

Τεχνικές ζώνωσης για την αναγνώριση των χρωμοσωμάτων των φυτών

I. N. Ξυνιάς

Ινστιτούτο Σιτηρών Θεσσαλονίκης, ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η εργασία αυτή αναφέρεται στις τεχνικές ζώνωσης (banding techniques) για την αναγνώριση και ταυτοποίηση των χρωμοσωμάτων των φυτών που έχουν αναπτυχθεί μετά το 1970. Περιγράφονται 6 διαφορετικές τεχνικές. Εγινε προσπάθεια να παρουσιασθούν όσο το δυνατόν περισσότερες απόψεις, για να εξηγηθούν τα αίτια σχηματισμού των ζωνώσεων. Στις περιπτώσεις που αναπτύχθηκαν περισσότερες από μια θεωρίες, αναφέρονται όλες, ενώ τονίζεται ιδιαίτερος, αυτή που κατα γενική παραδοχή ισχύει. Τέλος, γίνεται μια μικρή αναφορά στα επιτεύγματα της χρησιμοποίησης των τεχνικών αυτών στην αναγνώριση και ταυτοποίηση των χρωμοσωμάτων των φυτών.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Υπάρχουν διάφορα στάδια του κυτταρικού κύκλου, στα οποία μπορούν να μελετηθούν τα χρωμοσώματα. Κάθε στάδιο έχει τα πλεονεκτήματά και τα μειονεκτήματά του. Το στάδιο όμως εκείνο, κατά τη διάρκεια του οποίου τα χρωμοσώματα διακρίνονται πιο εύκολα είναι η μιτωτική μετάφαση (57).

Επειδή κατά το παρελθόν δεν υπήρχαν κατάλληλοι μέθοδοι προετοιμασίας, τα χρωμοσώματα της μιτωτικής μετάφασης δεν αποκάλυπταν πολλά χαρακτηριστικά, που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στην ταυτοποίησή τους. Για το λόγο αυτό, οι κυτταρολόγοι έστρεψαν την προσοχή τους σε ορισμένους άλλους τύπους χρωμοσωμάτων, όπως είναι τα χρωμοσώματα των σιελογόνων αδένων των εντόμων και άλλων οργανισμών, που υπάρχουν στο στάδιο της πρόφασης. Λόγω της πολυταινίας, της αύξησης δηλαδή του DNA λόγω πλευρικού πολλαπλασιασμού, τα χρωμοσώματα αυτά αποκαλύπτουν αρκετές λεπτομέρειες, που δεν είναι δυνατόν να φανούν σε κανονικές προφάσεις (57). Η μελέτη της πρόφασης έχει και ορισμένα ακόμα πλεονεκτήματα. Κατά το στάδιο αυτό υπάρχει η δυνατότητα διάκρισης της ετεροχρωματίνης από την ευχρωματίνη. Τα χρωμομερή είναι ορατά και οι πυρηνίσκοι είναι εμφανείς.

Η ταυτοποίηση των χρωμοσωμάτων της μιτωτικής μετάφασης έγινε δυνατή μετά την ανάπτυξη νέων τεχνικών αναγνώρισης. Έτσι η μιτωτική μετάφαση είναι ένα από τα πιο εύκολα στάδια για να μελετηθεί η μορφολογία των χρωμοσωμάτων. Οι πιο κοινές τεχνικές ζώνωσης (banding techniques), όπως ονομάστηκαν οι νέες αυτές τεχνικές, είναι οι εξής: η C-ζώνωση, η G-ζώνωση, η Q-ζώνωση, η R-ζώνωση και η N-ζώνωση. Ως ζώνη ορίζεται ένα μικρό τμήμα του χρωμοσώματος που είναι σαφώς αναγνωρίσιμο από τα διπλανά του τμήματα, εμφανιζόμενο με σκοτεινότερο ή ανοικτότερο χρώμα (57).

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΖΩΝΩΣΗΣ ΤΩΝ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ.

1. Τεχνική της C-ζώνωσης

Η τεχνική με την οποία σχηματίζονται C-ζώνες, ονομάζεται τεχνική της C-ζώνωσης ή C-χρωματισμού. Η τεχνική αυτή, όπως και οι υπόλοιπες τεχνικές ζώνωσης ξεκίνησαν από μία εργασία των Pardue και Gall (50), που αφορούσε τον εντοπισμό δορυφορικού DNA σε χρωμοσώματα ποντικού. Όπως αναφέρει η Γεωργίου (9), η τεχνική *in situ* υβριδισμού των Pardue και Gall τροποποιήθηκε από τους Arrighi και Hsu το 1971, οι οποίοι ανέπτυξαν την τεχνική της C-ζώνωσης σε χρωμοσώματα ανθρώπου.

Αυτό που γίνεται με τη C-ζώνωση είναι η εκλεκτική βαφή της συστατικής ετεροχρωματίνης (constitutive heterochromatin) Η συστατική ετεροχρωματίνη είναι η κοινή μορφή της ετεροχρωματίνης, υπάρχει δε άφθονη κοντά στο κεντρομερές, στα τελομερή και στην περιοχή του οργανωτή του πυρηνίσκου (57). Η συστατική ετεροχρωματίνη αποτελείται από υψηλά επαναληπτικό DNA (5) και είναι αργά αναδιπλασιαζόμενη (39,6). Είναι ορατή στη μεσόφαση και πρόφαση, όχι όμως και στη μετάφαση. Χρειάζεται ειδική επεξεργασία για να γίνει ορατή στα μεταφασικά χρωμοσώματα.

Αρχικά η C-ζώνωση ήταν πολύ περιορισμένη στα φυτά, κυρίως λόγω τεχνικών δυσκολιών (46,9). Όπως αναφέρει ο S. Guerra (31) η αρχική εφαρμογή της C-ζώνωσης σε φυτικό υλικό έγινε το 1972 από τους Vosa και Marchi. Αργότερα αναπτύχθηκαν διάφορες παραλλαγές της, ειδικές για διάφορα φυτικά είδη (22, 27, 28, 62, 33, 20, 40, 54, 58, 43, 31, 48). Οι περισσότερες από τις παραλλαγές αυτές βασίζονται στην επεξεργασία των χρωμοσωμάτων με κεκορεσμένο διάλυμα υδροξειδίου του Ba ή Na, συνδυασμό

κρύου ή ζεστού αλατούχου διαλύματος (2XSSC) και βαφή με χρωστική Giemsa ή Leishman.

