

PHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR REIFETEILUNG

II. Mitteilung

ÜBER DIE ÄNDERUNG DES NUKLEINSÄURENGEHALTES WÄHREND
DER POLLENMEIOSE UND POLLENENTWICKLUNG VON *LILIUM*
HENRYI

H. F. LINSKENS

(*Botanisches Laboratorium der R.K. Universität Nijmegen-Niederland*)

(*eingegangen am 31. Januar 1958*)

1. EINLEITUNG

Das Problem der Induktion der Meiose in einem sich mitotisch teilenden Gewebe ist ein Grundproblem biologischer Forschung überhaupt. Sind doch mit diesem cytologischen Prozess einerseits der Umbau der Chromosomen, die Umordnung der Genome und die Reduktion des Chromosomensatzes verbunden, andererseits der Vollzug der sexuellen Fortpflanzung (OEHLKERS 1956) gekoppelt. Für die Kausalanalyse des Induktionsprozesses bieten die Antheren höherer Pflanzen ein besonders gutes Objekt, weil die Meiosis dort stets relativ leicht und sicher zu erkennen ist.

In unserer ersten Mitteilung (LINSKENS 1956) haben wir als Vorarbeit für eine Gewebekultur der Pollenmutterzellen einige physiologische Zustandsgrößen im Zusammenhang mit dem Ablauf der Pollenmeiose und der Pollenentwicklung untersucht. Daraus wurde klar, dass im Verlauf der genannten Prozesse beträchtliche Umsetzungen stattfinden, die für den geordneten Ablauf der Reifeteilung und die normale Entwicklung der Pollen wesentlich sind, jedoch keinen Zusammenhang mit der Induktion der Meiose erkennen lassen. Nachdem es HUSKINS und Mitarbeitern (1948a, b, c, 1949, 1950) durch Einwirkung von Natrium-Nukleinat gelungen war, „meiose-ähnliche“ Stadien zu erzeugen, schien es aussichtsreich, die Änderungen im Nukleinsäuren-Gehalt in den verschiedenen Stadien der Reduktionsteilung zu analysieren.

Über den Umbau der Nukleinsäuren im Zusammenhang mit der Kernteilung, insbesondere der DNS, liegen zahlreiche Arbeiten vor (z.B. SWIFT 1950; BRYAN 1951; OGUR-ERICKSON-ROSEN-SAX-HOLDEN 1951; TAYLOR 1953; TAYLOR-McMASTER 1954; GRUN 1956). Sie registrieren mit verschiedenartigen Methoden den RNS-bzw. DNS-Gehalt einzelner Zellen und Zellkerne. Es erschien uns jedoch bedeutsam, auch den *Desintegrationsprozess, den die Tapetumzellen während der Meiose und der Pollenreifung* durchmachen, gleichzeitig zu erfassen. Die Zellen des Archespors lösen sich ja schon, bevor die Meiose in ihnen abläuft, aus dem Gewebeverband los und sind dann von einer „Nährlösung“ umgeben; diese wird zunächst von den Tapetumzellen sezerniert und später von deren Zerfallsprodukten gebildet. Über die

chemische Zusammensetzung und physiologische Funktion liegen bislang nur mikroskopische Beobachtungen vor. Aus den Stoffen, die durch die Sekretion und den Zerfall der Tapetumzellen frei werden, müssen die Gonotokonten jedoch während ihrer Teilungsvorgänge ihr Material auf dem Wege der Diffusion entnehmen. Nach der Lösung aus dem Gewebeverband befinden sich die Archesporzellen ja im freien Raum des Loculus, nur gesteuert von der genetischen Konstitution und den stofflichen Prinzipien der "Nährlösung". Hier ist also ein *kompliziertes Zusammenspiel* zu erwarten (OEHLKERS 1956). Fehlsekretionen des Tapetums infolge genetisch bedingter Störungen der ernährungs-physiologischen Vorgänge führen daher zu Sterilitätserscheinungen im männlichen Geschlecht (WELZEL 1954). Für den Ablauf der Teilungsvorgänge liegt dabei exakte Synchronisierung in einem Pollenfach vor, die auf einem *diffusiblen stofflichen Steuerungssystem des Tapetumbreies* beruhen muß.

