VERSLAG

BLAUWWIER-ONDERZOEK

oct '68 – mei '69

door

H.P.M. Hillegers.

D 556

D556

B L A U W W I E R Ø N D E R Z O E K.

Oct. '68 - mei '69
Gen. Lab. der R.U. te Groningen.
afd. Karyologie.

door H.P.M. Hillegers.

I N H O U D .

1. INLEIDING.

1.1 Tijd en plaats van het onderzoek.
1.2 Doelstellingen van het onderzoek.

2. BLAUWWIER-ONDERZOEK.

2.1 Algemeen overzicht.
2.1.1 Algemene karakteristiek der Cyanophyceae.
2.1.2 Cytologische karakteristiek der Cyanophyceae.
2.1.3 Problemen rond onderzoek van Cyanophyceae.
2.1.4 Recent onderzoek.
2.2 Karyologisch werk aan Oscillatoria
2.2.1 Doelstelling.
2.2.2 Materiaal.
2.2.3 Methode.
2.2.4 Resultaten.
2.2.5 Discussie.
2.2.6 Samenvatting.
2.3 Karyologisch werk aan Anabaena cycadina.

3. ANDER ONDERZOEK.

3.1 Papaver onderzoek.
3.2 Neur.-onderzoek.
3.3 Onderzoek aan mijten.
3.4 D.N.A. isol. bij Cyanophyceae.
3.5 Gist onderzoek.
3.6 Bestralings experimenten.

4. LITERATUURLYST.
5. FOTO'S.

1. INLEIDING.

1.1 Dit verslag vormt de afsluiting van een driemaandelijks onderzoek aan de karyologische afdeling van het Gen.Lab. van de R.U. te Groningen. Dit onderzoek is een onderdeel van de Biologie M.O. studie aan dezelfde universiteit en werd verricht in de maanden nov. '68 - april '69.(3 dagen per week). Als mentor fungeerde dr. A.Koopmans ; voor haar steun betuig ik hierbij mijn hartelijke dank.

1.2 De doelstelling van dit onderzoek kan algemeen omschreven worden als een kennisnemen van en ervaring opdoen in karyologisch werk.
Dit gebeurde konkreet aan de hand van eigen onderzoek met blauwwieren (vgl.2).
Daarnaast is kennis genomen van het lopende onderzoek op de karyologische afdeling van bovengenoemd Genetisch Laboratorium, in zake :

1. Gist-onderzoek door dr. A.Koopmans. (vgl. 3.1)
2. Papaver-onderzoek door dr. A.Koopmans.(vgl.3.2)
3. Mijten-onderzoek door dr. L.Pijnacker. (vgl.3.3)
4. D.N.A.-isolatie bij Blauwwieren door drs. W.Stam. (vgl. 3.4)

2. BLAUWWIER-ONDERZOEK.

2.1 Algemeen Overzicht.

2.1.1 Systematisch vormen de Blauwwieren (Cyanophyceae, Schizophyceae of Myxophyceae) een zeer apart taxon binnen het plantenrijk, dat van dien aard is dat de hele groep een apart phylum vormt. (Strassburger 1962).

Ze onderscheiden zich van alle andere Algen en Hogere Planten door hun celbouw : er bestaat binnen de cel geen eindelijke differentiatie tussen kern en plasma. Ondanks deze ongedifferentieerde celinhoud vertonen de Blauwwieren in morfologisch - anatomisch opzicht een verwantschap met andere Algen : zowel eencellige als kolonievormende en thalleuze vormen komen voor. Vegetatieve voortplanting geschiedt d.m.v. endosporen vormen en hormogonien. Ook diverse ruststadia zijn bekend. (cysten) (Geitler 1960).

Fysiologisch zijn de blauwwieren karakteristiek door het bezit van assimilatie kleurstoffen : chlorophyl a , phycocyaninen en phycoërythrinen. Deze kleurstoffen zijn niet aan chromatoforen of plastiden gebonden zoals bij Algen en Hogere Planten, maar aan lamelsystemen gehecht. Het Assimilatieproduct is Glycogeen (aan eiwitten gekoppeld) (Strassburger. c.s. 1962)

Phylogenetisch zijn de blauwwieren waarschijnlijk de oorspronkelijkste - in de zin van meest ongedifferentieerde - Algengroep. Door een sterke overeenkomst met heterotrofe bacteria (ontbreken van een kern, wandstructuur en sex. voortplanting) lijkt de afkomst uit dit taxon waarschijnlijk. (Echlin 1966)

2.1.2 Cytologisch wordt de blauwwiercel als volgt gekarakteriseerd :

-) Er is geen duidelijke kern, omgeven door een membraan. De erfelijke substantie, midden in de cel gelegen, heeft een losse structuur : het bestaan van chromosomen is niet eenduidig aangetoond. Vandaar "Zentralsubstanz" of Nucleoïd.
-) Er zijn geen plastiden : de assimilatiekleurstoffen zijn gebonden aan lamelsystemen, die invaginaties zijn van bepaalde celwandlagen.
-) Behalve de genoemde Nucleoïd en de celwand die uit meerdere lagen bestaat, zijn andere differentiaties taxonspecifiek m.n. gasvacuoles en verschillende grana types zoals Fosfaat grana (= volutinekorrels = Metachromatinekorrels), Cyanophycine-grana, Ribosomen en Assimilaatkorrels.

2.1.3 Problemen rond onderzoek.

Blijkens de uitgebreide literatuurlijsten o.a. in Fuhs (1968) en Geitler (1960) is er sinds het midden van de vorige eeuw relatief veel gepubliceerd over Cyanophyceeën. Tot voor kort was dit onderzoek in hoofdzaak beperkt tot de morfologie en de systematiek. Om verschillende redenen zijn de resultaten hiervan (en dit geldt vooral voor de systematische indeling) zeer twijfelachtig : Ten eerste is het materiaal zeer klein : de gemiddelde celdiameter ligt tussen 2 en 10 μ ; hetgeen microscopisch werk zeer bemoeilijkt.

Ten tweede belemmeren "storende" factoren het karyologisch

werk : fosfaatgrana verhinderen DNA-specifieke kleuringsmethoden (Fuhs 1968), door impermeabele celwandstructuren moeten andere kleuringstechnieken ontwikkeld worden en hoge concentraties van fotosynthetiserende grana in de celperiferie maken observatie onder fasekontrast onmogelijk (von Zastrov 1953).

Tenslotte is door het ontbreken van een sexuele voortplanting (?) en de enorme variabiliteit van morfologische karakteristieken (vgl. o.a. Singh en Tiwari 1969) een systematische indeling van de Blauwwieren op grond van vaste kenmerken op zijn minst dubieus.

2.1.4 Recent onderzoek concentreert zich in hoofdzaak op een vijftal punten :

1e De bouw en functie van het nucleoïd : lokalisatie van het DNA, aard en aantal van chromosomen en delingsstadia. De resultaten van het onderzoek van Von Zastrov (1953), Cassel en Hutchinson (1954), Giesbrecht (1958), Hopwood (1968), Echlin (1966), Allen (1968) en Fuhs (1968) zijn echter niet één-duidig.

2e Bouw en functie van andere celdelen zoals fosfaatgrana (Fuhs,1968), Assimilaatgrana (Fuhs 1963) en Celwandstructuren (Ris en Singh 1961, Allen,1968 en Jost,1965).

3e Bouw en functie van heterocysten, onderzocht door Allsop (1968)en Fay (1968).

4e Sexuele voortplanting. Er is een begin gemaakt met genetisch werk, met name recombinatie (Kumar 1962), mutatie (Singh en Tiwari 1969) en DNA- isolatie (niet gepubliceerd onderzoek aan het Gen. Lab. van de R.U. te Groningen).

5e Aard en mechanisme van beweging van soorten uit het geslacht Oscillatoria. (Geitler 1960).

2.2 Karyologisch werk aan Oscillatoria tenuis.

2.2.1 Doel van het onderzoek was door middel van verschillende kleurtechnieken en waarnemingen aan levend materiaal na te gaan, waar zich in de blauwwiercel het DNA bevindt, op welke wijze dat geconcentreerd is (b.v. in chromosomale, granulaire of vaag begrensde structuren) en op welke manier het DNA zich gedraagt tijdens de ~~mitose~~ deling.

2.2.2 Materiaal.

Op het laboratorium werden monocultures van de volgende Cyanophyceeën soorten in stand gehouden :

Callotrix membranacea	Fam.: Rivulariaceae	Orde : Nostocales.
Plectonema boryanum	Schizonemataceae	Nostocales.
Phormidium foveolarum	Oscillatoriaceae	Nostocales.
Anabaena variabilis	Nostocaceae	Nostocales.
Nostoc muscorum	Nostocaceae	Nostocales.
Beggiatoa spec		
Gloeotrichia echinulata		
Spirulina spec.		