Το τι ακριβώς συμβαίνει και εμφανίζονται οι C-ζώνες δεν είναι τελείως γνωστό. Γι αυτό έχουν διατυπωθεί κατά καιρούς διάφορες θεωρίες, που προσπαθούν να εξηγήσουν τα πράγματα. Όπως αναφέρουν οι Dille κ.α. (21) οι κυριώτερες από τις θεωρίες αυτές είναι οι εξής:

1. Θεωρία μετουσίωσης-επανυβριδισμού του DNA (34).

Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, που ήταν για μεγάλο χρονικό διάστημα η επικρατούσα, κατά τη C-ζώνωση γίνεται μετουσίωση του χρωμοσωμικού DNA, η οποία ακολουθείται από διαφορετικό επανυβριδισμό του υψηλά επαναληπτικού DNA, που βρίσκεται στις ζώνες. Με άλλα λόγια, η επαναληπτικότητα είναι αυτή που επιτρέπει τη διαφοροποιημένη χρώση της ετεροχρωματίνης.

2. Θεωρία του απομακρυνόμενου DNA (14, 19, 51, 36).

Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, που είναι η επικρατέστερη, κατά τη διάρκεια της C-ζώνωσης το DNA εξάγεται επιλεκτικά από τα χρωμοσώματα. Όπως έχουν δείξει πολλές εργασίες (στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν ραδιοϊσότοπα, χρώση σε Feulgen σε συνδυασμό με φυγοκέντρωση σε CsCl και ηλεκτρονική μικροσκοπία), οι ετεροχρωματικές περιοχές φαίνεται να είναι περισσότερο ανθεκτικές στην απομάκρυνση του DNA, απ' ό,τι οι μη ετεροχρωματικές περιοχές. Έτσι η χρωστική Giemsa ανλώς συσσωρεύεται στο DNA που παραμένει, με αποτέλεσμα την έντονη χρώση της συστατικής ετεροχρωματίνης. Πειράματα που έχουν γίνει σε διάφορα εργαστήρια έχουν δείξει κάποια αλληλεπίδραση του DNA με πρωτεΐνες του πυρηνοπλάσματος (nuclear matrix proteins). Ακριβώς η αλληλεπίδραση αυτή πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνη για τη σχετική αντίσταση του DNA της συστατικής ετεροχρωματίνης στην απομάκρυνση κατά τη διάρκεια της C-ζώνωσης. Το σύμπλεγμα αυτό DNA-πρωτεΐνης μπορεί κατά προτίμηση να συμβαίνει στη συστατική ετεροχρωματίνη, λόγω της μεγαλύτερης συμπύκνωσής της σε σχέση με άλλα τμήματα του χρωμοσώματος.

3. Θεωρία των Joshi και Ranjekar (37). Η θεωρία αυτή, για να εξηγήσει τον σχηματισμό των ζωνών, στηρίζεται στα εξής σημεία:

- (α) η παρουσία ενδιάμεσων ζωνών θα μπορούσε να αποδοθεί σε συμπύκνωση της χρωματίνης.
- (β) η κεντρομερική ετεροχρωματίνη οφείλεται στον σχηματισμό ενός συμπαγούς συμπλέγματος DNA-μη ιστονικών πρωτεϊνών και
- (γ) οι C-ζώνες είναι το αποτέλεσμα διαφόρων αλληλεπιδράσεων μεταξύ της χρωστικής και των νουκλεοπρωτεϊνών.

4. Θεωρία των Duijn κ. α. (23), που προτείνει ότι η ζώνωση οφείλεται στην είσοδο του υδρόφοβου συμπλέγματος της χρωστικής μέσα στην έλικα του DNA και στην αποικοδόμηση των ιστονικών πυρήνων των νουκλεοσωμάτων.

Η τεχνική της C-ζώνωσης (Πίν. 1) μαζί με την N-ζώνωση, που θα περιγραφεί στη συνέχεια, είναι η κυρίως χρησιμοποιούμενη τεχνική σε φυτικά χρωμοσώματα. Μάλιστα έχει ορισμένα μοναδικά πλεονεκτήματα που την καθιστούν αναντικατάστατη. Η ειδική ζώνωση κάθε ζεύγους ομολόγων χρωμοσωμάτων είναι πολύ σταθερή, ώστε να επιτρέπει τη χρωμοσωματική ταυτοποίηση και αναγνώριση (20, 4). Οι C-ζώνες κληρονομούνται ως απλές μενδελικές μονάδες και έτσι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως χρωμοσωματικοί δείκτες (63, 33, 41). Μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εύρεση μετατοπίσεων (42), ελλείψεων (61, 32) και χρωμοσωματικών αντικαταστάσεων (3). Τέλος έχουν χρησιμοποιηθεί και σε εξελικτικές μελέτες (29).

ΠΙΝΑΚΑΣ 1-TABLE 1

Στάδια εφαρμογής μεθοδολογίας της C-ζώνωσης (53).

Application steps of a C-banding procedure (53).

1. Φύτρωμα σπόρων:	σε υγρό χάρτινο ηθμό, στους 21°C.
2. Αρχική μεταχείριση:	ρίζες μήκους 1-2 cm τοποθετούνται σε αποσταγμένο νερό, σε πάγο, στους +4°C για 24 ώρες.
3. Σταθεροποίηση:	σε 45% οξικό οξύ, στους +4°C, για 15-20 ώρες.
4. Υδρολύση:	σε 0,2 N HCl, στους 24±2°C, για 1 ώρα.
5. Παρασκευάσματα:	με σύνθλιψη σε μία σταγόνα 45% οξικού οξέος-απομάκρυνση καλυπτρίδας (μέθοδος CO ₂).
6. Στέγνωμα:	στον αέρα στους 24±2°C, για 1,5 ώρα.
7. Αφυδάτωση:	σε απόλυτη αλκοόλη, στους 24+2°C, για 1 ώρα.
8. Στέγνωμα:	ολονύκτια στον αέρα, στους 24±2°C.
9. Ba(OH) ₂ :	σε κεκορεσμένο διάλυμα, στους 40°C, για 6 λεπτά της ώρας.
10. Επώαση:	(α) σε αποσταγμένο νερό στους 45°C, για 1 λεπτό δύο φορές. (β) σε 2XSSC στους 24±2°C, για 15 λεπτά. (γ) σε φρέσκο 2XSSC, στους 50±2°C, για 70 λεπτά της ώρας.
11. Πλύση:	με εμβάπτιση σε αποσταγμένο νερό, στους 24±2°C.
12. Βαφή:	σε διάλυμα 5% Giemsa (σε φωσφορικό ρυθμιστικό, pH:6,8), για 1-2 ώρες.
13. Πλύση:	με εμβάπτιση σε αποσταγμένο νερό, στους 24±2°C.
14. Στέγνωμα:	ολονύκτια στον αέρα, στους 24±2°C.