Änderungen in der gesamten "Gonotokonten-Aufschwemmung" versprechen daher am ehesten Aufschluß über ein induzierendes Prinzip zu geben. Nachdem sich Nukleinsäuren-Verbindungen als für die Auslösung "meiose-ähnlicher" Stadien wirksam erwiesen, untersuchten wir im gesamten Antheren-Inhalt dieselben in Zuordnung zu den zytologischen Stadien der Meiose.

2. METHODEN

Es wurden die gleichen Pflanzen von *Lilium henryi*, wie zu der ersten Untersuchungsreihe, verwendet (LINSKENS 1956). Die Bestimmung der einzelnen Entwicklungs- und Meiose-Stadien erfolgte stets an Teilen von 2 Antheren je Knospe. Eine Korrelation zwischen den zytologischen Zuständen und der Knospen- bzw. Antheren-Länge, wie sie ERICKSON (1948) gefunden hatte, ließ sich an unserem Material nicht zeigen. Auch sind die Wachstumsbedingungen in den verschiedenen Jahren so unterschiedlich, daß eine sichere Zuordnung auf Grund von Längenmessungen nicht möglich ist (Abb. 1).

Nach der zytologischen Charakterisierung und Längenmessung wurden die Inhalte der Antheren auf Objektträger ausgepreßt und unmittelbar verarbeitet. Zur Blockierung der Nukleasen wird bei NS-Bestimmung stets sofort 0,02 m NaF zugesetzt (vgl. EBERHARDT 1952). Das Trockengewicht wurde durch Differenzwägung nach Trocknung von 4 h bei 105 Grad C und Abkühlen über Chlorkalzium ermittelt. Stickstoffbestimmung erfolgt als Mikromethode nach KIELDAHL-PREGL.

Die Nukleinsäuren (NS) wurden mit 0,5 m Perchlorsäure bei 75 Grad C in 30 min. extrahiert (Aufarbeitungsschema: vgl. KANDLER et al. 1956). Die quantitative Bestimmung der RNS erfolgte nach HAHN und v. EULER (1946) mit Phloroglucin und Eisessig unter Zusatz von Fe(III)Cl_3 zur Vertiefung der blaugrünen Färbung. Die Farbintensität wurde bei 587 μ mit dem Zeiss-Spektralphotometer ermittelt und die RNS-Werte an Hand einer Eichkurve mit Hefenukleinsäure (Hoffmann-La Roche) gewonnen. Die Bestimmung der DNS erfolgte ebenfalls an Hand der Kohlenhydratkomponente im

Anschluß an die Hydrolyse in 5 % Trichloressigsäure (30 min kochendes Wasserbad) nach DISCHE (1930) und WEBB-LEVY (1955) mit 5 % iger TCE und 0,5 % p-Nitrophenylhydrazin in Äthanol. Nach erneutem Erhitzen auf dem Wasserbad (20 min), Abkühlen, Extrak-

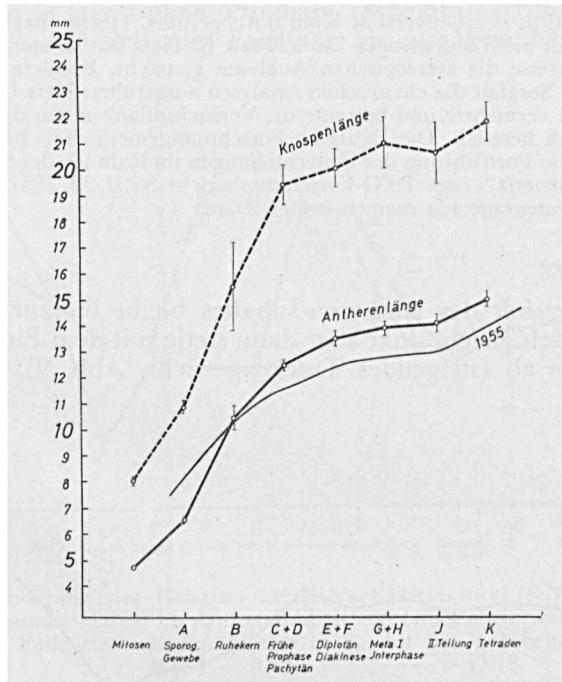


Abb. 1. Längenänderungen der Knospen und Antheren von *Lilium henryi* während der Pollenmeiose. Die Vergleichskurve für die Antherenlängenmessungen des Jahres 1955 (vgl. LINSKENS 1956) ist dünn ausgezogen.

