of NORs in chromosomes of mouse cell lines by combined 33258-Hoechst and Ag-staining technique. *Hereditas* 90, 31—37.
- [64] Okada T. A., Comings D. E. 1974. Mechanisms of chromosome banding. III. Similarity between G-bands of mitotic chromosomes and chromomeres of meiotic chromosomes. *Chromosoma* 48, 65—71.
- [65] Pardue M. L., Gall J. G. 1970. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science* 168, 1356—1358.
- [66] Perry P., Wolff S. 1974. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature (Lond)* 251, 156—158.
- [67] Pojda Z., Stróżyński H., Osiecka R. 1976. Nowe metody badań wymian siostrzanych chromatyd. *Post. Biol. Kom.* 3, 357—368.
- [68] Rigler R. 1966. Microfluorometric characterization of intracellular nucleic acids and nucleoproteins by acridine orange. *Acta Physiol. Scand.* 67, Suppl. 267, 1—122.
- [69] Rocchi A., Di Castro M., Prantera G. 1980. Effect of DAPI on Chinese hamster chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.* 27, 70—72.
- [70] Scheid W. 1976. Mechanism of differential staining of BUdR-substituted *Vicia faba* chromosomes. *Exp. Cell Res.* 101, 55—58.
- [71] Schvarzmann J. B., Postigo R., Gutiérrez C. 1979. Analysis of visible light-induced sister chromatid exchanges in 5-Bromodeoxyuridine-substituted chromosomes. *Chromosoma* 74, 317—328.
- [72] Schweizer D. 1973. Differential staining of plant chromosomes with Giemsa. *Chromosoma* 40, 307—320.

- [73] Schweizer D. 1976. Giemsa and fluorochrome banding of polytene chromosomes in *Phaseolus vulgaris* and *P. coccineus*. *Current Chromosome Research*, Amsterdam, 51—56.
- [74] Schweizer D. 1976. Reverse fluorescent chromosome banding with Chromomycin and DAPI. *Chromosoma* 58, 307—324.
- [75] Schweizer D., Ehrendorfer F. 1976. Giemsa banded karyotypes, systematics, and evolution in *Anacyclus* (*Asteraceae-Anthemideae*). *Plant. Syst. Evol.* 126, 107—148.
- [76] Schweizer D. 1977. R-banding produced by DNase I digestion of Chromomycin-stained chromosomes. *Chromosoma* 64, 117—124.
- [77] Schweizer D., Ambros P., Andrie M. 1978. Modification of DAPI banding on human chromosomes by prestaining with a DNA-binding oligopeptide antibiotic, Distamycin A. *Exp. Cell Res.* 111, 327—332.
- [78] Shivaishi Y. 1977. Some critical studies on the sister chromatid exchange in human chromosomes. *Proc. Japan. Acad.* 53, Ser. B. 272—275.
- [79] Stockert J. C., Lisanti J. A. 1972. Acridine-orange differential fluorescence of fast — and slow-reassociating chromosomal DNA after in situ DNA denaturation and reassociation. *Chromosoma* 37, 117—130.
- [80] Szabuniewicz B., Limon J. 1979. Pokrewieństwo kariotypów wyższych hominoidów. *Post. Hig. Med. Dośw.* 33, 453—464.
- [81] Takayama S., Sakanishi S. 1977. Differential Giemsa staining of sister chromatids after extraction with acids. *Chromosoma* 64, 109—115.
- [82] Takehisa S. 1968. Heterochromatic segments in *Vicia* revealed by treatment with HCl-acetic-acid. *Nature* 217, 567—568.
- [83] Takehisa S. 1970. HCl-acetic-acid treatment for the detection of heterochromatic regions in metaphase chromosomes. *Bot. Mag. Tokyo* 83, 358—363.
- [84] Tantravahi R., Miller D., Miller O. J. 1977. Ag-staining of nucleolus organizer regions of chromosomes after Q-, C-, G-, or R-banding procedures. *Cytogenet. Cell Genet.* 18, 364—369.
- [85] Vosa C. G., Marchi P. 1972. Quinacrine fluorescence and Giemsa staining in plants. *Nature New Biol.* 237, 191—192.
- [86] Wang H. C., Federoff S. 1972. Banding in human chromosomes treated with trypsin. *Nature New Biol.* 235, 52—54.
- [87] Yamasaki N. 1956. Differentielle Färbung der somatischen Metaphasechromosomen von *Cypripedium debile*. *Chromosoma* 7, 620—626.
- [88] Sumner A. T. 1982. The nature and mechanisms of chromosome banding. *Cancer Gen. Cytogen.* 6, 59—87.
- [89] Buys Ch. C. M., Osinga J. 1982. A relation between G-, C-, and N-band patterns as revealed by progressive oxidation of chromosomes and a note on the nature of N-bands. *Genetica* 58, 3—9.
- [90] D'Amato G., Bianchi G., Carpinieri R., Marchi P. 1981. Feulgen banding in unfixed metaphase chromosomes of some plant species. *Caryologia* 34, 83—88.
- [91] Rowland R. E. 1981. Chromosome banding and heterochromatin in *Vicia faba*. *Theor. Appl. Genet.* 60, 275—280.
- [92] Gill B. S. 1981. Evolutionary relationships based on heterochromatin bands in six species of the *Triticinae*. *J. Hered.* 72, 391—394.
- [93] Verma R. S., Brat S. V., Dosik H. 1982. A rapid method for identification of constitutive heterochromatin of secondary constriction regions of human chromosomes 1, 9 and 16. *J. Hered.* 73, 74—76.
- [94] Tsuji H., Kato H. 1981. Three-way differential staining of sister chromatids in M3 chromosomes. *Exp. Cell Res.* 134, 433—444.