2. Τεχνική της G-ζώνωσης

Η τεχνική της G-ζώνωσης δίνει περισσότερες λεπτομέρειες από τη C-ζώνωση. Μαζί με τις R- και Q-ζωνώσεις είναι ιδανικές για κυταρογενετικές αναλύσεις, γιατί κάθε χρωμόσωμο μπορεί να αναγνωρισθεί. Επίσης είναι δυνατό να ανιχνευθεί παραλλακτικότητα σε χρωμοσωματική δομή από ένα συγκεκριμένο τύπο. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιεί τη χρωστική Giemsa (G = Giemsa) και συνήθως περιλαμβάνει αρχική μεταχείριση του υλικού με διάλυμα τρυψίνης, ουρίας ή πρωτεάσης (19).

Ενα ερώτημα που υπήρχε, όταν εμφανίσθηκε η τεχνική, ήταν κατά πόσο η διαδικασία της ζώνωσης είχε ως αποτέλεσμα τις G-ζώνες ή απλώς καθιστούσε ορατές ζώνες που ήδη υπήρχαν (19). Οι διάφορες εργασίες που ακολούθησαν, έκαναν φανερό ότι οι ζώνες ήταν πάντα εκεί. Η τελική επιβεβαίωση της ιδέας αυτής ήλθε με την παρατήρηση ότι οι G-ζώνες αντιστοιχούν ακριβώς με τα χρωμομερή των μειωτικών χρωμοσωμάτων (19).

Η χρωστική Giemsa είναι ένα σύμπλοκο μίγμα χρωστικών θειαζίνης: μπλέ του μεθυλενίου, Azure A,B,C, ενώ περιέχει και εοζίνη (15). Οι θειαζίνες είναι θετικώς φορτισμένα μόρια, που αντιδρούν ιονικώς με τις φωσφορικές ομάδες του DNA, στο μόριο του οποίου αποθέτονται πλευρικώς. Η μεγαλύτερη δέσμευση συμβαίνει όταν υπάρχει ίση αναλογία θειαζίνης προς φωσφορικές ομάδες του DNA. Η απόθεση των χρωστικών έχει ως αποτέλεσμα τον υποχρωματισμό του DNA, που με τη σειρά του συνεπάγεται

μείωση της οπτικής πυκνότητας της χρωστικής. Όπως αναφέρει ο Comings (19), το πιο σημαντικό γνώρισμα των χρωστικών της θειαζίνης είναι η μεταχρωματική τους ικανότητα (δηλαδή η αντίδρασή τους με τις φωσφορικές ομάδες του DNA προκαλεί αλλαγή του μεγίστου της απορρόφησής τους, που γίνεται σε μικρότερα μήκη κύματος - από ανοικτό μπλέ, 650nm, σε σκούρο πορφυρό, 560-600nm). Η εοζίνη, αν και δεν θεωρείται αναγκαία, συνήθως συμβάλλει στη δημιουργία πιο διακριτών ζωνών. Όταν υπάρχει περίσσεια της χρωστικής και καθαρό DNA, ο λόγος της χρωστικής προς τις φωσφορικές ομάδες είναι 1. Αυτό σημαίνει ότι όταν η χρωστική βρίσκεται σε περίσσεια, τότε όλες οι φωσφορικές ομάδες είναι ενωμένες με τη χρωστική. Όταν υπάρχει μη σταθεροποιημένη χρωματίνη, ο λόγος είναι 0,5-0,6, πράγμα που σημαίνει ότι οι μισές φωσφορικές ομάδες είναι ελεύθερες. Τέλος, με την παρουσία σταθεροποιημένης (σε διάλυμα αλκοόλης προς οξικό οξύ) χρωματίνης, ο λόγος είναι 0,8, που σημαίνει ότι η σταθεροποίηση απομακρύνει πρωτεΐνες και επιτρέπει σε περισσότερες φωσφορικές ομάδες να αντιδράσουν με τη χρωστική. Επίσης *in vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι η χρωστική Giemsa ενώνεται μόνο με το DNA.

Ο ρόλος της χρωστικής Giemsa φαίνεται αν εξετασθούν τα χρωμοσώματα πριν και μετά τη ζώνωση, χωρίς όμως να χρησιμοποιηθεί η χρωστική. Μελέτες, που έγιναν με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, έδειξαν μια αναδιάρθρωση της χρωματίνης με κάποια απομάκρυνσή της από τα μεσοδιαστήματα και συσώρευσή της στις ζώνες (7,8). Η αναδιάρθρωση όμως της χρωματίνης μόνη της δεν εξηγεί ικανοποιητικά την G-ζώνωση, γιατί με την απουσία της Giemsa ή θα σχηματισθούν αδύναμες ζώνες ή δεν θα σχηματισθούν καθόλου. Στα ίδια χρωμοσώματα, αν χρησιμοποιηθεί η χρωστική, προκύπτουν εξαιρετικές ζώνες. Συνεπώς η χρωστική Giemsa έχει σημαντική επίδραση στην αποκάλυψη των ζωνών και ο λόγος γι' αυτό είναι σαφής: το DNA της χρωματίνης, που είναι παρόν, είναι ελεύθερο να αντιδράσει με την θειαζίνη. Ένα σημείο που απαιτεί εξήγηση είναι γιατί δεν βάφονται ή βάφονται λίγο οι περιοχές μεταξύ των ζωνών. Σύμφωνα με τον Comings (19) υπάρχουν δύο λόγοι γι' αυτό: (α) υπάρχει λιγότερο DNA και (β) το DNA είναι καλυμμένο από πρωτεΐνες και δεν είναι διαθέσιμο, ώστε να αντιδράσει με τη χρωστική.