Bovenstaande soorten - gedeeltelijk afkomstig uit de Algotheek van Oxford, gedeeltelijk uit Göttingen, bleken echter vrij ongeschikt als studie-object wegens hun geringe celdiameter (tussen 2 en 3 μ)en hun geringe ~~voortplantings~~groeisnelheid waardoor slechts weinig materiaal voor de experimenten aanwezig was.

Daarom werd uitgezien naar een soort die in ruime mate te verkrijgen was en die tevens grotere cellen bezat. Hiervoor kwam in aanmerking Oscillatoria tenuis, verzameld uit een aquarium in de tropische kas van de Hortus de Wolf in Haren.

Factoren die mede bepalend ~~zijn~~ waren voor de keuze van deze soort waren o.a. het feit dat ook Fuhs, die tot nog toe het meest uitgebreid heeft gepubliceerd over het kernmateriaal van ~~Oscillatoria tenuis~~ Cyanophyceeën, gewerkt heeft met een Oscillatoria soort.(Fuhs 1958 en 1963).
Bovendien bleek Oscillatoria tenuis met behulp van een speciale techniek (vgl. 2.3) zeer makkelijk hanteerbaar.

2.2.3 Methode.

Naar behoefte werd Oscillatoria-materiaal (blauwgroene, slijmerige lapjes) verzameld in glazen schaaltjes, van onzuiverheden ontdaan (stukjes substraat) en de helder blauwgroene gelatineuze massa in ± 30 cc. leidingwater gefragmenteerd, waardoor de losse thallusfragmenten in suspensie kwamen.

Vervolgens werd deze suspensie verdund tot 100 cc. en in objectglasbakjes gegoten, waarin objectglaasjes geplaatst werden.

Na een minimale belichting (bureaulamp van 70 Watt) van twee uur hadden de losse thallusfragmenten zich m.b.v. slijmscheden op het glas vastgehecht in monocellulaire lagen. Deze cultures konden enige dagen bewaard blijven; daarna trad sterfte op.

De gebruikte methode leent zich uitstekend voor het bekijken van het object in vivo, omdat de thalli in hetzelfde vlak liggen en regelmatig op het objectglas verdeeld zijn. Ook voor kleuringstechnieken is de methode geschikt, zelfs na voorbehandeling met 1 n. HCL van 60° gedurende 60 minuten blijven de thalli vastgehecht op het glas.
Op deze manier kan kan de langdurige microtoomtechniek (inbedden in paraffine, snijden, opplakken der linten, doorvoeren in xylol- Alcoholreeksen) vermeden worden.

Hierna zijn de volgende werkmethodes toegepast : (de resultaten hiervan zijn besproken in 2.3).

A. Waarnemingen met lichtmicroscoop aan levend materiaal.

Een dekglaasje werd op een"begroeid" objectglas gelegd. Het niet door het dekglaasje bedekte gedeelte werd van overige thalli gezuiverd.

B. Waarnemingen met Fasecontrast aan levend materiaal.

Als A.

C. Waarnemingen met vitaalkleuringen.

Aan een objectglas cultuur werden enkele druppels Acridineoranje toegevoegd. Na 20 minuten werden de eerste preparaten bekeken.

D.

D. Waarnemingen aan gefixeerd en gekleurd (Bas. Fuch) materiaal.

In dit onderzoek is geëxperimenteerd zowel met de Feulgen-methode volgens Koopmans (mond.med.) als met die volgens Fuhs.
De eerste is als volgt :
Na fixatie in Carnoy (3 deel Abs.Alc. op 1 deel Ysazijn) gedurende 45 min. werden de preparaten 60 min. in Abs. Alc. geplaatst.Dan volgt hydrolyse (varierend van 0 - 30 min.) in 1 n HCL bij 58°C., kleuring in Basische Fuhsine (recept zie beneden) bij 5°C. varierend van 2 - 36 uur en afspoelen in leidingwater gedurende enkele minuten.
Teneinde permanente preparaten te krijgen werden deze in een Alcohol - Xylol-reeks doorgevoerd (spoelen met achtereenvolgens tweemaal : Alc. 70%, Alc. 96%, Abs. Alc. en Xylol) en in Canadabalsem ingebed.
Na een nacht drogen op een verwarmingsplaat bij ± 40°C. zijn de preparaten gereed.

Fuhs(1958) gebruikte de volgende Feulgenmethode : Na fixatie in Alc.96% gedurende 15 min.,hydrolyse in 1 n HCL bij 60°C. gedurende 10 min. volgt een spoeling in koude 1 n HCL en aqua dest. Vervolgens wordt het materiaal gekleurd in basische fuchsine gedurende 3 uur, driemaal om de 5 min. gespoeld in een oplossing van 5 cc HCL, 5 gr. Kalium metabisulfiet ($K_2S_2O_5$) en 100 cc Aqua dset., waaraan toegevoegd enkele druppels Alizarinviridine.
Hierna kunnen de preparaten op boven beschreven wijze permanent gemaaktworden.

De bereidingswijze voor de basische fuhsine kleurvloeistof is als volgt : 1 gr. bas. f. , wordt opgelost in 200 cc kokend aqua dest. Wanneer de oplossing afgekoeld is tot 50°C. wordt 20cc 1 n HCL toegevoegd en bij afkoeling tot 25°C : 2 gr. watervrij Kalium metabisulfiet. De vloeistof wordt minstens 24 uur in een gesloten fles in het donker bewaard en vervolgens gezuiverd (toevoegen :±0,5 gr. norit, schudden en affilteren). Opslag in koelkast.

2.2.4 Resultaten.

De resultaten van de verschillende methodieken, genoemd in 2.2.3 zijn als volgt :

ad A. Waarnemingen met Lichtmicroscoop aan levend materiaal.

Ondanks de zeer fraaie ligging van individuele Oscillatoria-thalli in één vlak, waardoor alle cellen van een thallus duidelijk te onderscheiden waren, zijn er geen celdifferentiaties te onderscheiden, deels door de geringe diameter van de cel zelf (5μ), deels door de sterke groenkleuring der membranen die de kleurpigmenten dragen.(vgl. Risz en Singh 1961)

ad B. Waarnemingen met Fasekontrast aan levend materiaal.

Alleen bij initiaalcellen (=topcellen) van jonge thalli waarvan de membranen minder kleurpigmenten dragen dan bij andere cellen, is onderscheid te maken tussen een "exoplasma" en een "centroplasma" (vgl. Haupt 1923). Het laatste wordt door von Zastrov (1953) "Zentralsubstanz" genoemd. Het verschijnt als een zeer vaag omgrensde vlek in het celmidden. Differentiatie hierbinnen is niet gekonstateerd.

chrom. plasma

ad C. Waarnemingen met vitaalkleuringen.

Het is vooral in de initiaalcellen waarin de "Zentralsubstanz" het duielijkst waarneembaar is. De gedane observaties komen overeen met die van von Zastrov (1953) en van Fuhs (1968) : de "Zentralsubstanz" verschijnt als een vrij vaag omgrensde eenheid in het celmidden. Er trad een zeer onduidelijke granulatie van de "Zentralsubstanz" op.

ad D. Waarnemingen met gefixeerd materiaal.

De resultaten van het gefixeerd materiaal waarbij de hydrolysetijden gevarieerd werden, terwijl de tijdsduur van het Bas. Fuhs. - bad konstant bleef (± 2½ uur) worden besproken aan de hand van de foto's. Serie I nr. 1 t/m 6.

Na 7 minuten hydrolyse treedt plaatselijk korreling in de cellen op. (foto 1, midden). Voor die tijd zijn er geen duidelijke grana zichtbaar.

Na ± 10 minuten hydrolyse zijn duidelijk grana te zien, vooral in de cellen aan de top van de thallus (foto 2).

Daarna verschijnen de dwarswanden als regelmatig oplichtende, sterk lichtbrekende zones. Grana nog duidelijk zichtbaar (foto 3, na 11min. hydr. en foto 4 na 13 min hydr. : dwarswanden worden breder). Deling der grana.

Na ± 15 min. hydr. zijn de dwarswanden zeer breed, maar onregelmatig (foto 5) en na 17 min hydrolyse treden allerlei onregelmatigheden op inhet beeld en worden ook de grana onduidelijker. (foto 6).

Serie II (foto's 7 t/m 12) laat beelden zien van Oscillatoria spec van 10 min. hydrolyse bij een extreem lange kleurtijd (±32 uur). Alle celstructuren hebben in verschillende mate kleurstof opgenomen. Het fotograferen van deze preparaten wordt sterk bemoeilijkt door de zwakke kleurverschillen binnen de cel.
De onregelmatige structuren in het celmidden, die hier en daar in de foto's zichtbaar zijn, doen sterk denken aan de afbeeldingen van Cassel en Hutchinson (1954) denken. Deze auteurs beschouwen bedoelde structuren als chromosoom-equivalenten.