tion mit n-Butylacetat und Zugabe von 2 n NaOH wird die Färbung sofort bei 560 m μ bestimmt. Die DNS-Werte lassen sich einer Eichkurve mit Thymonukleinsäure (Th. Schuchhardt) entnehmen. Zur Nukleotid-Bestimmung wurden diese entweder mit 8 %iger Uranylacetat-Lösung gefällt oder die NS durch Fällung mit 83,5 % Ba (ClO₄)₂-Lösung in Wasser (FIERS-STOCKX 1957), Äthanol oder 2 % iger wässriger NaCl-Lösung entfernt.

Die papierchromatographische Trennung gelang mit verschiedenen Lösungsmitteln (LINSKENS 1955b); besonders geeignet waren: Phenol-Ameisensäure-Wasser (90:10:100), tertiäres Butanol-Salzsäure-Wasser (70:13,2:16,8), n-Butanol-Dioxan-Wasser (4:1:1; NH₃-Atmosphäre). Der Nachweis erfolgte mit Hilfe des Photoprintverfahrens. Die Vergleichssubstanzen und die Nukleinsäure-Baustein-Flecken ließen sich auch auf dem Papier direkt im UV-Licht (Spezialanalysenlampe Hanau) sichtbar machen durch Aufsprühen des Leuchtstoffes "S 5 grün" (Zn₂SiO₄ und MnO₄ in Subitogen) als Chloroform-Suspension (WALLENFELS-CHRISTIAN 1953, LINSKENS 1955a).

In den graphischen Darstellungen sind die 3fachen mittleren Fehler des Mittelwertes durch die Länge senkrechter Striche angegeben; fehlen diese, so liegt nur eine Einzelmessung vor.

Die Versuche wurden während der Vegetationsperioden 1956 und 1957 am Botanischen Institut der Universität Köln durchgeführt. Herrn Direktor Professor Dr. J. Straub gilt mein aufrichtiger Dank. Frau F. Tietz hat wiederum mit unermüdlichem Interesse die zytologischen Analysen gemacht, Fräulein I. Stahl hat 1956 mit großer Sorgfalt die chemischen Analysen ausgeführt; Herr Gartenmeister H. Schwamborn vermehrte und betreute die Versuchspflanzen; für diese Hilfeleistungen danke ich herzlich. Die Deutsche Forschungsgemeinschaft hat durch ihre Unterstützung die Fortführung der Untersuchungen im Rahmen des Schwerpunktprogrammes "Genetik" (vgl. DFG-Forschungsbericht Nr. 1, 39, 1957) ermöglicht. Für diese Förderung sage ich meinen besten Dank.

3. ERGEBNISSE

Der *Wassergehalt* des Antheren-Inhaltes bleibt bis zur Tetradenbildung ziemlich gleich, sinkt aber dann stetig mit dem Eindicken des Tapetumsaftes ab (steigendes Trockengewicht, Abb. 2). Vergleicht

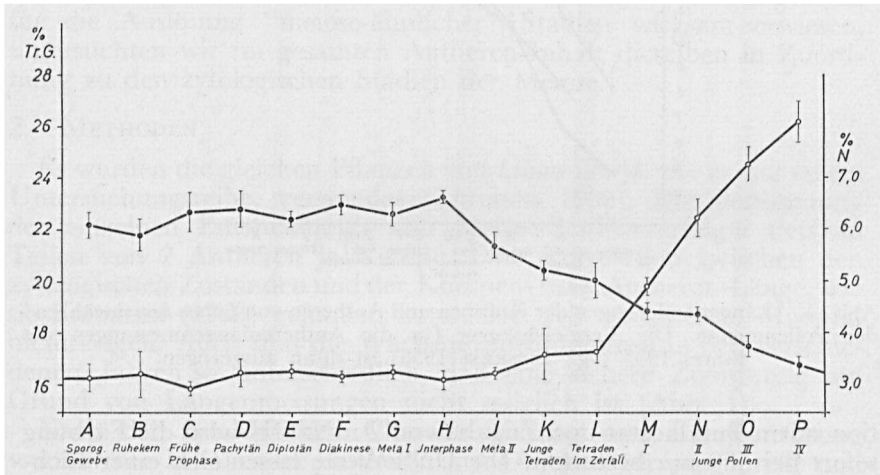


Abb. 2. Änderungen des Trockengewichtes und des Stickstoffgehaltes für den Antheren-Inhalt von *Lilium henryi* während der Pollenmeiose und Pollenentwicklung. Trockengewicht: —○— und linke Ordinate. N-Gehalt in % des Trockengewichtes: —●— und rechte Ordinate.