Υπέρ της πρώτης άποψης, ότι δηλαδή υπάρχει λιγότερο DNA, συνηγορούν τα εξής:

- (α) η βασική δομή των μεταφασικών χρωμοσωμάτων είναι αυτή των πυκνών σε χρωματίνη χρωμομερών, ενώ η χρωματίνη στα τμήματα μεταξύ των χρωμομερών, είναι πολύ αραιή.
- (β) μελέτες με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου δείχνουν ότι η προηγούμενη δομή ενισχύεται από κάποια ανακατανομή της χρωματίνης.
- (γ) η επεξεργασία των χρωμοσωμάτων με τρυψίνη και με θερμά διαλύματα αλάτων, πιθανώς απομακρύνει ένα μέρος του DNA που βρίσκεται μεταξύ των ζωνών, και
- (δ) η κατανομή της χρωματίνης στα χρωμομερή ταιριάζει με αυτή των G-ζωνών.

Υπέρ της δεύτερης άποψης, ότι δηλαδή το DNA των περιοχών μεταξύ των ζωνών είναι καλυμμένο με πρωτεΐνες, τα πειραματικά δεδομένα έχουν δείξει τα εξής: Η επεξεργασία της χρωματίνης με θερμά διαλύματα αλάτων, έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των φωσφορικών ομάδων που είναι διαθέσιμες να αντιδράσουν με τη χρωστική. Κάτω από κατάλληλες συνθήκες, αλλάζει η κανονική

τριτοταγής δομή των πρωτεϊνών αυτών, η οποία έχει λίγες θέσεις για αντίδραση με το DNA. Έτσι σχηματίζεται μία μετουσιωμένη μορφή, που έχει περισσότερες θέσεις για ιονική ένωση με το DNA. Η μορφή αυτή μετά την απομάκρυνση των συνθηκών μετουσίωσης, καλύπτει περισσότερες φωσφορικές ομάδες του DNA. Εδώ θα πρέπει να σημειωθεί ότι το κοινό στοιχείο όλων των G- μεθόδων είναι η μετουσίωση της πρωτεΐνης ή το σπάσιμο των δισουλφιδικών δεσμών (19).

Ως συμπέρασμα θα μπορούσε να αναφερθεί ότι οι G-ζώνες εμφανίζονται επειδή υπάρχει στα μεταφασικά χρωμοσώματα μια βασική χρωμομερική δομή, που περιμένει να αποκαλυφθεί. Και είναι ακριβώς ο ρόλος της χρωστικής Giemsa, που κάνει την αποκάλυψη αυτή δυνατή.

Η τεχνική της G-ζώνωσης εφαρμόζεται κυρίως σε ζωικά χρωμοσώματα, ενώ έως προσφάτως δεν αποκάλυπτε ζώνες στα φυτά. Ο Greilhuber (30), για να εξηγήσει την απουσία αυτή των G-ζωνών, πρότεινε την άποψη ότι τα φυτικά χρωμοσώματα περιέχουν πολύ περισσότερο DNA στη μετάφαση, απ' ό,τι ίδιου μήκους ζωικά. Για λόγους οπτικούς και τα χρωμοσώματα των σπονδυλωτών ζώων δε θα εμφανίζαν G-ζώνες αν ήταν σε τόσο υψηλό βαθμό συστολής. Το αποτέλεσμα της συμπύκνωσης αυτής των φυτικών χρωμοσωμάτων είναι ότι οι G-ζώνες βρίσκονται τόσο κοντά ή μια στην άλλη, ώστε να μην είναι δυνατό να αποκαλυφθούν με το μικροσκόπιο. Η υπόθεση αυτή καταρρίφθηκε στην αρχή από τους Anderson κ. α. (2). Οι ερευνητές αυτοί, μετά από μετρήσεις που έκαναν, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι δεν υπάρχουν διαφορές μεταξύ ζωικών και φυτικών χρωμοσωμάτων, ως προς το βαθμό συστολής. Οι Wang και Kao (64) τέλος, πέτυχαν να αναπτύξουν την τεχνική της G-ζώνωσης σε χρωμοσώματα του *Vicia hajastava*.

3. Τεχνική της Q-ζώνωσης

Είναι η πιο παλιά τεχνική ζώνωσης. Αναπτύχθηκε από τον Caspersson και την ομάδα του (10, 11), οι οποίοι χρησιμοποίησαν την κινακρίνη (quinacrine mustard, Q=quinacrine) για την εκλεκτική βαφή χρωμοσωμάτων. Σκοπός της τεχνικής αυτής ήταν να διαπιστωθεί κατά πόσο η κινακρίνη αντιδρά κατά προτίμηση με DNA πλούσιο σε Γουανίνη (G) και Κυτοσίνη (C). Όπως έδειξαν *in vitro* πειράματα (65) DNA πλούσιο σε Αδενίνη (A) και Θυμίνη (T) αύξησε τον φθορισμό της κινακρίνης ενώ DNA πλούσιο σε Γουανίνη (G) και Κυτοσίνη (C) είχε το αντίθετο αποτέλεσμα. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώθηκε αργότερα και από πολλά άλλα εργαστήρια (49, 24, 38, 16, 18). Ορισμένες από τις εργασίες αυτές έδειξαν ότι και μη ιστονικές πρωτεΐνες παίζουν κάποιο ρόλο στην Q-ζώνωση, εμποδίζοντας την είσοδο της κινακρίνης σε περιοχές πλούσιες σε Γουανίνη (G) και Κυτοσίνη (C) (38, 16). Σημαντικό ερώτημα δημιουργήθηκε από την αποτυχία της βαφής ορισμένων περιοχών, όπου βάσει του περιεχομένου τους σε Αδενίνη (A) και Θυμίνη (T), θα έπρεπε να σχηματισθούν Q-ζώνες (60, 18). Η βαφή απέτυχε επίσης σε περιοχές κεντρομερικού DNA, που αποτελούνταν από αλληλουχίες δορυφορικού DNA φτωχού σε Γουανίνη (G) και Κυτοσίνη (C) (12, 55, 60). Για να εξηγηθούν οι παρατηρήσεις αυτές προτάθηκε ότι θα πρέπει να υπάρχουν κάποια ζεύγη βάσεων Γουανίνης (G) και Κυτοσίνης (C) τοποθετημένα σε στρατηγικά σημεία. Η παρουσία των ζευγών αυτών αναστέλλει το φθορισμό της κινακρίνης παρά το πλούσιο σε Αδενίνη (A) και Θυμίνη (T) περιεχόμενο του DNA.