2.2.5 Discussie.

De gedane observaties komen het meest overeen met die van Fuhs (1958). Nucleoïden of delen daarvan zijn niet aanwijsbaar gebleken met directe methodes (fase-kontrast, vitaalkleuring).

De resultaten van de specifiek DNA-kleurmethodes hebben ~~geen~~ betrekking tot het nucleoïd gehad ; zij verschaffen ~~wel~~ ook gegevens over fosfaatgrana, waarvan aangetoond is door Fuhs (1958) dat ze DNA specifieke kleurstoffen opnemen.
Over de opbouw van deze grana wordt verwezen naar Widra (1959) ; ze komen in verschillende lagere organismen voor (vgl. Lindegren c.s. 1955) en zijn erg storend bij karyologisch werk.
Verwijdering is mogelijk door pyrofosfatase (vgl. Fruton en Simmons 1950 p. 583).

Het breder worden van de dwarswanden is waarschijnlijk het gevolg van de toenemende hydrolyse, waardoor de cel mogelijk aan inhoud verliest.

3.2.6 Samenvatting.

De waarnemingen en resultaten van deze enkele maanden onderzoek komen in hoofdzaak overeen met die van Fuhs (1958). Het bestaan van een duidelijke, centraal gelegen en op specifiek DNA kleurstoffen reagerende structuur, die zich -afhankelijk van de fysiologische toestand van de cel- kan opsplitsen in een aantal langwerpige structuren, is echter niet aangetoond.

Ook andere karyologen zijn hierin totnogtoe niet eenduidig geslaagd, ondanks het vele werk hieraan besteed sinds 1900.

Door recent onderzoek met andere methoden (b.v. elctronenmicroscopische en moleculair-genetische) lijken overeenkomsten van Cyanophyceae met Bacteriën steeds meer waarschijnlijk.
Karyologisch onderzoek met deze methoden zal waarschijnlijk eenduidiger resultaten opleveren.

2.3 Karyologisch werk aan Anabaena cycadinae

2.3.1 De doelstellingen van de experimenten met deze soort zijn gelijk aan die met Oscillatoria tenuis : m.n. door middel van kleurtechnieken het DNA-materiaal zichtbaar maken (vgl. 2.2.1).

2.3.2 Materiaal.

Anabaenae cycadinae (fam. Nostocaceae, orde Nostocales) leeft symbiontisch in de bovengrondse worteldelen van Cycas-soorten. Naar alle waarschijnlijkheid zullen de blauwwieren hier iets te maken hebben met de N-voorziening van Cycas. Het is namelijk bekend dat verschillende blauwwiersoorten atmosferische stikstof kunnen binden(Geitler). Ook van andere hogere planten is een blauwwiersymbiose bekend (o.a. van Azolla filiculoïdes en Gunnera spec). vgl. Boudijn 1966.

Doordat de wortelknolletjes van Cycas zich uistekend voor microtoomwerk leenden, en Anabaena een vrij grote blauwwiersoort is, leek ons dit object vrij geschikt.

Cycas-wortels waren in ruime mate aanwezig in de tropische kas van het Botanisch Laboratorium te Haren. (Gr.)

2.3.3 Methode.

Het werken met het microtoom en het daarna kleuren van het materiaal vereist een vrij langdurige en zorgvuldige methode, die in totaal 3 tot 4 dagen in beslag neemt. De gehele procedure kan als volgt worden samengevat (voor gedetailleerde en gemodificeerde procedures wordt verwezen naar Romeis 1968) :

a. Fixatie van het materiaal.
b. Inbedding in paraffine.
c. Werken met de microtoom.
d. Voorbereidingen voor kleurbaden.
e. Kleurtechnieken.
f. Permanent maken.

In detail is de werkwijze als volgt geweest ;

ad. a. Er is geëxperimenteerd met drie fixatievloeistoffen : Carnoy, Alc. abs. en Chroomzuur (voor samenstelling van de eerste en laatste vloeistof vgl. Romeis 1968).

Minimaal bleef het materiaal hierin ± 60 minuten. Het kan in deze fixatievloeistoffen permanent bewaard blijven.

ad. b. Het in het materiaal aanwezige celsap moet uiteindelijk geheel of gedeeltelijk vervangen worden door paraffine. Dit geschiedt door onderdompeling in alcohol- en xylolbaden. (= Bovendien moeten de in het celsap opgeloste of elders in het materiaal aanwezige gassen gedeeltelijk verdreven worden : het materiaal moet in de verschillende vloeistoffen zinken waardoor een volledige penetratie van deze vloeistoffen in de cellen mogelijk wordt. De verhoging van s.g. geschiedt door plaatsing van de bakjes fixatievloeistof, waarin het materiaal drijft in een luchtpompje. Het apparaat blijft in werking totdat alle wortelfragmenten gezonken zijn (±25 minuten).

N.B. In Chroomzuur-fixatie alles eerst spoelen met H_2O.

Vervolgens overgebracht in geperforeerde glazen buisjes die telkens gedurende twee uur gezet worden in bakjes alcohol 96% (2x), alc. abs.(2x) xylol (2x) en paraffine van 58°C. (2x). Het laatste bad wordt dan overgegoten in kleine porceleinen schaaltjes en het Cycas materiaal wordt hierin gerangschikt. Om het kristallisatieproces van de nog vloeibare paraffine langzaam te doen verlopen, wordt het schaaltje (zodra het bovenste laagje paraffine gestold is) in lauw water ondergedompeld.
Na enkele uren kan het blokje paraffine uit het schaaltje gelicht worden en tot kleine blokjes verwerkt worden. Deze blokjes waarin de wortelfragmeneten volledig omsloten moeten zijn door de paraffine zijn nu klaar om gesneden te worden.

ad. c. Het werd gesneden op een Spencer-microtoom, De gunstigste coupedikte bleek bij 10 mu te liggen. Vervolgens worden de paraffine linten op lengte van 2,5 cm. gesneden, met eiwit glycerine op objectglazen geplkt en gedroogd.

ad.d. De paraffine in en om de coupe moet in deze procedure vervangen worden door aqua dest. Dit geschiedt in detail als volgt : het objectglas wordt verwarmd boven een spiritusvlam (totdat de paraffine gesmolten is) en ± een minuut gespoeld in xylol (2x) alc. abs. (2x) alc. 96% (2x) en aqua dest. (2x).

ad. e. De kleuringsprocedure verloopt aldus :
Voorbehandeling in 1% NaCL-oplossing gedurende 90 min.(deze voorbehandeling is niet steeds toegepast)
Hydrolyse in 1 n HCL bij 58°- 60°C.Er is met verschillende hydrolysetijden geëxperimenteerd, variërend van 8-25 min.
Er zijn twee kleuroplossingen gebruikt :

1. Basische Fuchsine (voor recept vgl. 2.2.3) gedurende 4 - 24 uur bij kamertemperatuur en bij 5°C.
2. Giemsa (Giemsa kleuroplossing en aqua dest. verhouding 100:1) gedurende 90 min. bij kamertemperatuur.

ad. f. Permanent maken.
De gekleurde preparaten worden achtereenvolgens gespoeld in leidingwater (2x), alc. 96% (2x), alc abs. (2x), xylol (2x), ingesloten in Canadabalsem, voorzien van een dekglas, gedroogd op een droogplaat bij ± 30°C.,geëtiketteerd en opgeslagen.

2.3.4 Resultaten.

Deze worden besproken aan de hand van de fotoserie III, IV en V (foto's nr. 13 t/m 23) en aan het hieronder volgend schema.

Alc.fix. 1) B.F. : géén kleuring van Anabaena.
Cycas celkernen zwak rood gekleurd.

2) Giemsa : geen, soms zeer vage, kl. van Anabaena
Cycas kernen paarsig, wanden der epidermiscellen rood, xyleem donkerrood.

Chr.z.fix. 1) B.F. : a/ zonder voorbehandeling met 1%NaCL geen kl. van Anabaena, Celdeformaties,
Cycaskernen zwakrood.
b/ met voorbehandeling van 1%NaCL, vage kl. van A Anabaena
Cycaskernen paarsrood.
(vgl. Serie III foto nr. 13 t/m 15.

2) Giemsa : kl. van Anabaena (rode en paarse grana)
Cycaskernen lichtrood.
Wanden der xyleemvaten helderrood,
wanden van de parenchymcellen licht tot donkerblauw.
Celwanden in grenslaag epidermis-parenchym lichtgroen
Epidermis lichtrood.
(vgl. Serie IV foto nr. 16 t/m 18).

Carnoy-fix.1) B.F. : (met en zonder voorbehandeling met 1% NaCL)
geen Anabaena kleuring.
Cycaskernen zwakrood gekleurd.

