

*Manfred B. Klinkhardt*

## **Optimierung einer Methode zur Chromosomenpräparation aus Fischlaich**

### **Einleitung**

Für unsere zytogenetischen Untersuchungen an Heringen konnten die bisherigen methodischen Erfahrungen (KLINKHARDT 1990, KLINKHARDT und BUUK 1990, KLINKHARDT 1991) nur bedingt übernommen werden. Üblicherweise werden nämlich die Fische vor der Organentnahme einer mitostatischen Behandlung unterzogen, um die Ausbeute an auswertefähigen Mitosefiguren zu erhöhen. Dazu injizieren wir vorbereitend intramuskulär bzw. intraperitoneal eine Colchizin enthaltende Ringerlösung, welche die Teilungsaktivität im Stadium der Metaphase blockt. Die notwendige Einwirkungszeit, um einen registrierbaren Effekt zu erzielen, hängt von zahlreichen Faktoren ab (Konzentration und Dosis des Colchizins, Alter des Fisches, natürliche Teilungsrate im zu untersuchenden Organ u.a.m.). Mindestens sollte die Wartezeit jedoch die Hälfte der Gesamtdauer des stark temperaturabhängigen mitotischen Zyklus (Richtwert ca. 2-4 Stunden) betragen. Orientierende Untersuchungen im Jahr 1989 belegten zwar die prinzipielle Machbarkeit des Präparationsverfahrens auch bei Heringen, jedoch standen bei Verwendung adulter Tiere die erzielten Resultate in einem ungünstigen Verhältnis zur Ausbeute an Metaphasen, wodurch sich der anschließende Auswertungsaufwand (vor allem für die Durchmusterung der Proben unter dem Mikroskop) unverhältnismäßig erhöhte. Und obwohl wir den Fischen so schnell wie möglich, d.h. unmittelbar nach der Entnahme aus der Reuse, das Colchizin injizierten, damit es bereits während der anschließenden Bootsfahrt zum Labor wirken konnte, stellten sich bei den empfindlichen Heringen meist sehr bald infolge dieses "handlings" (vor dem Ablauf der erforderlichen Einwirkungszeit) erhöhte Sterblichkeiten ein.

Aus diesen Gründen entschlossen wir uns, embryonales Gewebe für die Chromosomendarstellung zu nutzen und die notwendigen Präparationsbedingungen in vorherigen Experimenten zu optimieren. Obwohl sich die Verwendung von Fischlaich für solche Untersuchungen eigentlich geradezu anbietet, stößt die praktische Realisierung dieses Vorhabens doch auf einige Schwierigkeiten methodischer Natur, weswegen wohl auch international hiervon kaum Gebrauch gemacht wird. Diese Schwierigkeiten liegen hauptsächlich im Bau der Eier begründet: ein solides Chorion

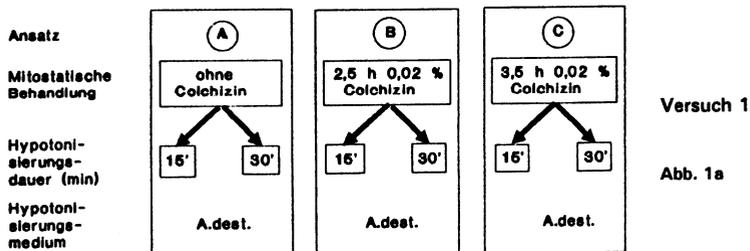
beschützt das Eiinnere, das stark lipophile Dotter behindert das Einwirken der wasserlöslichen Behandlungskomponenten (z.B. Colchizin, später auch die Hypotonisierung) und in der für die Chromosomenpräparation effektivsten Phase der Eientwicklung macht die Keimscheibe in den telolecithalen Eiern nur einen geringen Volumenanteil aus. Man muß also entweder mit hohem präparativem Aufwand die Embryonen aus ihrer Eihülle entnehmen und noch vor der weiteren Behandlung vom Dotter lösen, oder aber durch Modifikation der Behandlungsbedingungen an "kompletten" Eiern die erwünschten Effekte zu erreichen versuchen. LIEDER (u.a. 1953 und 1954) hat in seinen frühen Arbeiten durch Anfertigung einfacher Quetschpräparate viele dieser Probleme umgangen. Jedoch genügen die Qualitäten der durch solche Verfahrensweisen erzielten Metaphaseplatten heutigen Ansprüchen nicht mehr. BAKSI und MEANS (1988) versuchten, die Chromosomenpräparation auf der Basis früher Entwicklungsstadien (Eier und Larven) von *Cyprinodon variegatus* zu verbessern. Ihre Ergebnisse dienten uns hauptsächlich bei der vorliegenden Arbeit als Richtwerte für die Festlegung günstiger Präparationsbedingungen. Ergänzend standen aber auch die Resultate der Untersuchungen von CHOURROUT und HAPPE (1986) an Eiern der Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri*) zur Verfügung.