4. Τεχνικές της R- και T-ζώνωσης

Η R-ζώνωση ονομάζεται και αντίστροφη ζώνωση (R=reverse). Αναπτύχθηκε από τους Dutrillaux και Lejeune το 1971 (19), που τοποθέτησαν χρωμοσώματα σε 20mM Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (pH=6,5, στους 87°C για 10 λεπτά) και κατόπιν χρησιμοποίησαν για τη βαφή τους τη χρωστική Giemsa. Τα χρωμοσώματα αυτά εξετάστηκαν σε μικροσκόπιο αντιθέτων φάσεων. Παρατηρήθηκε ότι ενώ οι περιοχές που αντιστοιχούν στις G-ζώνες είχαν μείνει άβαφες, οι περιοχές μεταξύ των G-ζωνών είχαν βαφεί. Οι ζώνες αυτές που υπάρχουν μεταξύ των G-ζωνών ονομάστηκαν R-ζώνες. Η R-ζώνωση είναι ιδιαίτερος χρήσιμη όταν εξετάζονται αλλαγές ή ελλείψεις, που περιλαμβάνουν χρωμοσωματικά άκρα. Υπάρχει και μια παραλλαγή της τεχνικής αυτής που λέγεται T-ζώνωση (T=telomers), με την οποία βάφονται μόνο τα τελομερή.

Από τις μελέτες που ακολούθησαν, έγινε φανερό πως η βαφή επεξεργασμένων χρωμοσωμάτων με πορτοκαλί της ακριδίνης (acridine orange) είχε ως αποτέλεσμα έντονη R-ζώνωση. Οι ακόλουθες παρατηρήσεις συνηγορούν ότι κύριος παράγοντας σχηματισμού των R-ζωνών είναι η σχετική τους αφθονία σε Γουανίνη (G) και Κυτοσίνη (C) (19):

- (α) οι μόνες επεξεργασίες, που αποδίδουν σταθερώς R-ζώνες, είναι αυτές που μετουσιώνουν εκλεκτικά DNA πλούσιο σε Α·-δερίνη (A) και Θυμίνη (T), ενώ δεν θίγουν το DNA που είναι πλούσιο σε Γουανίνη (G) και Κυτοσίνη (C).
- (β) το πορτοκαλί της ακριδίνης βάφει κόκκινο το DNA μονής αλυσίδας και πράσινο το DNA διπλής αλυσίδας (double stranded). Έτσι όταν κεντρομερική ετεροχρωματίνη, πλούσια σε Αδερίνη (A) ή Θυμίνη (T) υπόκειται σε R-ζώνωση, τότε βάφεται κόκκινη με το πορτοκαλί της ακριδίνης. Αντίθετα, κεντρομερική ετεροχρωματίνη πλούσια σε Γουανίνη (G) ή Κυτοσίνη (C) βάφεται πράσινη. Τα αποτελέσματα αυτά είναι αναμενόμενα, γιατί DNA πλούσιο σε Αδερίνη (A) ή Θυμίνη (T) μετουσιώνεται ευκολότερα από DNA που είναι πλούσιο σε Γουανίνη (G) ή Κυτοσίνη (C).
- (γ) η επιβεβαίωση της υπόθεσης ότι η σύνθεση των βάσεων είναι ο αποφασιστικός παράγοντας για την R-ζώνωση προέρχεται από τη χρησιμοποίηση ορισμένων φθορίζουσών ενώσεων. Οι ενώσεις αυτές ενώνονται κατά προτίμηση με DNA πλούσιο σε Γουανίνη (G) ή Κυτοσίνη (C).

Ένα σημείο της R-ζώνωσης, που παραμένει σκοτεινό είναι η εμφάνιση των ζωνών, όταν χρησιμοποιηθεί αντί του πορτοκαλί της ακριδίνης η χρωστική Giemsa. Να σημειωθεί ότι η χρωστική Giemsa αντιδρά καλύτερα με μετουσιωμένο DNA (1,17). Ως πιθανή εξήγηση έχει προταθεί ότι οι χρησιμοποιούμενες θερμοκρασίες προκαλούν μερική απομάκρυνση του μετουσιωμένου DNA των G-ζωνών, όχι όμως και του DNA των R-ζωνών (19).

Τέλος, πειράματα με τριπωμένη θυμιδίνη έδειξαν ότι το πρώτο αναδιπλασιαζόμενο DNA (early replicating DNA) είναι πλούσιο σε Γουανίνη (G), Κυτοσίνη (C), ενώ το αργά αναδιπλασιαζόμενο DNA (late replicating) είναι πλούσιο σε Αδερίνη (A), Θυμίνη (T) (13). Οι Q-και G-ζώνες αποτελούνται από DNA πλούσιο σε Αδερίνη (A), Θυμίνη (T), που είναι αργά αναδιπλασιαζόμενο, ενώ οι R-ζώνες

ΠΙΝΑΚΑΣ 2-TABLE 2.

Στάδια εφαρμογής μεθοδολογίας της N-ζώνωσης (56).

Application steps of a N-banding procedure (56).

1. Φύτρωμα σπόρων:	σε υγρό χάρτινο pH=6, στους 21°C.
2. Αρχική μεταχείριση:	ρίζες μήκους 1-2cm τοποθετούνται σε αποσταγμένο νερό, σε πάγο, στους 0°C για 24 ώρες.
3. Σταθεροποίηση:	σε διάλυμα 3:1 (απόλυτη αλκοόλη:οξικό οξύ), στους +4°C, για διάστημα έως 2 εβδομάδες.
4. Αρχική βαφή:	σε διάλυμα 1% οξικής καρμίνης (acetocarmine), για 1 ώρα.
5. Παρασκευάσματα:	με σύνλιψη σε μία σταγόνα 45% οξικού οξος-απομάκρυνση καλυπτρίδας (μέθοδος CO ₂).
6. Στέγνωμα:	στον αέρα, στους 24±2°C, για 1,5 ώρα.
7. Υδρόλυση:	σε 45% οξικό οξύ, στους 60°C, για 10 λεπτά.
8. Στέγνωμα:	στον αέρα, στους 24±2°C, για 1,5 ώρα.
9. Αφυδάτωση:	σε 96% αλκοόλη, στους 24±2°C, για 30 λεπτά.
10. Στέγνωμα:	ολονύκτια, στους 24±2°C.
11. Επώαση:	σε βραστό 1M NaH ₂ PO ₄ (pH=4,2), στους 92±2°C, για 2 λεπτά.
12. Πλύση:	σε αποσταγμένο νερό, στους 24±2°C, για 1 λεπτό.
13. Βαφή:	σε διάλυμα 2% Giemsa (σε 0,1M φωσφορικό ρυθμιστικό, pH=6,8), στους 24±2°C, για 30 λεπτά.
14. Πλύση:	με εμβάπτιση σε αποσταγμένο νερό, στους 24±2°C.
15. Στέγνωμα:	ολονύκτια, στους 24±2°C.