2) Giemsa : kl. van Anabaena; rode- blauwe grana.
Cycas kleuring als bij Chr.z.fix. en Giemsa, maar duidelijker. (vgl. Serie V foto nr. 19t/m 23).

2.3.5 Discussie.

Het is niet waarschijnlijk dat de gekleurde structuren in de Anabaena-cel (vgl. serie V) identiek zijn met de nucleoïd. Argumenten hiervoor zijn o.a. de niet specifiek DNA-kleurende Giemsa (vgl. Romeis 1968) en het onregelmatig beeld (soms 1, soms 2à3 gekleurde stucturen per cel). Celdeformatie treedt vooral op bij Alcohol- en Chroomzuur fixatie in combinatie met Basische Fuhsine. Voorbehandeling met 1% NaCL kan dit effect - blijkens de resultaten - opheffen. De fysisch- chemische achtergronden hiervan, zijn voorlopig nog onbekend. Dit geldt trouwens ook voor het gehele kleuringsproces (vgl. Romeis 1968).
Wanneer de structuren zoals afgebeeld in serie V als fosfaatgrana te beschouwen zijn, is destructie hiervan met pyrofosfatase wellicht mogelijk. (vgl.2.2.5)

2.3.6 Samenvatting.

In de beschreven experimenten is het bestaan van een nucleoïd in ~~An~~ Anabaena cycadinae, zoals afgebeeld in Cassel en Hutchinson (1958) niet met zekerheid aangetoond.

De in serie V zichtbare structuren in de cel zijn waarschijnlijk identiek met fosfaatgrana waarvan de kleurgevoeligheid bekend is.

(vgl. Fuhs 1958).

---

3. ANDER ONDERZOEK.

3.1 Papaver dubium - experimenten.

Door middel van het bijwonen van een lezing gegeven door dr. A.Koopmans op 13-2-'69 in het Bot. Lab. te Groningen, door gesprekken met dr. A.Koopmans en het lezen van een aantal publicaties is een beeld gevormd van het lopend Papaver - onderzoek.

Kruisingsproeven binnen het geslacht Papaver zijn al eerder uitgevoerd door Mc Naughton (1960) ; hetgaat hier om kruisingsexperimenten binnen de soort Papaver dubium L.Genoemde soort is morfologischsterk variabel, (Hegi 1906 - 1932) in Europa en het is zeer de vraag of hier sprake is van een soort dan wel van meerdere soorten (resp. ondersoorten of variëteiten)
In elk geval is uit karyologisch onderzoek nu gebleken dat er zowel tetraploïden (2n= 28) en hexaploïden (2n=42) in de Europese Papaver dubium voorkomen.
Bij kruisingen tussen individuen uit verschillende delen van Europa afkomstig traden merkwaardigerwijze dwergvormen op. Het lopend onderzoek concentreert zich vooral op deze dwergvormen.
Door moeilijkheden met castratie van individuele bloemen, kweken in de volle grond, het lage kiempercentage, de verschillende bloeitijden (waardoor kruising belemmerd wordt) en vooral het procentueel lage aantal dwergvormen worden de experimenten sterk belemmerd.
De verkregen gegevens worden binnenkort gepubliceerd.

3.2 Neurospora-onderzoek.

Hoewel Neurospora een zeer geliefd genetisch en biochemisch object is, schijnt dit geslacht in cytologisch opzicht weinig onderzocht te zijn. (Strassburger 1962).Bovendien zijn de resultaten van cytologisch werk tegenstrijdig. Tot deze konklusie wordt men gedwongen bij het zien van de kleurenfilm van zich delende somatisch cellen in Neurospora crassa. Een en ander wordt uiteengezet in twee publicaties :
Weijer. J.,A.Koopmans and D.L.Weijer (1963) en Weijer J. and A.Koopmans (1964).

Het is de grote verdienste geweest van genoemde onderzoekers datzij erin geslaagd zijn een techniek te ontwikkelen die het mogelijk maakte de celdeling in vivo te vervolgen.
Het blijkt dat het delingsproces van de somatische cellen volkomen atypisch verloopt : voordat de uiteindelijke verdubbeling is opgetreden zijn een 30-tal fasen verlopen die elk gekarakteriseerd zijn door een eigen vorm van het kernmateriaal.
De uiteindelijke betekenis van dit gecompliceerd proces blijft voorlopig nog onbegrepen.

3.3 Onderzoek aan mijten.

Spintmijten, o.a. behorend tot het geslacht Tetranychus, zijn voor de land- en tuinbouw zeer schadelijke insecten. Zowel de chemische als de biologische bestrijding is een uiterste noodzaak (vgl. Bravenboer 1959). Morfologisch is Tetranychus urticae Koch goed onderzocht. (Gasser 1951, Awarullah 1963 en Blauvelt 1944), desondanks zijn vele detailkwesties onopgelost o.a. de bouw van het geslachtsapparaat in detail, de vorming der gameten en de plaats en tijd van bevruchting. Over het laatste vgl. Gasser (1951) ~~meende receptacula seminis te vinden (dus inwendige bevruchting ?), terwijl Schrader (1923) haploïde mannetjes beschrijft, die ontstaan moeten zijn uit onbevruchte (?)eieren(dus ook een uitwendige bevruchting~~ ?).
Dr. L.Pynacker tracht deze problemen cytologisch te benaderen door weefselkleuring toe te passen om de bouw van het geslachtsapparaat te leren kennen, door DNA- kleuringsmethodes toe te passen op de ovaria, testes en receptacula seminis en door de oögenese en spermatogenese te vervolgen,
Van de resultaten is totnogtoe niets gepubliceerd.

3.4 DNA isolatie van Cyanophyceeën.

Bij Cyanophyceeën is uisluitend een vegetatieve celdeling bekend : sexuele voortplanting door conjugatie is totnogtoe niet aangetoond. Blijkens transformatie proeven, uitgevoerd door Kumas (1962) is er wel degelijk uitwisseling van genetisch materiaal mogelijk. Juist door het ontbreken van deze sexuele voortplantingsstadia is de systematiek van de Cyanophyceeën uitsluitend gebaseerd op morfologische kenmerken.
Door de enorme variabiliteit hiervan (vgl. Singh en Tiwari 1969) is deze indeling hoogst onbevredigend.
Drs. W.Stam tracht beide samenhangende problemen op zeer originele wijze op te lossen door het DNA materiaal van ~~Lyngbia~~ enkele blauwwiersoorten te isoleren, (o.a. Lyngbia Phormidium en Plectonema), te smelten en vervolgens de enkelvoudige draden van twee verschillende soorten te laten hybridiseren. De mate van hybridisatie is nu een maat voor de complementariteit van beide ketens en dus een maat voor de soortverwantschap.
De opbouw van een nieuwe systematiek op genetische basis van deze moeilijke groep is nu in theorie mogelijk.

3.5 Onderzoek aan gisten.

Het is vooral de mitose van lager georganiseerde planten (zoals b.v. schimmels) die in vele gevallen atypisch verloopt : het onderzoek van Koopmans en Weijer (1964) zoals beschreven in 3.2 heeft dit aangetoond voor Neurospora. Robinov (1968) toonde dit aan voor Saccharomices cerevisiae. De resultaten van Phralada Rao en Koopmans (1966) waren in grote lijnen hiermee in overeenstemming. Bovendien hebben deze schrijvers het bestaan aangetoond van centriool-achtige lichaampjes die met de kern verbonden zijn. Deze structuren vertonen gelijkenis met de spoelfiguur die bekend is van hogere georganiseerde organismen.
Op dit moment onderzoekt dr. Koopmans een derde primitieve schimmelsoort Nematospora coryli, waarbij mogelijk ook dergelijke structuren aan te treffen zijn.

3.6 Bestralingsexperimenten. (~~U.V.~~). (Röntgen)

Zowel kiemend als droog zaad van Papaver apulum en Campanula persicifolia werden gedurende een gevarieerde tijd met ~~U.V.~~ Röntgen bestraald en vervolgens uitgezaaid. Bij het bereiken van het voortplantingsstadium werden de individuele planten morfologisch gekarakteriseerd, waarbij vooral optredende abnomaliteiten beschreven werden. Bovendien werd aan de antheren cytologisch onderzoek gedaan naar chromosomale afwijkingen.

Hieruit bleek dat zowel chromosomale afwijkingen als morfologische abnormaliteiten (o.a. bloemkleurafwijking van C. persicifolia) niet gecorrelleerd waren aan de tijdsduur van ~~U.V.~~ de-bestraling in het zaadstadium.
De gegevens van dit onderzoek zijn nog niet gepubliceerd.

LITERATUURLYST.