Aus beiden Arbeiten läßt sich übereinstimmend entnehmen, daß vor allem die ersten zwei Arbeitsschritte (Colchizinbehandlung und Hypotonisierung) bei Verwendung von Eimaterial ausschlaggebend für den späteren Erfolg sind. Die für Fixierung und Färbung besten Bedingungen lassen sich dagegen recht problemlos von anderen Arbeiten direkt übernehmen und waren deshalb für unsere Versuche von vergleichsweise untergeordnetem Rang. Zusätzlich wollten wir bei den Optimierungsversuchen auch noch jenen Abschnitt der Eientwicklung feststellen, der für die Chromosomenpräparation die günstigsten Voraussetzungen bietet, d.h. möglichst viele Mitosefiguren für eine eventuelle Auswertung verfügbar macht.

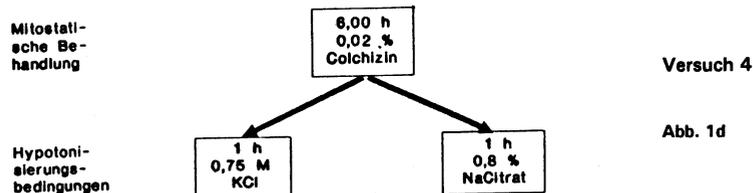
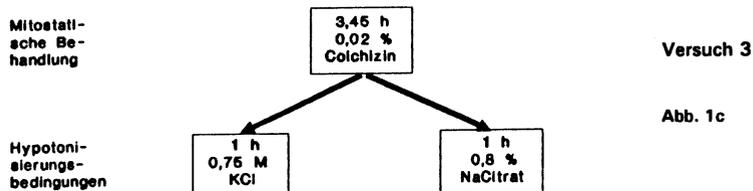
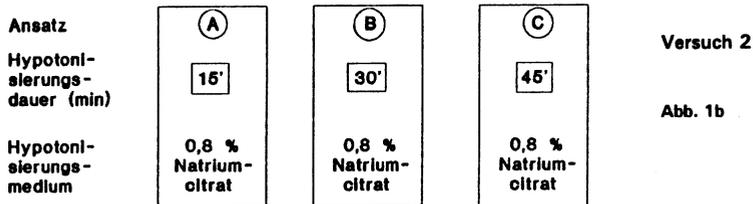
## **Material und Methoden**

Den in einer Reuse des Barther Boddens gefangenen laichreifen Heringen wurden die Geschlechtsprodukte durch Abstreifen entnommen. Nach "künstlichem" Auslösen der Befruchtung (feuchtes Verfahren) entwickelten sich die Eier unter Laborbedingungen in Aquarien, die mit Biotopwasser gefüllt waren, weiter. An 5 charakteristischen Terminen der Embryonalentwicklung (Stadieneinteilung nach KLINKHARDT 1989) entnahmen wir jeweils ein gewisses Quantum des Laiches für die Untersuchungen. Alle vorhandenen Mitosefiguren auf einer determinierten Fläche (5 zufällig verteilte Beobachtungsbahnen des mikroskopischen Gesichtsfeldes) der fertigen Objektträger wurden später ausgezählt und auf diese Termine bzw. Entwicklungsstadien bezogen. Wir modifizierten bei der Präparation der Chromosomen die spezifischen Bedingungen entsprechend Abb.1 a - d. In der Regel waren die kompletten, d.h. unzerstörten Eier diesen Behandlungen ausgesetzt. Die Reagenzien (Colchizin, Hypotonisierungsmedium) wurden dabei direkt dem Erbrütungswasser hinzugefügt. In einigen Fällen haben wir aber auch gewisse Veränderungen

(vgl. Abb. 2) vorgenommen, um beispielsweise nach Beseitigung der Eihüllen die entsprechenden Resultate einer direkten Einwirkung der Behandlungssubstanzen auf die Zellkerne feststellen zu können. Hierfür kamen dann die Embryonen bzw. Embryoteile für die Behandlungsdauer in kleine Petrischalen mit den entsprechenden Medien.