man die Trockengewichtsänderung der Gesamtanthere (LINSKENS 1956, Abb. 2), so wird ersichtlich, daß die Auflösung und Verflüssigung des Tapetumgewebes nicht durch zusätzliche Wasseraufnahme, sondern durch Desintegration des Zellinhaltes des Tapetums zustande kommt.

Der *Stickstoffgehalt* (Abb. 2) des Anthereninhaltes liegt mit rund 6% im ersten Abschnitt der Meiose wesentlich über dem durchschnittlichen N-Gehalt der Gesamtanthere. Er bleibt bis zur Interphase auf dieser Höhe, um dann stetig abzufallen und erreicht im reifen Pollen rund 3%.

Die Bestimmung der *Nukleinsäuren* (Abb. 3) erfolgte ebenfalls für den gesamten Anthereninhalte. Dabei zeigte sich, daß im Stadium des sporogenen Gewebes (A) ein Gehalt an DNS, bezogen auf das Trockengewicht, von rund 1,1 % zu finden ist. Mit dem Einsetzen der Meiose in der frühen Prophase (Stadium C) sinkt jedoch der DNS-Gehalt, um sich vom Pachytän bis zur Metaphase (Stadien D

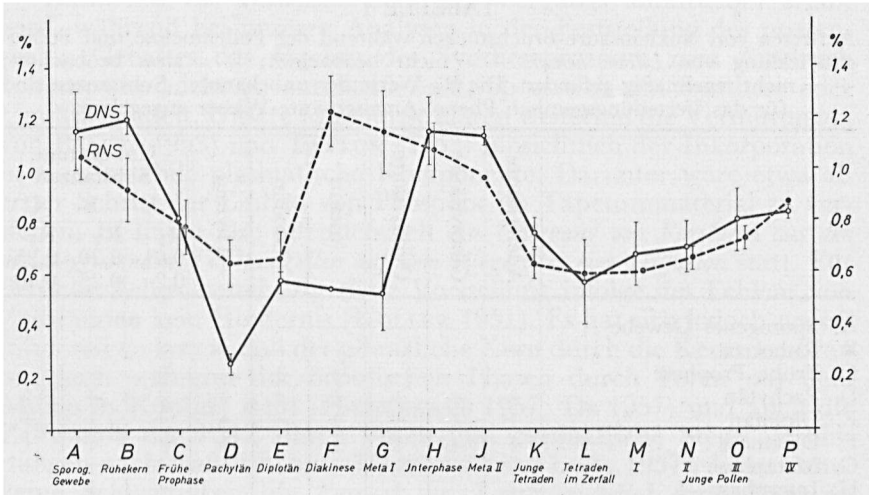


Abb. 3. Änderung des Gehaltes an Ribosenukleinsäure (RNS) und Desoxyribosenukleinsäure (DNS) im Anthereninhalte von *Lilium henryi* während der Pollenmeiose und Pollenentwicklung. Menge in % auf das Trockengewicht bezogen.
 —●— = RNS, —○— = DNS.

bis G) auf rund 0,5 % des Trockengewichtes einzustellen. In der Interphase (Stadium H) erreicht der DNS-Gehalt wieder den Ausgangswert von rund 1,2 %, um mit der Tetradenbildung wieder abzufallen. In den jungen Pollen ist der NS-Gehalt ständig ansteigend. Der RNS-Gehalt des Antheren-Inhaltes ändert sich im zweiten Teil der Entwicklung (ab Interphase) synchron. Im ersten Abschnitt liegt jedoch der Anstieg der RNS zum Ausgangswert des ruhenden Gewebes bereits in der Diakinese.