Allen M.M. 1968.
Ultrastructuren of the cellwall and celldivision of unicellular Blue Green Algae.
J. of Bact. 96. 3. p. 842.

Allsop A. 1968.
Germination of Hormocysts of Scytonema javanicum and the function of Blue-Green Algae Heterocysts.
Nature 220 p. 810.

Awarullah M. 1963.
Beiträge zur Morfologie und Anatomie einziger Tetranychiden.
Zeitschr. f. angew. Zoöl. 50 p. 385-426.

Blauvelt W.E. 1944.
The internal morphology of the Common Red Spider Mite.
New York.

Boudijn K. 1966.
De wereld der planten III. Lagere planten.
Den Haag.

Bravenboer L. 1959.
De chemische en biologische bestrijding van de spintmijt Tetranychus urticae Koch. (diss).
Wageningen.

Cassel W.A., and W.G. Hutchinson. 1954.
Nuclear studies on the Smaller Myxophyceae.
Exp. Cell Research. 6. p. 134 - 150.

Counce S.J. 1968.
Development of Composite Eggs in Miastor.
Nature 218. p. 781 - 882.

Dutt M.K. 1968.
Effect of temperature on in situ Feulgen Reaction with Schiff Reagent at less acid pH.
Experientia 24. p. 1240 - 1241.

Echlin P. 1966.
The Blue Green Algae.
Scientific American. 6. p. 75.

Fay P. et al. 1968.
Is the Heterocyst the site of nitrogen fixation
in the Blue Green Algae ?
Nature 220 p. 810.

Fruton S.J. and S.Simmons. 1950.
General Biochemistry (p. 583).
New York.

Fuhs G.W. 1958.
Über die Natur der Granula im Cytoplasma von Oscillatoria amoena.
Oesterr. Bot. Zeitschr. 104 Heft 4 - 5.

id. 1958.
Bau, Verhalten und Bedeutung der kernäquivalenten Structuren
bei O. amoena.
Arch. f. Microb. 28 p. 270.

id. 1963.
Cytochemisch - electronenmicroskopische Lokalisierung der
Ribonucleinsäure und des Assimilats in Cyanophyceae.
Protoplasma 56. 1.

Gasser R. 1951.
Zur Kenntnis der gemeinen Spinmilbe Tetranychus urticae Koch.
Mitt. der Schweizerischen Entomologische
Ges. 24. p. 217 - 262.

Geitler L. 1958.1960.
Schizophyceen. Berlin.

Haupt A.W. 1923.
Cellstructure and division in Cyanophyceae
Botanical Gazette 75. p. 170.

Giesbrecht P. 1958.
Vergleichende Untersuchungen über einige Reactionen der Chromosomen
von Bacillus megaterium und Amphidium elegans.
Vierter Int. Kongress f. E. Microscopie I
Berlin.

Hegi F. 1906-1932.
Illustrierte Flora von Mittel Europa.
München.

Hopwood D.A. and A.M. Glauert. 1960.
The fine structure of the nuclear material of a Blue Green Alga.
J. of Cellbiol. 8. p. 813-823.

Jost M. 1965.
Die Ultrastructur von Oscillatoria rubescens D.C.
Arch. f. Microb. 50. p. 211-245.

Koopmans A. z.j.
Verslag van een studieverblijf in het Gen. Lab. der Univ. Lund (Zwe).
Privé bibl. A.Koopmans. Haren (Gr.)

Kumar H.D. 1962.
Apparent genetic recombinations in a Blue Green Alga.
Nature 196. p. 1121 - 1122.

Kwamatu S. 1965.
E.M. observation in Blue Green Algae in the leaf of Azolla imbricata Nakari.
Cytologia 30. 1. p. 75.

Lindegren C.C. c.s. 1955.
The lokalisation of metaphosfate in the yeastcell.
Cytologia 10. p. 185.

Luftig and Haselkorn. 1967.
Morpfology of a virus of Blue Green Algae and propeties of its DNA.
J. Virology 1. p. 344 - 368.

id. 1968.
Studies on the structure of L.P.P. 1.
J. Virology 34.p. 664 - 674.

Mc Naughton H. 1960.
International breedings ~~station.-Report~~ in Papaver.
Scottish plant breeding station.
Report 1960.

Miller H.W. c.s. z.j.
Liquid deleigent in aqueous fixing Gluids etc.
Stain Technology 43. 6. p. 303.

Prahlada Rao, L.S. and A. Koopmans. 1966.
A spindle analogue in Saccharomyces cerevisiae.
Experientia 22. p. 1 - 4.

Pringsheim E.G. 1965.
Oscillatoria aghardii var. suspensa. (nov. var.)
Arch. f. Microb. 50 p. 440 - 413.

Ris H. and R.N. Singh. 1961.
E.M. -studies on Blue Green Algae.
J. of Bioph.Cytol. 9 p. 63.

Romeis B. 1968.
Microskopische Techniek.
Wien.

Safferamn and Morris. 1963.
Algae virus - isolation.
Science 140. p. 679 - 686.

id. 1964.
Blue green Algal virus L.P.P. - 1 purification and partial characherization.
Science 144. p. 1127 - 1130.

id. 1964.
Growth characteristic of L.P.P. - 1
J. of Bact. 88. 3. p. 771 - 775.

Schrader F. 1923.
Haploïdie bei einer Spinnmilbe.
Arch. f. Mikroscopische Anatomie 37 p. 610.

Singh R.N. and D.N. Tiwari. 1969.
Introduction by U.V. irradiation of Mutation in Blue Green Alga.
Nature 221 p. 63.

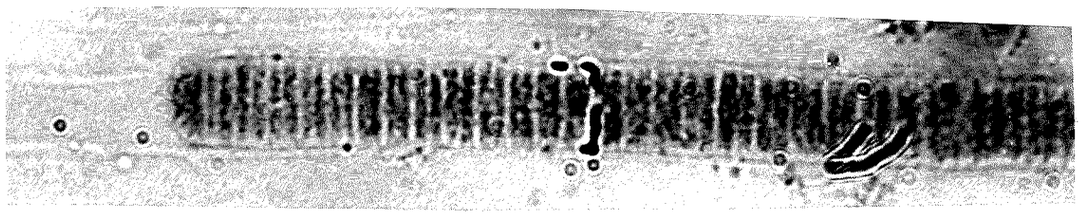
Weijer J., A. Koopmans andD.L.WEijer. 1963.
Karyokinesis in vivo of the migrating somatic nuclei of Neurospora and Gelasinospora species.
Transactions of the New York Ac. of S
Serie II 25. 8. p. 846.

Weijer J. and A. Koopmans. 1964.
Karyokinesis of somatic nuclei of Neurospora crassa II.
DNA replication in synchronous by dividing conidial nuclei.
Canadian J. of Gen. and Cyt. 6.4.p.426
430

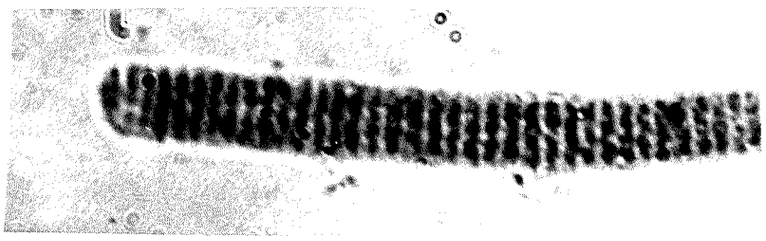
Widra A. 1959.
Metachromatic granules of microorganisms.
J. of Bact. 78. p. 664 - 660.

Zastrov E.M.von 1953.
Über die Organisation der Cyanophyceenzelle.
Arch. f. Microb. 19. p. 174 - 205.

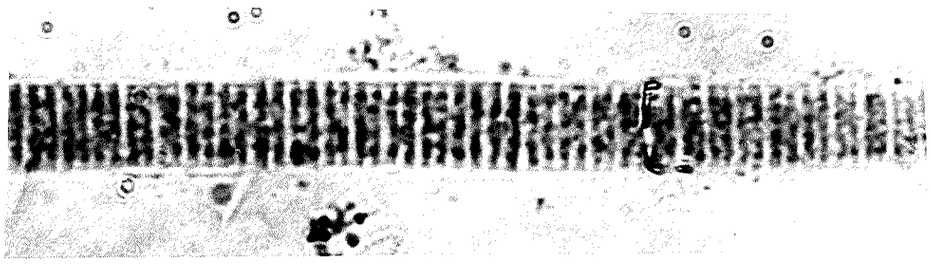
SERIE I. Oscillatoria tenuis Bas. Fuchs.-kleuring.



f. 1. 7 min. hydrol.



f. 2. 10 min. hydrol.