(ohne vorhergehende Colchizinbehandlung)



**Abb. 1** Übersicht der Präparationsbedingungen in den vier grundlegenden Versuchsansätzen

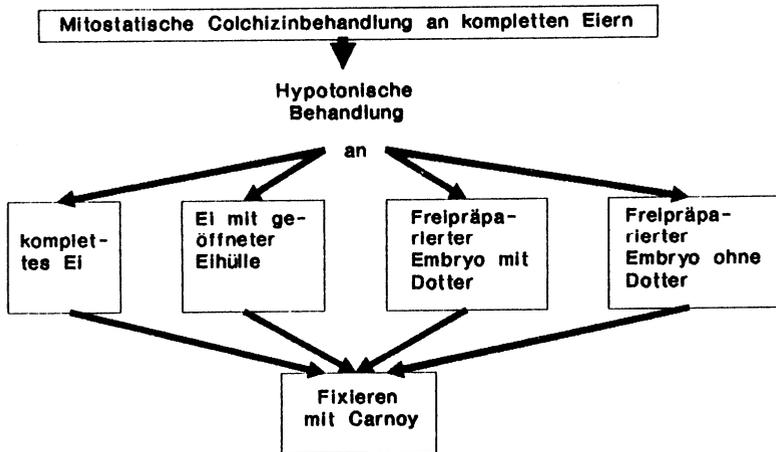


Abb. 2 Darstellung der verschiedenen untersuchten Hypotonisierungsvarianten in den Experimenten

Die weiteren Arbeitsschritte (ab Fixierung) sind in den Darstellungen nicht mit enthalten. Sie lauteten für alle Proben folgendermaßen: mindestens 4 Stunden Fixierung (eiskaltes Carnoy, Methanol : Essigsäure wie 3 : 1), anschließend, falls es sich um komplett-behandelte Eier handelte, mechanisches Aufbrechen der fixierungsbedingt spröden Eihüllen und Entnahme der Embryonen.

In einem Tropfen destillierten Wassers wurden dann die Embryonen direkt auf dem gründlich gereinigten Objektträger mit einem kleinen Skalpell zu einer milchigen Suspension zerkleinert und unter Zugabe von Carnoy über den Objektträger geschwemmt, wodurch das Material fein verteilt wird.

Nach Lufttrocknung und anschließender Lagerung (mindestens 4 Tage) wurde mit 10 % Giemsa (Phosphatpuffer pH 6,8) gefärbt.

Die optische Auswertung der Präparate erfolgte mit einem Mikroskop "Peraval-interphako" von Zeiss (Jena) bei ca. 1400facher Vergrößerung (Ölimmersion).

## Ergebnisse

Auf den fertig präparierten Objektträgern waren in Vielzahl Zellkerne in allen Phasen der Mitose auffindbar. Sehr häufig ließen sich jedoch die einzelnen Teilungsfiguren nicht eindeutig zuordnen, weil die Hypotonisierung mangelhaft war und die Chromosomen mehr oder weniger stark "knäuelartig" einander überlagerten (vgl. Abb. 4).

Aus den Häufigkeiten der Mitosefiguren an den 5 verschiedenen Zeitpunkten der Embryonalentwicklung ist scheinbar ein gewisser Trend zur Verringerung der Teilungsaktivitäten ableitbar (Abb. 3). Hierbei muß aber unbedingt beachtet werden, daß es sich um keine "echten" quantitati-

ven Erhebungen mit vergleichbaren Ausgangsbedingungen (z.B. äquivalente Zellkernanzahlen / Flächeneinheit), sondern lediglich um orientierende Untersuchungen handelte. Sie dienten einzig der Bestimmung jenes Zeitpunktes, zu dem mit einer möglichst großen Anzahl von Mitosen (und darunter auswertungsfähiger Metaphasen) gerechnet werden konnte. Wie Abb.3 zeigt, bietet diesbezüglich vor allem die erste Hälfte der Eientwicklungszeit günstige Voraussetzungen. Mit dem Übergang von Stadium 4 zu Stadium 5 sinkt die "relative Mitosedichte" dann rasch von über 250/Flächeneinheit auf etwa 130 und erreicht vor dem Schlupf sogar nur noch Werte unter 50.