Die analysierten Mengen erfassten den Gehalt an NS der Pollenmutterzellen bzw. Tetraden bzw. Pollen und der Tapetum-Zellen. Der plötzliche Abfall mit dem Einsetzen der Reifeteilung läßt sich kaum mit den cytologischen Veränderungen in den Gonotokonten in Verbindung bringen. Es muß die schlagartige Verminderung der DNS speziell mit der Desintegration der Tapetum-Zellen und -Kerne in Zusammenhang stehen. Die Frage entsteht daher: wo bleiben die beim Zerfall des Tapetums frei werdenden Nukleinsäuren? Da sie als solche nicht gefunden werden konnten, liegt es nahe, nach ihren Bruchstücken zu fahnden. Wir trennten daher in einer weiteren Versuchsreihe durch Zentrifugieren aus der Aufschwemmung des Antheren-Inhaltes die Gonotokonten ab. Nach 2-maligem Waschen war im

Sediment das Material gut von anhaftenden Tapetumresten befreit. Mikroskopische Kontrolle der Tapetumzellen-Aufschwemmung zeigte in keinem Fall mehr das Vorhandensein von Gonotokonten bzw. jungen Pollen. Die resultierende Tapetum-Aufschwemmung wurde bei -40 Grad C durch Gefriertrocknung eingeengt und dann unmittelbar chromatographiert. Das Ergebnis ist in Tab. 1 wiederge-

TABELLE I

Auftreten von Nukleinsäure-Bruchstücken während der Pollenmeiose und Pollenentwicklung von *Lilium henryi*. — = nicht beobachtet; + = stets beobachtet; \pm = nicht regelmäßig gefunden. Die R_F -Werte der unbekannt Substanzen sind für das Verteilungsgemisch Phenol-Ameisensäure-Wasser angegeben.

	Adenylsäure	Guanylsäure	Cytidylsäure	Adenin	Guanin	Thymin	Unbekannte Substanzen		
							A	B	C
							$R_F = 0,01 - 0,2$	$R_F = 0,20 - 0,25$	$R_F = 0,25 - 0,40$
A. Sporogenes Gewebe . . .	—	—	—	—	—	—	+	—	—
B. Ruhekern	—	—	—	—	—	—	+	—	—
C. Frühe Prophase	—	—	—	\pm	\pm	—	+	—	—
D. Pachytän	+	+	+	\pm	\pm	—	+	+	+
E. Diplotän	+	+	+	\pm	\pm	+	+	+	+
F. Diakinese	+	+	+	\pm	\pm	+	+	+	+
G. Metaphase I	+	+	+	\pm	\pm	—	+	+	+
H. Interphase	—	—	+	—	+	—	+	+	—
I. Metaphase II	—	—	—	—	—	—	+	—	—
K. Junge Tetraden	—	—	—	—	—	—	+	—	—
L. Tetraden im Zerfall . . .	—	—	—	—	—	—	+	—	—

geben. Es ließen sich in dem Abschnitt der NS-Depression (Stadien D-G) eine Anzahl der verschiedensten Nukleotide und heterocyklischen Verbindungen im Tapetum bzw. seinen Degenerationsprodukten nachweisen und an Hand der vorhandenen Vergleichssubstanzen mit hoher Wahrscheinlichkeit identifizieren. In jedem Falle handelt es sich um Verbindungen, die im kurzwelligen UV (2540 \AA) absorbieren, also als Nukleinsäurebruchstücke anzusehen sind. Die NS-Bruchstücke im Tapetumsaft treten zuerst in größerer Anzahl mit dem Pachytän (Stadium D) auf. Das zeitliche Zusammentreffen mit dem rapiden Absinken des NS-Gehaltes dürfte nicht zufälliger Natur sein. Als Interpretation scheint uns auf der Hand zu liegen, daß die NS der Tapetumzellen, insbesondere die DNS, aus deren Kernen bei dem Desintegrationsprozeß unter dem Einfluß freigesetzter Nukleinasen und Nukleotidasen in ihre Nukleotide und kleinere Stücke aufgespalten werden. Diese werden sodann von den in der Meiose befindlichen Gonotokonten aufgenommen und zu genuinen NS aufgebaut. Der Aufnahme-prozeß vollzieht sich während der Interphase und der II. Metaphase.