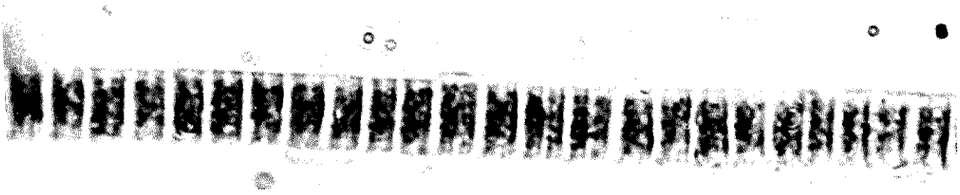


f. 3. a. 11 min. hydrol.

f. 3. b. 11 min. hydrol.

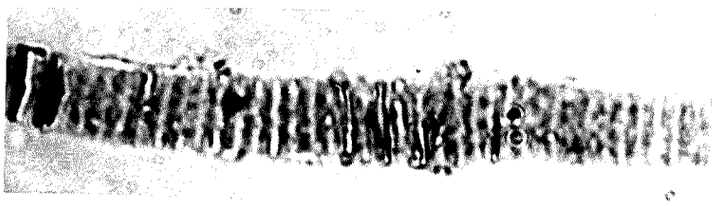
SERIE I

f. 4 a. 13 min. hydrol.



f. 4 b. 13 min. hydrol.

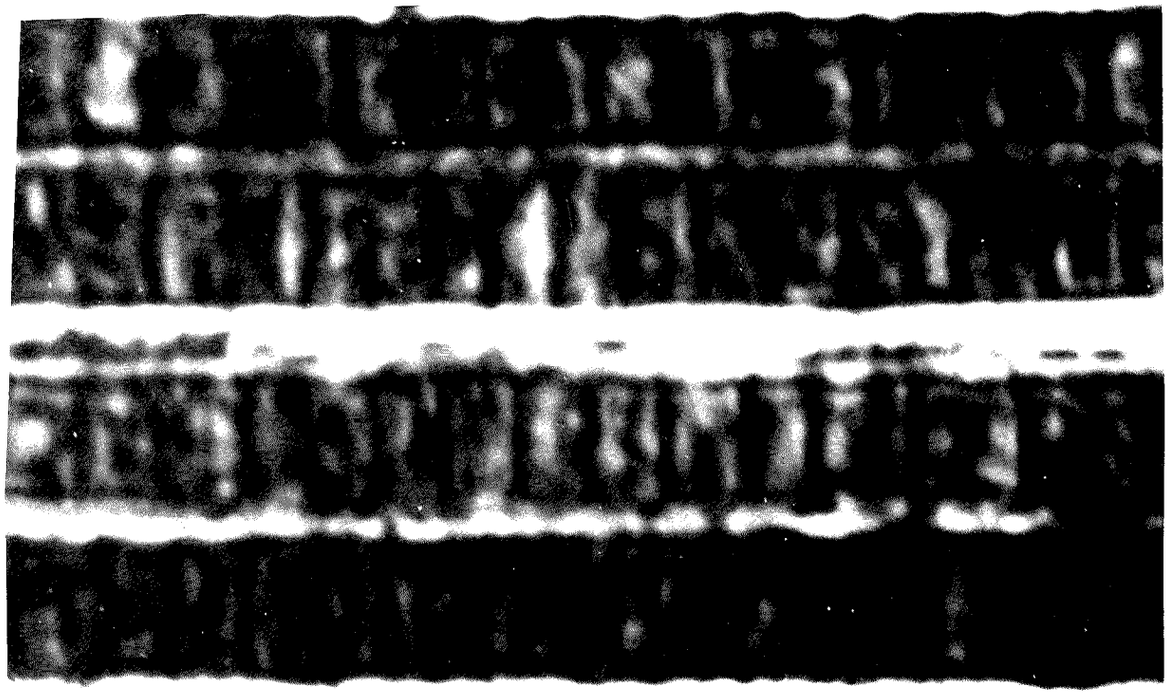
f. 5 15 min. hydrol.



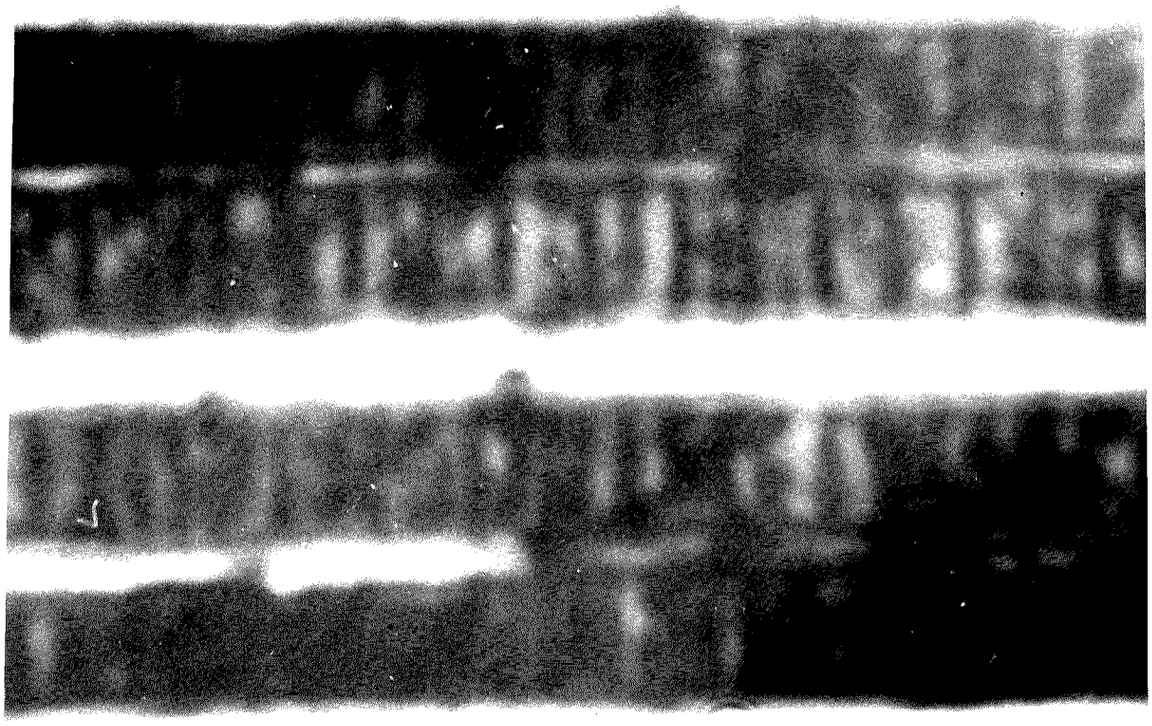
f. 6. 17 min. hydrol.

SERIE II Oscillatoria tenuis. Bas. Fuchs – Kleuring.

Kl. tijd : ± 32. uur.

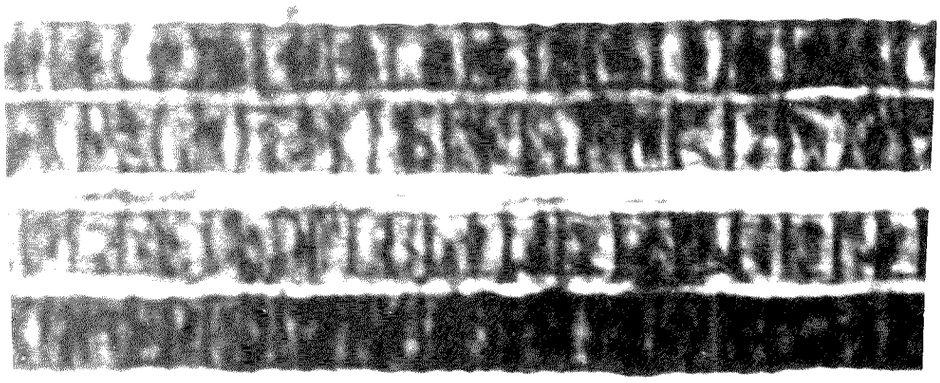


f. 7.

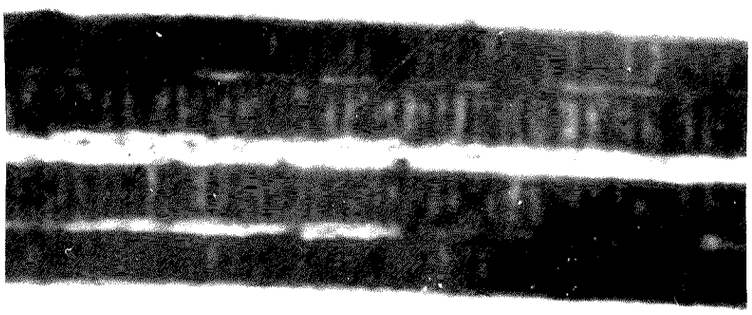


f. 8.

SERIE II



f. 9.



f. 10.