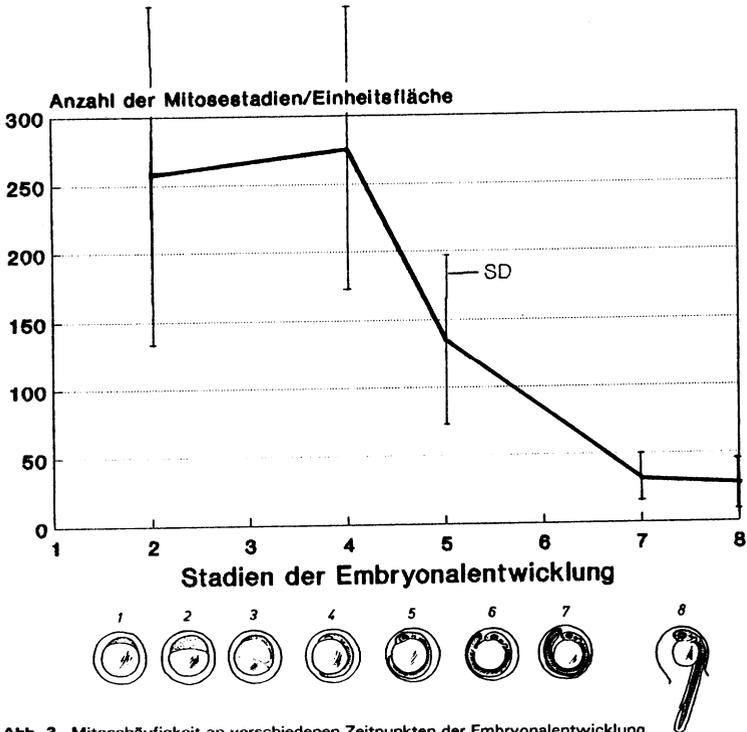
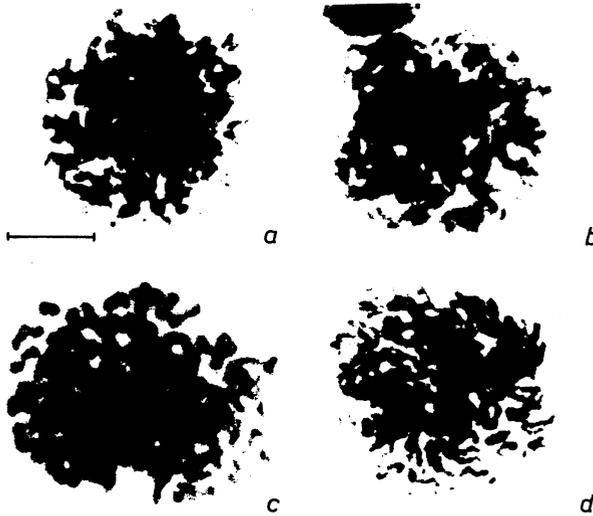


Abb. 3 Mitosehäufigkeit an verschiedenen Zeitpunkten der Embryonalentwicklung (Stadieneinteilung nach KLINKHARDT 1989, 1 = Befruchtung; 8 = Schlupf)

Der Versuch Nr.1 zur Optimierung der Präparationsbedingungen für die Chromosomen erbrachte in allen 3 Ansätzen (A, B und C) nur unbefriedigende Resultate. Zwar ließen sich Mitosefiguren und darunter auch Metaphasen in großer Zahl nachweisen, deren Chromosomen lagen jedoch selbst nach einer 30minütigen Hypotonisierung in destilliertem Wasser immer noch sehr stark übereinander (Abb. 4a und 4b), was eine individuelle Auswertung der einzelnen Elemente absolut unmöglich machte.

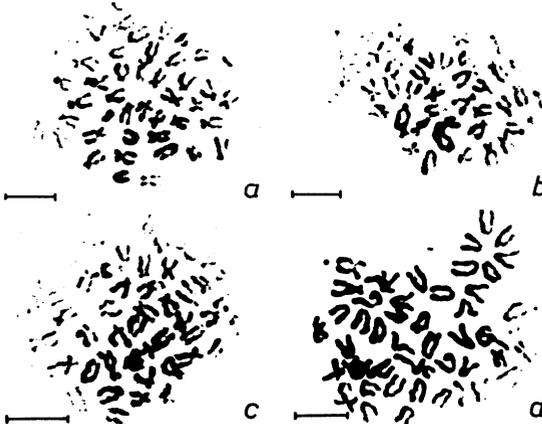
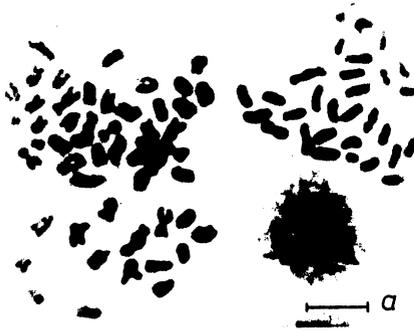