4. BESPRECHUNG

Das Problem der Nukleinsäure-Synthese in der Meiose ist von hohem biologischen Interesse. An verschiedenen Objekten ist daher

von zahlreichen Autoren eine Analyse mit Hilfe von autoradiographischen, histophotometrischen oder mikrochemischen Methoden durchgeführt worden. Eine kritische Besprechung haben PLAUT (1953) und TAYLOR (1957) vorgenommen; die auf verschiedene Weise gewonnenen Resultate stimmen nicht überein. Beim Vergleich der Analysenergebnisse ist zu berücksichtigen, daß bei Verfolgung der P^{32} -Aufnahme die *dynamische* Seite des Vorgangs unmittelbar erfaßt wird, während bei unseren Analysen in der Feststellung des prozentualen Gehaltes das *Ergebnis* des Syntheseprozesses zum Ausdruck kommt, also nicht zu entscheiden ist, ob es sich um Synthese oder Umsatz handelt. Unsere Ergebnisse klären weiterhin die Vermutungen von PLAUT (1953) und TAYLOR (1953) hinsichtlich der Inkorporation in eine instabile plasmatische Komponente. Darunter wäre etwa als erster Schritt der Einbau von Phosphor im Tapetummaterial zu verstehen. Es findet also offensichtlich ein *Übergang von Vorstufen aus den desintegrierenden Tapetumzellen auf dem Wege über eine Diffusion* statt. Für tierische Zellen besteht für diese Vorstellung infolge des Fehlens von Zellwänden kein Hindernis (KOLLER 1951). Es hat sich jedoch neuerdings zeigen lassen, daß der pflanzliche Kern durch die Kernmembran hindurch während der meiotischen Phasen durch Poren mit dem Milieu in Kontakt steht (HASSENKAMP 1957; DE 1957) und auch die Zellwände der PMZ durch Poren und plasmatische Stege Verbindungen nach Außen haben (HASSENKAMP u. LIESE 1957). Es ist daher keine Schwierigkeit die *Passage von Tapetummaterial durch Poren der Kernmembran* anzunehmen (ANDERSON u. BEAMS 1956). Damit würde sich auch der von COOPER (1952) im zytologischen Bild beobachtete Transfer von feulgenpositivem Material erklären als *ein Übergang von Nukleinsäurebausteinen aus dem Tapetum in die Mikrosporocyten, wo sie sodann zu spezifischen DNS-Matrizen aufgebaut werden*.

Für den geordneten Ablauf der Meiose dürfte jedoch die Anwesenheit bestimmter Nukleotide und Nukleoside im Zusammenhang mit der DNS-Synthese eine entscheidende Voraussetzung sein. Damit sind neue Möglichkeiten für die in-vitro-Kultur von sporogenem Gewebe und die Induktion der Meiose angedeutet.

Ob und inwieweit die DNS-Bruchstücke der Tapetumzellen noch Träger genetischer Informationen sein können, darüber wäre reizvoll zu spekulieren. Für einen experimentellen Ansatz sind jedoch andere Objekte besser geeignet.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Untersuchung der Nukleinsäuren des Antheren-Inhaltes (Gonotokonten und Tapetum) ergab, daß mit dem Einsetzen der frühen Prophase I und dem Beginn des Zerfalls der Tapetum-Zellen eine Abnahme des DNS-Gehaltes von 1,1 % des Trockengewichtes auf ca. 0,5 % erfolgt. In der Interphase I steigt der DNS-Gehalt schnell wieder auf den Ausgangswert an. In der Zeit der Depression kann in dem Anthereninhalte das Auftreten von Nukleinsäure-Bausteinen papierchromatographisch nachgewiesen werden. Es wird angenommen, daß ein Transfer der DNS aus dem Tapetum in die Mikrosporocyten auf dem Wege über die DNS-Bausteine erfolgt.

SAMENVATTING

Het onderzoek van de nucleïne-zuren van de antheren-inhoud (gonotokonten en tapetum) wees uit, dat met het begin van de vroege profase en het begin van de afbraak der tapetum-cellen een vermindering van het DNZ-gehalte van 1,1 % van het drooggewicht tot ca 0,5 % plaats vindt. Tijdens de interphase neemt het DNZ-gehalte weer snel toe tot de uitgangswaarde. Gedurende de tijd dat het DNZ-gehalte laag is, kan in de antheren-inhoud, na papierchromatographische scheiding, het voorkomen van nucleïne-zuur-componenten aangetoond worden. Aangenomen wordt, dat overbrenging van DNZ uit het tapetum in de microsporyten via de DNZ-componenten plaats heeft.