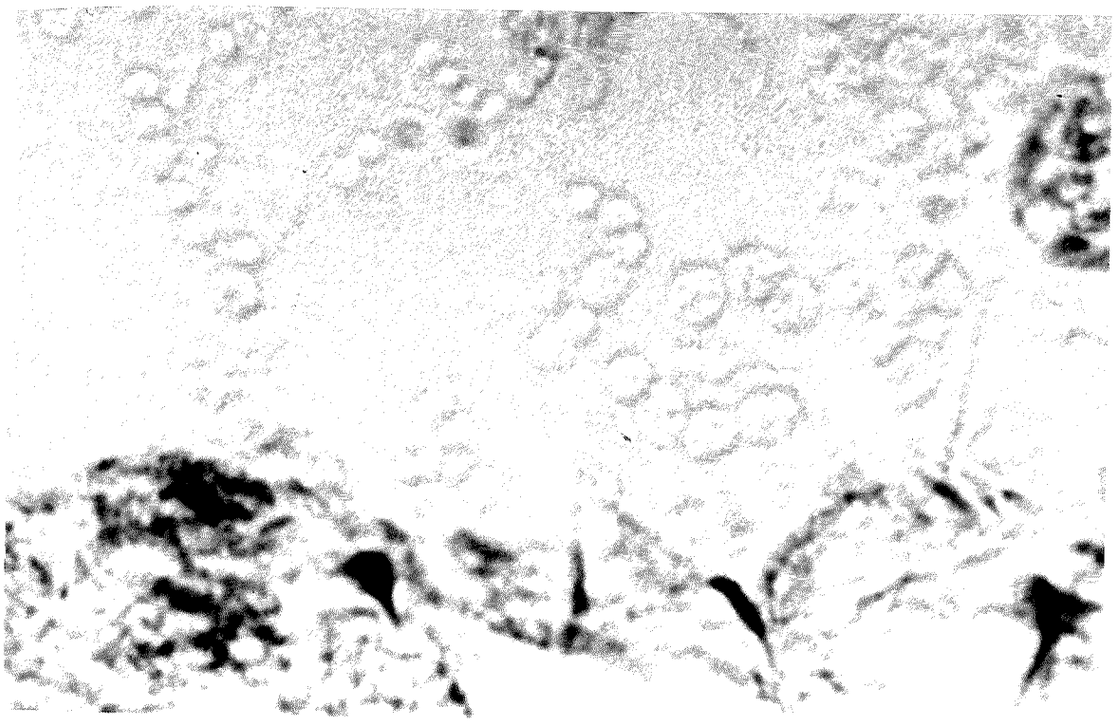
f. 11.

f. 12.

SERIE III Anabaena cycadinae. Chr. z. fix. vóórbeh. 1% nacf.

Bas. Fuch.-kl.

f. 13.



f. 14.

SERIE III

f. 15.

SERIE IV Anabaena cycadinae. Chr.z.fix. Giemsa-kl.

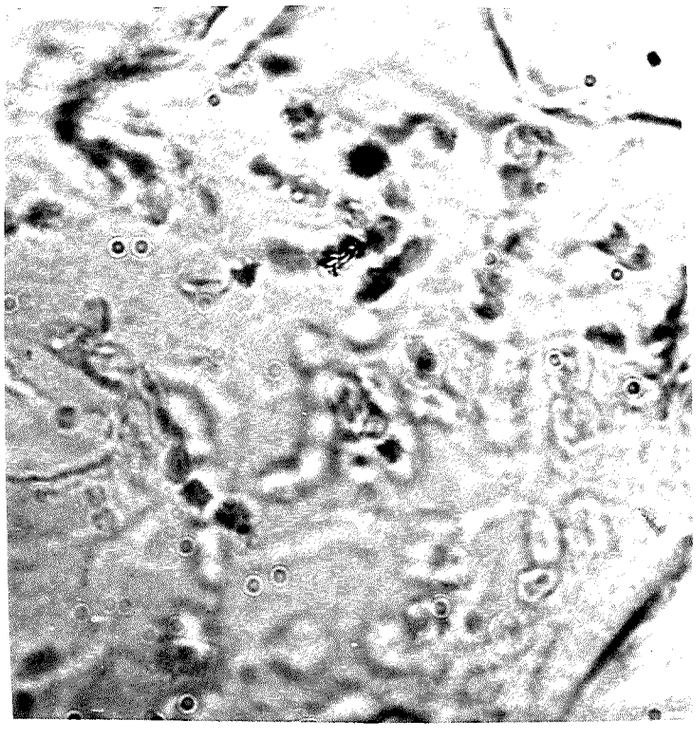
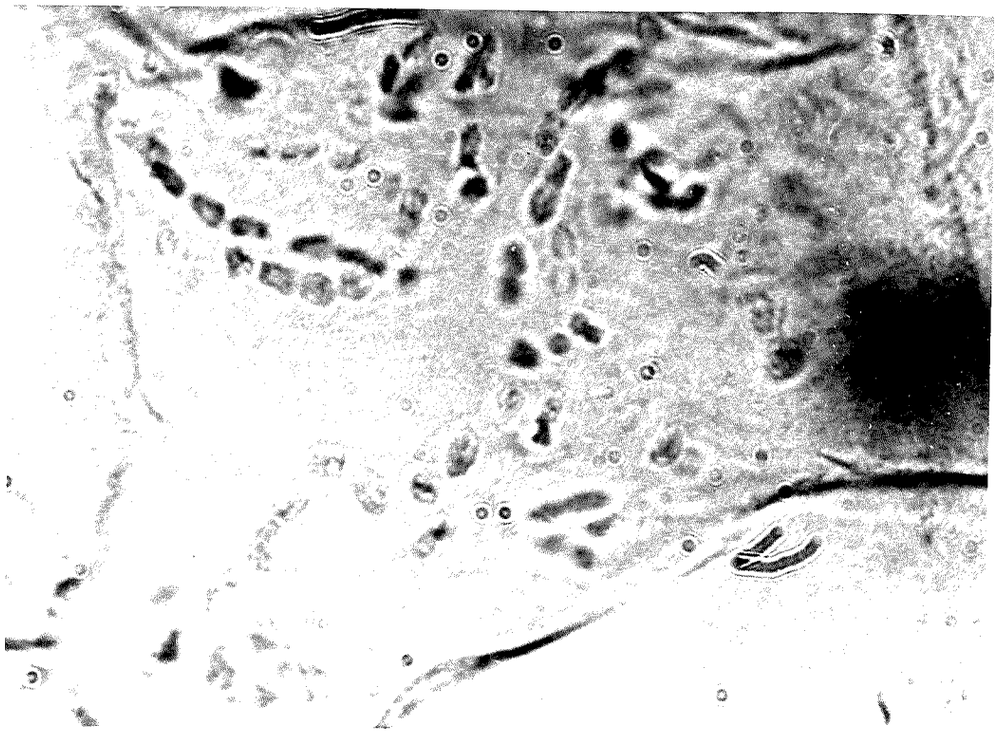
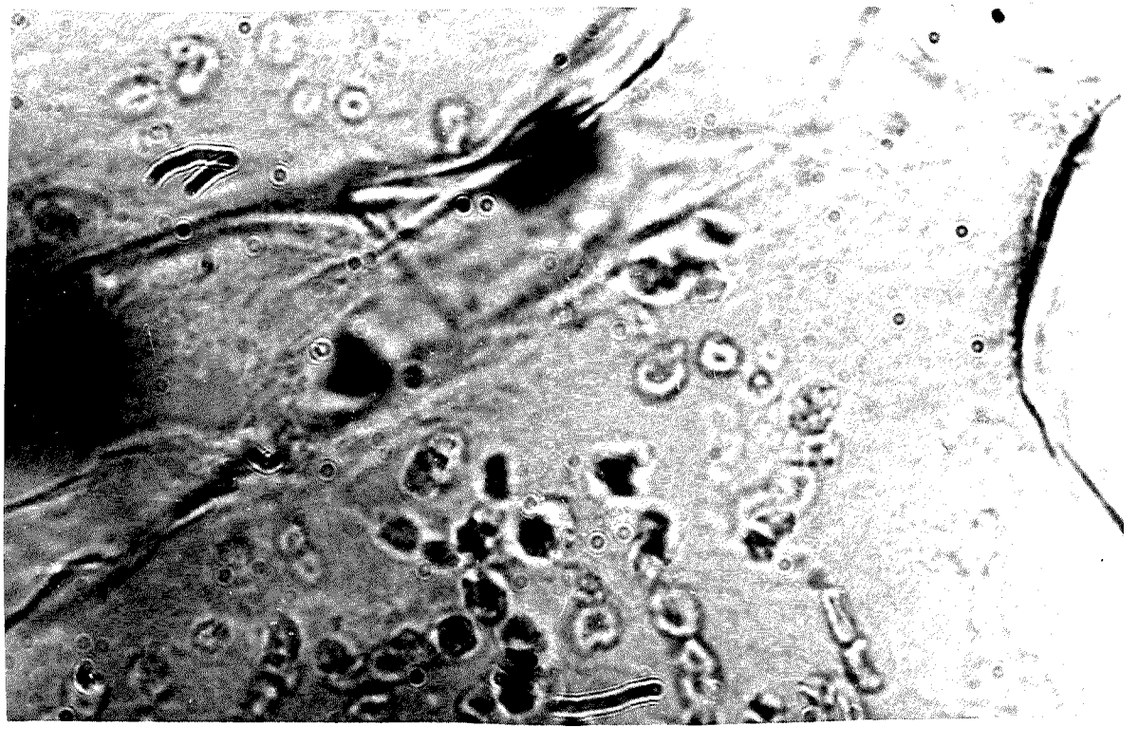


foto nr. 16.