**Abb. 4** Mitosefiguren mit mangelhafter Hypotonisierung  
 a und b - sehr starke Überlagerung bei Anwendung von destilliertem Wasser  
 c und d - Behandlung mit Natriumcitrat (45 min). (Nähere Erläuterung im Text)  
 Strichmarkierung entspricht 10µm

Die Dauer der Colchizinbehandlung hatte keinen nachweisbaren akkumulativen Effekt auf die Anzahl der Mitosen, sogar die völlige Weglassung des Mitostaticums im Versuch Nr. 2 ergab keine nachteiligen Auswirkungen. Allerdings verbesserte sich hier durch den Einsatz von Natriumcitrat der Hypotonisierungserfolg etwas, wenn auch nicht im erwünschten Ausmaß: in Abb. 4 c und d ist erkennbar, daß die Vereinzelung der Chromosomen etwas günstiger ist, was insbesondere für die längste Behandlungsdauer (45 min) zutrifft.

Erst nach nochmaliger Verlängerung der Hypotonisierungsdauer auf 60 min kam es zu einer merklich besseren Darstellbarkeit der Einzelchromosomen (Abb. 5 a und b). Zwar lagen die Chromosomen noch teilweise übereinander, gestatteten aber dabei häufig bereits eine karyologische Auswertung nach den üblichen Kriterien (zentromerischer Index  $I^c$  und relative Länge  $L^R$ ). Nachteilig machten sich jedoch die meist ungleichen Kondensationszustände des Chromatins bemerkbar: entweder waren die Metaphase-Chromosomen sehr stark kontrahiert ("späte Metaphase", individuelle Typansprache nach  $I^c$  unsicher, vgl. Abb. 5 a) oder sie befanden sich noch im Übergang ("Prometaphase",  $L^R$  schwer bestimmbar, vgl. Abb. 5 b).

Diesem Mangel konnte durch Verlängerung der Mitoseblockierungsdauer auf 6 h (Versuch Nr. 4) abgeholfen werden. Nach dieser langen Colchizinbehandlung hatten sich neben den vorher beschriebenen ungünstigen Mitosefiguren auch eine ausreichende Zahl Metaphasen in gut auswert-



barer Konfiguration abgesetzt. An ihnen waren die vorgesehenen Messungen ohne weiteres durchführbar (Abb. 6).

Ob die Darstellbarkeit der Chromosomen durch die Präparation aus der Eihülle entnommener Embryonen verbessert wurde, kann hier nur anhand subjektiver Kriterien bewertet werden. Bei Anwendung der zuletzt genannten, für "komplette" Eier am besten geeigneten Präparationsbedingungen, war jedenfalls kein nennenswerter Unterschied festzustellen, jedoch läßt sich über direkte Einwirkungen der Behandlungsmedien auf die embryonalen Zellen und Gewebe eines freiliegenden, "hüllenlosen" Keimes, die Behandlungszeit merklich verkürzen.

**Abb. 5**  
Verbesserte Darstellung der Metaphaseplatten nach Verlängerung der Hypotonisierungsdauer  
a - gute Vereinzelnung der Chromosomen, aber zu starke Kondensation des Chromatins  
b - Prometaphase mit geringfügigen Überlagerungen (Strichmarkierung entspricht 10 µm)

**Abb. 6**  
Sehr gut auswertbare Metaphasenplatten aus dem Laich von Heringen (*Clupea harengus*) der Darß-Zingster Boddenkette (Strichmarkierung entspricht 10 µm)

## Diskussion

Die konventionellen *in vivo* - Techniken zur Chromosomenpräparation (BLAXHALL 1975, KLIGERMAN und BLOOM 1977) haben in den letzten Jahren zahlreiche Modifikationen erfahren, z.B. durch RIVLIN et al. (1985), REDDY und JOHN (1986), DAS und DAS (1988) oder CATTIN und FERREIRA (1989). Wie wir in einer Übersichtsarbeit zeigen konnten (KLINKHARDT 1991), stellen aber die meisten davon doch nur "Abwandlungen" der herkömmlichen Verfahren dar und basieren außerdem auf der Nutzung der typischen Organe und Gewebe (meist Kopfniere, Kieme oder Milz).