από DNA πλούσιο σε Γουανίνη (G), Κυτοσίνη (C), που είναι πρώιμα αναδιπλασιαζόμενο (19).

5. Τεχνική της N-ζώνωσης

Η τεχνική αυτή αναπτύχθηκε από τους Matsui και Sasaki (44), που θέλησαν να βαφεί η περιοχική του οργανωτή του πυρηνίσκου (N=nucleolar). Οι ερευνητές αυτοί με βάση τα υπάρχοντα κυτταρολογικά και βιοχημικά δεδομένα, πρότειναν ότι οι N-ζώνες αντιπροσωπεύουν ορισμένες μη ισοτονικές πρωτεΐνες, που είναι συνδεδεμένες με την περιοχική του οργανωτή του πυρηνίσκου (44). Από νεώτερες όμως μελέτες προέκυψε ότι τουλάχιστο στη *Drosophila melanogaster*, αλλά και σε αρκετά θηλαστικά, οι N-ζώνες δεν ανταποκρίνονται σε περιοχές οργανωτή του πυρηνίσκου (25, 52). Τέλος, άλλα προκαταρκτικά πειράματα έδειξαν ότι οι N-ζώνες αντιπροσωπεύουν θέσεις που καταλαμβάνονται από δορυφορικό DNA, που περιέχει πολυπυριμιδικά ίχνη (26).

Η N-ζώνωση (Πίν. 2), μαζί με τη C-ζώνωση, έχουν αποδειχθεί ότι είναι οι καλύτερες τεχνικές για φυτικά υλικά (26). Χρησιμοποιούνται στην αναγνώριση χρωμοσωμάτων, στην ανίχνευση μετατοπίσεων και στην απομόνωση σειρών, όπου υπάρχει κάποια χρωμοσωματική αντικατάσταση (35).

ΧΡΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΕΠΙΤΕΥΓΜΑΤΑ

Πολλές από τις χρήσεις και τα επιτεύγματα των τεχνικών ζώνωσης των χρωμοσωμάτων των φυτών έχουν ήδη αναφερθεί. Στα φυτικά υλικά, που ενδιαφέρουν την εργασία αυτή, έχουν χρησιμοποιηθεί όλες οι τεχνικές. Με την εύρεση και καθιέρωση νέων μεθόδων της τεχνικής της G-ζώνωσης πιστεύεται ότι θα προκύψουν νεότερα και λεπτομερέστερα στοιχεία αναγνώρισης των χρωμοσωμάτων των φυτών. Γενικά, πάντως, είναι δυνατό να αναφερθεί ότι οι τεχνικές αυτές (και ειδικά η C- και N-ζώνωση) έχουν συμβάλει ουσιαστικά στη διαλεύκανση της δομής και οργάνωσης των χρωμοσωμάτων (63). Επίσης στην αναγνώριση και διαπίστωση μη ομαλών χρωμοσωματικών καταστάσεων, όπως είναι οι αναστροφές (inversions), τα ελλείμματα (deletions), οι μετατοπίσεις (translocations) και οι αντικαταστάσεις (substitutions) (47).

Έχουν χρησιμοποιηθεί σε συσχετίσεις γενετικών δεδομένων με κυτταρολογικά, κάτι που βοηθά στην κατανόηση των μηχανισμών, αλλά και των συνεπειών των χρωμοσωματικών αναδιαρθρώσεων.

Αποφασιστικός ήταν ο ρόλος των τεχνικών αυτών στην κατασκευή γονιδιακών χαρτών και στην εύρεση γονιδιακής σύνδεσης και συμπληρωματικότητας (63). Τέλος οι τεχνικές ζώνωσης των χρωμοσωμάτων έχουν χρησιμοποιηθεί σε εξελικτικές μελέτες, τόσο σε ζωικούς όσο και σε φυτικούς οργανισμούς. Παρακάτω, αναφέρονται ορισμένα χαρακτηριστικά παραδείγματα εργασιών αυτού του είδους σε φυτικούς οργανισμούς:

- (α) Οι Natarajan και Sharma (45) μελέτησαν την κατανομή των C-ζωνών σε χρωμοσώματα διπλοειδών, τετραπλοειδών και εξαπλοειδών σιτηρών. Από την εργασία αυτή προέκυψε ότι τα χρωμοσώματα του B γενώματος κατέχουν χαρακτηριστικές ζώνες. Από τους προταθέντες δότες του B γενώματος το *Aegilops speltoides* έχει παρόμοιες ζώνες και γι' αυτό θεωρήθηκε ως δότης του B γενώματος. Όμως βρέθηκε ότι και άλλα είδη *Aegilops* έχουν αρκετά παρόμοιες C-ζώνες με το *Aegilops speltoides*, γι' αυτό έχει προταθεί η θεωρία της πολυφυλετικής καταγωγής του πολυπλοειδούς σιταριού.
- (β) Οι Gill και Kimber (29) συνέκριναν τις C-ζώνες των διπλοειδών ειδών *T.monococcum*, *Ae.speltoides* (ή *T. speltoides*, σύμφωνα με τη νέα ονοματολογία) (59) και *Ae. squarrosa* (ή *T.tauschii* σύμφωνα με τη νέα ονοματολογία) με τις αντίστοιχες των A,B και D γενωμάτων του εξαπλοειδούς σιταριού. Από τις συγκρίσεις αυτές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το *Ae.speltoides* δε θα μπορούσε να είναι ο δότης του B γενώματος. Το *T.monococcum* όμως και το *Ae. squarrosa* είναι οι πιθανοί δότες των A και D γενωμάτων του μαλακού σιταριού, αντίστοιχα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. AHNSTROM, G. and NATARAJAN, A. T., 1974. Localization of repetitive DNA in mouse cells by in situ hybridization and dye binding techniques. *Hereditas*, 76:316-320.
2. ANDERSON, L. K., STACK, S. and MITCHELL, J. B., 1982. An investigation of the basis of a current hypothesis for the lack of G-banding in plant chromosomes. *Exp. Cell Res.*, 138:431-436.