SUMMARY

The examination of the nucleic acids in the contents of the anthers (microspores and tapetum) has shown, that the onset of the prophase I and the beginning of the crumbling of the tapetum-cells a decrease in the amount of DNA takes place from 1,1 % of the dry weight to ca. 0,5 %. In the interphase I the amount of DNA returns to the original level. At the time of the depression the appearance of nucleic acid-components in the contents of the anthers can be shown by paper-chromatography. It is assumed, that a transfer of DNA takes place from the tapetum to the microspores by means of the DNA-components.

LITERATUR

- ANDERSON, E. and H. W. BEAMS. 1956. Journ. Biophys. Biochem. Cytol. 2:439-444.
 BRYAN, J. H. D. 1951. Chromosoma (Wien) 4:369-392.
 COOPER, D. C. 1952. Am. Nat. 86:219-229.
 DE, D. N. 1956. Exp. Cell. Res. 12:181-184.
 DISCHE, Z. 1930. Mikrochem. 8:4-32.
 EBERHARDT, F. 1952. Zs. Bot. 40:338.
 ERICKSON, R. O. 1948. Am. Journ. Bot. 35:729-739.
 FIERS, W. und J. STOCKX. 1957. Naturwiss. 44:115.
 GRUN, P. 1956. Exp. Cell. Res. 10:29-39.
 HAHN, L. und H. v. EULER. 1946. Ark. Chem. Min. Geol. A 22/23:1.
 HASSENKAMP, G. 1957. Naturwiss. 44:334-35.
 HASSENKAMP, G. und W. LIESE. 1957. Exp. Cell. Res. 13:165-167.
 HUSKINS, C. L. 1949. Proc. 8th Intern. Congr. Genetics. Hereditas (Lund): Suppl. 274-285.
 HUSKINS, C. L. 1948. Journ. Hered. 39:310-325.
 HUSKINS, C. L. 1950. Journ. Hered. 41:13-18.
 HUSKINS, C. L. and N. STEINITZ. 1948. Journ. Hered. 39:66-77.
 HUSKINS, C. L. and N. STEINITZ. 1948. Journ. Hered. 39:34-43.
 KANDLER, O. C. ZEHENDER und J. MÜLLER. 1956. Arch. Mikrobiol. 24:219-249.
 KOLLER, P. C. 1951. Symp. Soc. exp. Biol. 1:270-290.
 LINSKENS, H. F. 1955a. Papierchromatographie in der Botanik. Berlin-Göttingen-Heidelberg. 1-30.
 LINSKENS, H. F. 1955b. Papierchromatographie in der Botanik. Berlin-Göttingen-Heidelberg. 142-153.
 LINSKENS, H. F. 1956. Ber. dtsch. Bot. Ges. 61:353-360.
 MOSES, M. J. and J. H. TAYLOR. 1955. Exp. Cell. Res. 9:474-488.
 OEHLKERS, F. 1956. Das Leben der Gewächse. Teil I. Die Pflanze als Individuum, Berlin-Göttingen-Heidelberg.
 OGUR, M., O. ERICKSON, G. U. ROSEN, B. SAX and C. HOLDEN. 1951. Exp. Cell. Res. 2:73-89.
 PLAUT, W. S. 1953. Hereditas (Lund) 39:438-444.
 SPARROW, A. H., V. POND, S. KOJAN. 1955. Am. Journ. Bot. 42:384-394.
 SWIFT, H. 1950. Proc. Nat. Acad. Sci. 36:643-654.
 TAYLOR, H. 1953. Exp. Cell. Res. 4:164-173.
 TAYLOR, H. and R. McMASTER. 1954. Chromosoma (Wien) 6:489-521.
 TAYLOR, J. H. 1957. Am. Nat. 41:209-220.
 WALLENFELS, K. und W. CHRISTIAN. 1953. Angew. Chemie. 65:459-461.
 WEBB, J. M. and H. B. LEVY. 1955. Journ. biol. Chem. 213:107-117.
 WELZEL, G. 1954. Zs. Vererbungsl. 86:35-53.