Auch die wenigen, bislang veröffentlichten Untersuchungen zur Karyologie der Heringe (u.a. SKVORCOVA 1974, 1975; DOUCETTE und FITZSIMONS 1988) nutzten diese Möglichkeiten. Allerdings griff ROBERTS (1966) auch bereits auf Zellkulturen von Fibroblasten aus Heringsgonaden zurück, wobei diese Arbeit aber mehr der methodischen Weiterentwicklung von Zellkulturtechniken diene.

Embryonales Gewebe bietet sich aufgrund seines hohen mitotischen Index' für die Chromosomenpräparation geradezu an. Praktisch sind im frühen Abschnitt der Individualentwicklung Teilungsstrukturen (Metaphaseplatten) jederzeit in großer Zahl verfügbar und liefern bei optimalen Behandlungsbedingungen auch qualitativ hochwertige Chromosomenbilder. Somit läßt sich der vielleicht etwas größere präparatorische Aufwand bei der Herstellung der Objektträger ohne weiteres rechtfertigen.

Wesentlich ist bereits die Wahl des günstigsten Zeitpunktes für die Präparation der Eier. Hier decken sich unsere Befunde mit den Angaben von CHOURROUT und HAPPE (1986), die gleichfalls ein recht deutliches Absinken der Anzahl lesbarer Metaphasen in der zweiten Hälfte der Entwicklung für *Salmo gairdneri* konstatierten. Auch BOLLA (1987) gibt an, daß bei ihren Untersuchungen an Eiern von *Salmo salar* und *Salmo gairdneri* beste Ergebnisse zum Zeitpunkt der Gastrulation erzielbar waren (etwa 50 d° für *S. salar* bzw. 37 d° für *S. gairdneri*, d° = Tagesgrade) und die Teilungsrate dann mit Erreichen des Augenpunktstadiums deutlich absank. Hier gilt es, in der Praxis einen akzeptablen Kompromiß zwischen möglichst hoher Mitosezahl und Präparationsfähigkeit der Objekte zu finden, denn während der Gastrulation bedeckt das Blastoderm nur als relativ dünne Zellschicht die vergleichsweise voluminöse Dotterkugel und ist demzufolge recht schwer zugänglich.

Der störende Einfluß des lipophilen Dotters läßt sich im einfachsten Fall durch dessen mechanische Entfernung eliminieren. Mit entsprechenden Werkzeugen und etwas Geschick läßt sich das in einer ca. 0,9 %igen Ringerlösung gut realisieren. BOLLA (1987) verfuhr in dieser Art und Weise und unterzog den Embryo anschließend einer Kurzzeitzellkultur (3 h für Gastrula- und 4 h für spätere Stadien), wobei sie dem Medium direkt Colchizin zur Mitoseblockung zusetzte. CHOURROUT und HAPPE (1986) inkubierten über Nacht komplette Eier in 0,02 % Colchizininlösung und entnahmen erst danach die Embryonen den Eihüllen (in einer 0,8 % NaCl-Lösung). In ihren Ver-

suchsserien variierten BAKSI und MEANS (1988) die Colchizin-Behandlungszeiten (von 2,5 bis 7,0 h) und -Konzentrationen (von 0,005 bis 0,2 %). Als optimal erwies sich die Prozedur bei 0,05 % und 4 h für Eier und Larven von *Cyprinodon variegatus*. Nach unseren Erfahrungen aus den Untersuchungen sollte auch für Heringseier eine Behandlungsdauer von 4-5 Stunden nicht unterschritten werden (bei einer Colchizinkonzentration von 0,02 %).

Für karyologische Studien an reifen, abgelaichten Eier der Amerikanischen Auster *Crassostrea virginica*, deren optisch dichtes Dotter die Betrachtung der Chromosomen nahezu unmöglich macht, empfehlen LONGWELL und STILES (1968) die Extraktion des Dotters mit einer modifizierten Soxhlet-Technik (Chloroform und Methylalkohol) im Anschluß an die Carnoy-Fixierung. Möglicherweise läßt sich dieses an Eiern der *Lamellibranchiata* erprobte Verfahren zukünftig auch auf Fischlaich übertragen.