3. BADAEV, N. S., BADAeva, E.D., BOLSHEVA, N.L., MAXIMOV, N. G. and ZELININ, A. V., 1985. Cytogenetic analysis of forms produced by crossing hexaploid triticale with common wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 70:536-541.
4. BEBELI, P. J. and KALTSIKES, P. J., 1985. Karyotypic analysis of two durum wheat varieties. *Can. J. Genet. Cytol.*, 27:617-621.
5. BENNETT, M. D., 1977. Heterochromatin, aberrant endosperm nuclei and grain shrivelling in wheat-rye genotypes. *Heredity*, 39:411-419.
6. BROWN, W. V., 1972. Textbook of Cytogenetics. C. V. Mosby Co St. Luis 346p.
7. BURKHOLDER, G. D., 1974. Electron microscopic visualization of chromosomes banded with trypsin. *Nature*, 247:292-294.
8. BURKHOLDER, G. D., 1975. The ultrastructure of G- and C-banded chromosomes. *Exp. Cell Res.*, 90:269-278.
9. ΓΕΩΡΓΙΟΥ, Α., 1988. Χρωμοσωμικός πολυμορφισμός σε διπλοειδή Triticeae (*Aegilops*, *Agropyron*, *Hordeum*) του Ελλαδικού χώρου, με την τεχνική της C-ζώνωσης. Διδακτορική Διατριβή. Θεσσαλονίκη 124 σελ.
10. CASPERSSON, T., ZECH, L., MODEST, E. J., FOLEY, G. E., WAGH and SIMONSSON, E. 1969a. DNA-binding fluorochromes for the study of the organization of the metaphase nucleus. *Exp. Cell Res.* 58:141-152.
11. CASPERSSON, T., ZECH, L., MODEST, E. J., FOLEY, G. E., WAGH, U. SIMONSSON, E., 1969b. Chemical differentiation with fluorescent alkylating agents in *Vicia faba* metaphase chromosomes. *Exp. Cell Res.*, 58:128-140.
12. COMINGS, D. E., 1971. Heterochromatin of the Indian Muntjac. Replication, condensation, DNA ultracentrifugation fluorescent and heterochromatin staining. *Exp. Cell Res.*, 67:441-460.
13. COMINGS, D. E., 1972. Replicative heterogeneity of mamalian DNA. *Exp. Cell Res.*, 71:106-112.
14. COMINGS, D. E., AVELINO, E., OKADA, T. A. and WHANDT, H. E., 1973. The mechanism of C- and G-banding of chromosomes. *Exp. Cell Res.*, 77:469-493.
15. COMINGS, D. E., 1975. Mechanisms of chromosome banding. IV. Optical properties of the Giemsa Dyes. *Chromosoma*, 50:89-110.
16. COMINGS, D. E., KOVACS, B. W., AVELINO, E. and HARRIS, D., 1975. Mechanisms of chromosome banding. V. Quinacrine banding. *Chromosoma*, 50:111-145.
17. COMINGS, D. E. and AVELINO, E., 1975. Mechanisms of chromosome banding. VII. Interaction of methylene blue with DNA and chromatin. *Chromosoma*, 51:365-381.
18. COMINGS, D. E. and DRETS, M. E., 1976. Mechanisms of chromosome banding. IX. Are variations in DNA base composition adequate to account for quinacrine, Hoechst 33258 and daunomycin banding? *Chromosoma*, 56:199-211.
19. COMINGS, D. E., 1978. Mechanisms of chromosome banding and implication for chromosome structure. *Anu. Rev. Genet.*, 12:25-46.
20. DARVEY, N. L. and GUSTAFSON, J. P., 1975. Identification of rye chromosomes in wheat-rye hybrids, addition lines and triticale by heterochromatic bands. *Crop Sci.*, 15:239-243.
21. DILLE, J. E., GUSTAFSON, J. P., BROWN Jr., M., APPELS, R. and CRAIG, S., 1987. Topographical changes in rye chromosome ultrastructure caused by C-banding procedure. *Genome*, 29:817-822.
22. DOBEL, P., RIEGER, P. and MICHAELIS, A., 1973. The Giemsa banding patterns of the standard and four reconstructed Karyotypes of *Vicia Faba*. *Chromosoma*, 43:409-422.
23. DULJIN, P., PROOIJEN-KNEG, A. G. and PLOEG, M., 1985. The involvement of nucleosomes in Giemsa staining of Chromosomes. A new hypothesis on the banding mechanism. *Histochemistry*, 82:363-376.