Eine Hypotonisierungsdauer von 1 h war bei unseren Versuchen am besten für die Aufspaltung der Chromosomen geeignet. Dabei spielte es keine Rolle, ob KCl oder Natriumcitrat verwendet wurde. Offensichtlich ist die Einwirkungsdauer von gravierenderer Bedeutung, als das Hypotonisierungsmedium. Überraschenderweise erwies sich der Einsatz von destilliertem Wasser als nicht so günstig. Immerhin erzielten BAKSI und MEANS (1988) durch 90minütige Einwirkung destillierten Wassers beste Resultate, während bei ihnen die 0,4 %ige KCl-Lösung nur unbefriedigende Ergebnisse erbrachte (Behandlungsdauer 10, 15, 30 oder 60 min). Vermutlich hätten wir die Behandlungsdauer bei unseren Experimenten auch noch deutlicher verlängern müssen. CHOURROUT und HAPPE (1986) favorisieren für die Hypotonisierung 0,8 %iges Trinatriumcitrat, welches sie aber 30 min lang auf freipräparierte, hüllenlose Embryonen einwirken ließen. In den Kurzzeitzellkulturen von BOLLA (1987) genügte sogar ein 5minütiger Aufenthalt der Zellen (!) in 0,075 M KCl. Die Bedingungen für eine gute Hypotonisierung scheinen also sehr variabel zu sein und sind sicher auch mit von der Fischart (Ei- und Dottergröße, Dicke des Chorions, Lipidgehalt etc.) abhängig. Nach unseren Erfahrungen machen sich "verlängerte" Hypotonisierungszeiten nicht sehr nachteilig auf die Chromosomen bemerkbar, während zu kurze Einwirkungsdauern des Mediums jedoch meist unzureichende Bilder nach sich ziehen.

Die hier gemachten Fehler sind in den nachfolgenden Arbeitsschritten nicht mehr korrigierbar, andererseits ist es aber durchaus möglich, daß gut hypotonisierte Metaphaseplatten noch nachträglich infolge unzureichender Fixierung, zu dichtem Materialauftrag auf den Objektträgern oder mangelhafter Färbung in ihrem Erscheinungsbild beeinträchtigt werden. Schließlich wird mit dem Carnoy ein saures Fixierungsmittel verwendet, welches nicht nur die Nucleohistone präzipitiert, sondern auch viele Plasma-Substanzen, die die Einsicht in den Zellkern verdecken, herauslösen soll. Deshalb ist das Carnoy auch erst unmittelbar vor seiner Verwendung anzusetzen, mehrmalige Wechsel des Fixativs im Verlaufe des Fixierungsprozesses sichern, daß entstehendes Methylacetat eliminiert wird. Insgesamt dürften aber durch Fixierung, Materialauftrag und Färbung weni-

ger Fehler verursacht werden können, als infolge unzureichender Mitoseblockung und Hypotonisierung.

Wie durch die vorliegenden Ergebnisse gezeigt wird, ist es bei Wahrung optimaler Behandlungsbedingungen ohne weiteres möglich, auch aus den Eiern der Fische Chromosomenpräparationen vorzunehmen. Somit bietet sich für Untersuchungen dieser Art ein Ausgangsmaterial an, welches leicht handhabbar ist, die Bearbeitungen außerordentlich kostengünstig macht und (zumindest bei Massenlaichern wie dem Hering) auch in großer Menge zur Verfügung steht.

### Danksagung

Für die Unterstützung bei der aufwendigen Durchmusterung der Objektträger möchte ich mich bei *Frau Bärbel Buuk* bedanken.

### Zusammenfassung

Eine effektive Methode für die Präparation von Chromosomen aus Fischeiern wurde erprobt. Die optimalen Bedingungen zur Darstellung der Metaphaseplatten ließen sich in mehreren Versuchen bestimmen. Der günstigste Zeitpunkt für die Chromosomenpräparation liegt in der ersten Hälfte der Eientwicklung. Zu empfehlen ist eine 6stündige Colchizinbehandlung (0,02 %) und eine 1stündige Hypotonisierung (0,075 M KCl bzw. 0,8 % Natriumcitrat).

### Literatur

- BAKSI, S.M.; MEANS, J.C. (1988) : Preparation of chromosomes from early stages of fish for cytogenetic analysis. *J. Fish Biol.* 32: 321-325
- BLAXHALL, P.C. (1975) : Fish chromosome techniques - a review of selected literature. *J. Fish Biol.* 7: 315-320
- BOLLA, S. (1987) : Cytogenetic studies in Atlantic salmon and rainbow trout embryos. *Hereditas* 106 : 11-17
- CATTIN, P.M.; FERREIRA, J.T. (1989) : A rapid, non-sacrificial chromosome preparation technique for freshwater teleosts. *S.Afr.J.Zool.* 24: 76-78
- CHOURROUT, D.; HAPPE, A. (1986) : Improved methods of direct chromosome preparation in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Aquaculture* 52: 255-261
- DAS, N.; DAS, R.C. (1988) : An improved method for obtaining well spread mitotic metaphase chromosomes in the karyotype studies of fishes. *Veterinarski Arhiv* 58: 175-179
- DOUCETTE Jr., A. J.; FITZSIMONS, J.M. (1988) : Karyology of Elopiform and Clupeiform Fishes. *Copeia* 1988 (1): 124-130
- KLIGERMAN, A. D.; BLOOM, S.E. (1977) : Rapid chromosome preparations from solid tissues of fishes. *J. Fish. Res. Board Can.* 34: 266-269
- KLINKHARDT, M.B. (1989) : The occurrence of abnormal herring embryos (*Clupea harengus*) on a spawning-ground in the inner coastal waters of the German Democratic Republic. *Rapp.P.-v.Réun.Cons.int.Explor.Mer.* 190: 178-182
- KLINKHARDT, M.B. (1990) : Karyologische Studien an verschiedenen Süßwasserfischarten aus brackigen Küstengewässern der südwestlichen Ostsee: I. Der Kaulbarsch (*Gymnocyphus cernua* (LINNAEUS, 1758)). *Zool.Anz.* 224: 156-164
- KLINKHARDT, M.B.; BUUK, B. (1990) : Karyologische Studien an verschiedenen Süßwasserfischarten aus brackigen Küstengewässern der südwestlichen Ostsee: II. Die Plötze (*Rutilus rutilus* (LINNAEUS, 1758)). *Zool.Anz.* 224 : 359-368
- KLINKHARDT, M.B. (1991) : A brief comparison of methods for preparing fish chromosomes. An overview. *Cytobios* 67:193-208

- LIEDER, U. (1953) : Chromosomenstudien an Knochenfischen. I. Die Chromosomen des Hechtes in den embryonalen Mitosen. Zeitschr.f.Fisch. 2 : 417-419**  
**LIEDER, U. ( 1954 ) : Chromosomenstudien an Knochenfischen. III.Über den Einfluß anormaler Temperaturen auf die Mitoseverhältnisse im Fischei. Zeitschr.f.Fisch. 3: 479-488**  
**LONGWELL, A.C.; STILES,S.S. (1968) : Removal of yolk from oyster eggs by Soxhlet extraction for clear chromosome preparations. Stain Technology 13: 63- 67**  
**REDDY, P.V.G.K.; JOHN, G. (1986) : A method to increase mitotic metaphase spreads and permanent chromosome preparation for karyotype studies in fishes . Aquacultura Hungarica (Szarvas) 5: 31-36**  
**RIVLIN, K.A.; RACHLIN, J.W.; DALE,G. (1985) : A simple method for the preparation of fish chromosomes applicable to field work, teaching and banding . J. Fish Biol. 76 : 267-272**  
**ROBERTS, F.L. (1966 ) : Cell Culture of Fibroblasts from Clupea harengus Gonads. Nature 212 : 1592-1593**  
**SKVORCOVA, T.A. (1974) : Chromosomnye komplekxy okeanitscheskoi zel 'di . V kn. : Biologija promyslovych ryb i bezposvonotschnych na rannich stadiach rasvitija . Vzezojus.konf.Tes.dokl.Murmansk: Isd.PINRO, 199-200 (in russ.)**  
**SKVORCOVA, T.A. (1975) : Chromosomnye komplekxy belomorskoi zel'di (Clupea harengus pallasi n. maris-albi BERG) i zalaki (Clupea harengus harengus n. membras L.) . V kn. : Biologija belomorskoi zel'di. L.: Nauka, 104-108 (in russ.)**

**Verfasser:**

**Dr. rer.nat. Manfred B. Klinkhardt**  
**Universität Rostock**  
**Fachbereich Biologie**  
**Universitätsplatz 5**  
**Postfach 999**  
**O-2500 Rostock 1**