24. ELLISON, J. R., and BARR, H. J., 1972. Quinacrine fluorescence of specific chromosome regions. Late replication and high A:T content in *Samoala leonensis*. *Chromosoma*, 36:375-390.
25. FAUST, J. and VOGEL, W., 1974. Are N-bands selective staining of specific heterochromatin? *Nature*, 249:352-353.
26. GERLACH, W. L., 1977. N-banded karyotypes of wheat species. *Chromosoma*, 62:49-56.
27. GILL, B. S. and KIMBER, G., 1974a. A Giemsa C-banding technique for cereal chromosomes. *Cereal Res. Commum*, 2:87-94.
28. GILL, B. S. and KIMBER, G., 1974b. A Giemsa C-banding karyotype of rye. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 71:1247-1249.
29. GILL, B. S. and KIMBER, G., 1974c. Giemsa C-banding and the evolution of wheat. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 71:4086-4090.
30. GREILHUBER, J., 1977. Why plant chromosomes do not show G-bands. *Theor. Appl. Genet.*, 50:121-124.
31. GUERRA M. dos S., 1985. Cytogenetics of rutaceae. III. Heterochromatin patterns. *Caryologia*, 38:335-346.
32. GUSTAFSON, J. P., LUKASZEWSKI, A. and BENNETT, M. D., 1983. Somatic delation and redistribution of telomeric heterochromatin in the genus *Secale* and in triticale. *Chromosoma*, 88:293-298.
33. HADLACZKY, C. V. and KALMAN, L., 1975. Discrimination of homologous chromosomes of maize with Giemsa staining. *Heredity*, 35:371-374.
34. HSU, T. C. and ARRIGHI, F. E., 1973. Chromosome identification. 23rd Nobel Symposium. Stockholm, 1972. pp 307-314. Edited by T. Caspersson and L. Zech. Academic Press, New York.
35. ISLAM, A. K. M. R., 1980. Identification of wheat-barley addition lines with N-Banding of chromosomes. *Chromosoma*, 76: 365-373.
36. JACK, M., HARRIS, C. J., ALLEN, T. D. and MORRIS, R., 1985. The structural basis for C-banding. A scanning electron microscopy study, *Chromosoma* 91:363-368.
37. JOSHI, C. P. and RANJEKAR, P. K., 1983. Mechanism of HCl-Giemsa banding technique. *Nucleus*, 26:35-48.
38. LATT, S. A., BRODIE, S. and 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.
39. LIMA-de-FARIA, A. and JAWORSKA, H., 1972. The relationship between chromosome size gradient and the sequence of DNA replication in rye. *Heredity*, 70:39-58.
40. LINDE-LAURSEN, I., 1975. Giemsa C-banding of the chromosomes of 'Emir' barley. *Hereditas*, 81:285-289.
41. LINDE-LAURSEN, I., 1979. Giemsa C-banding of barley chromosomes. III. Segregation and linkage of C-bands on chromosomes 3, 4, 7. *Hereditas*, 91:73-77.
42. LUKASZEWSKI, A. and GUSTAFSON, J. P., 1983. Translocations and modifications of chromosomes in triticale X wheat hybrids. *Theor. Appl. Genet.*, 64:239-248.
43. MARGARIDA, L. R. and PERECIN, A., 1985. C-banding in maize. I. Band patterns. *Caryologia*, 38:23-30.
44. MATSUI, S. and SASAKI, M., 1973. Differential staining of nucleolus organisers in mammalian chromosomes. *Nature*, 246:148-150.
45. NATARAJAN, A. T. and SHARMA, N. P., 1974. Chromosome banding patterns and the origin of the B genome in wheat. *Genet. Res.*, 24:103-108.
46. NODA, K. and KASHA, K. J., 1978. A proposed barley karyotype. Revision based on C-band chromosome identification. *Crop Sci.*, 18:923-930.
47. ΞΥΝΙΑΣ, Ι. Ν., 1990. Αριθμός χρωμοσώμων σίκαλης σε τέσσερις ελληνικές ποικιλίες τριτικάλι (X *Triticosecale* Wittmack). Μεταπτυχιακή Διατριβή. Θεσσαλονίκη 67 σελ.
48. OWEN, M. R. and LARTER, E. N., 1988. The quantitative relationship between telomeric heterochromatin and secalin synthesis in *Secale cereale* L. *Euphytica* 39:279-284.
49. PACHMANN, U. and RIGLER, R., 1972. Quantum yield of acridines interacting with DNA of defined base sequence. *Exp. Cell Res.*, 72:602-608.
50. PARDUE, M. L. and GALL, E., 1970. Chromosome localization of mouse satellite DNA. *Science*, 168:1356-1358.
51. PATHAK, S. and ARRIGHI, F. E., 1973. Loss of DNA following C-Banding procedures. *Cytogenetics Cell Genet.*, 12:414-422.
52. PIMPINELLI, S., SANTINI, G. and GATTI, M., 1976. Characterization of *Drosophila* heterochromatin. II. C- and N-banding. *Chromosoma*, 57:377-386.
53. REN, Z. L., LELLEY, T. and ROBBELLEN, G., 1990. The use of monosomic Rye addition lines for transferring Rye chromatin into bread wheat. I. The occurrence of translocations. *Plant Breed.*, 105:257-264.
54. ROUPAKIAS, D. G. and KALTSIKES, P. J., 1977. The effect of telomeric heterochromatin on chromosome pairing of hexaploid triticale. *Can. J. Genet. Cytol.*, 19:543-548.
55. ROWLEY, J. D. and BODMER, W. F., 1971. Relationship of centromeric heterochromatin to fluorescent banding patterns of metaphase chromosomes in the mouse. *Nature*, 231: 503-506.
56. SCHLEGEL, R., WERNER, T. and HULGENHOF, E., 1991. Confirmation of a 4BL/5RL Wheat-Rye chromosome translocation line in the Wheat cultivar 'Viking' showing high copper efficiency. *Plant Breed*, 107:226-234.
57. SCHULZ-SCHAEFFER, J., 1980. Cytogenetics. Springer-Verlag, New York 446p.
58. SEAL, A. G. and BENNETT, M. D., 1981. The rye genome in winter hexaploid triticales. *Can. J. Genet. Cytol.*, 23: 647-653.
59. SEARS, E. R. 1975. The wheats and their relatives. In King, R. C. (ed.) *Handbook of Genetics*, Vol. 2, pp59-91 Plenum Press.
60. SIMOLA, K., SELANDER, R. K., CHAPPELL, de la A., CORNEO, G. and GINELLI, E., 1975. Molecular basis of chromosome banding. I. Effect of mouse DNA fractions on two fluorescent dyes in vitro. *Chromosoma*, 51:199-205.
61. SINGH, R. J. and ROBBELLEN, G., 1976. Giemsa banding technique reveals delations within rye chromosomes in addition lines. *Z. Pflanzennzucht*, 76:11-18.
62. VOSA, C. G., 1974. The basic karyotype of rye (*Secale cereale*) analysed with Giemsa and fluorescence methods. *Heredity*, 33:403-408.
63. VOSA, C. G., 1975. The use of Giemsa and other staining techniques in karyotype analysis. *Current Adv. in Pl. Sci.*, 14:495-503.
64. WANG, H. C. and KAO, K. N. 1988. G-banding in plant chromosomes. *Genome*, 30:48-51.
65. WEISBLUM, B. and HASETH, de, P. L., 1972. Quinacrine, a chromosome stain specific for deoxyadenylate-deoxythymidylate-rich regions in DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 69: 629-632.

Banding techniques for identification of plant chromosomes

I. N. Xynias

Cereal Institute of Thessaloniki, N.A.G.RE.F.

SUMMARY

This paper is concerned with the Banding Techniques of the plant chromosomes, which have been developed since 1970. Six different Banding Techniques are described. It was attempted to refer all different theories, which try to explain the formation of the Bands. In the cases where more than one theory has been proposed, all of them are presented, but in details only the predominant one. Finally, there is a small report on the achievements of Banding Techniques, regarding the recognition and the identification of plant chromosomes.