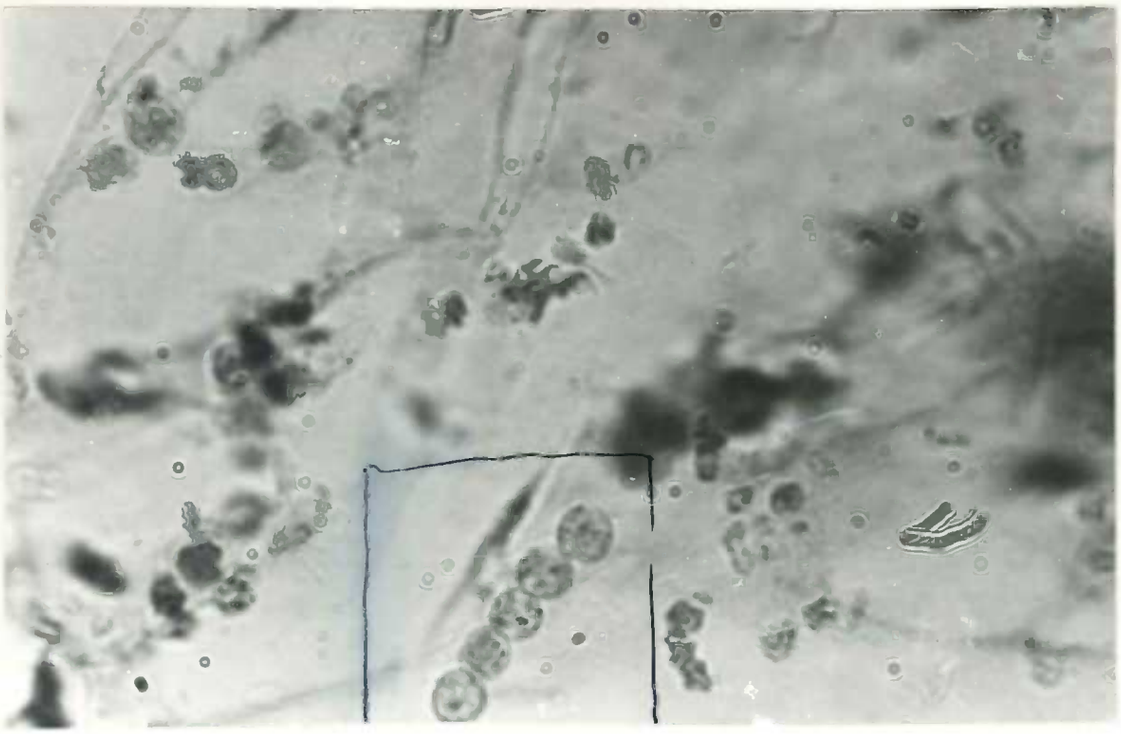
f. 17.

SÉRIE IV

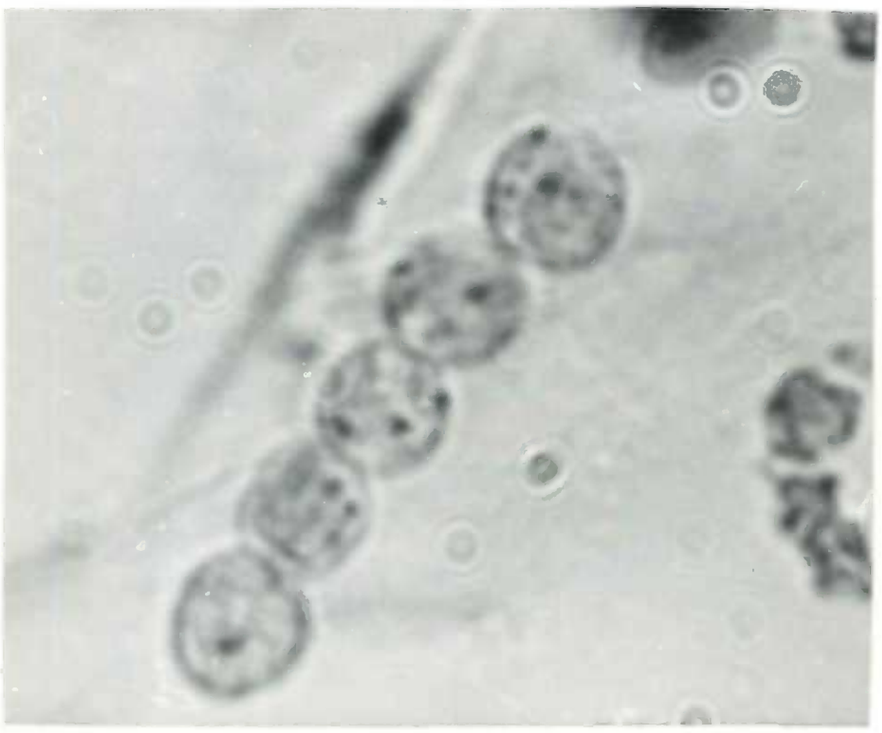


F. 18.

SERIE V Anabaena cycadinae. Carnoy-fix. Giemsa-kl.

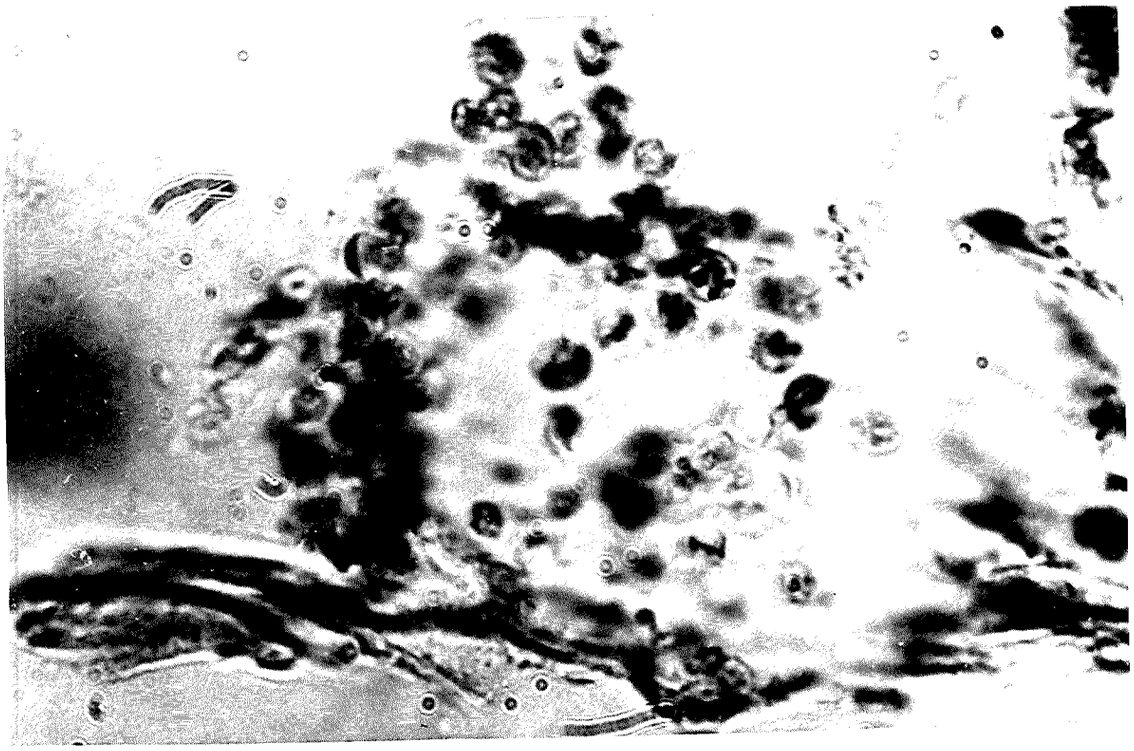


f. 19.



f. 20.

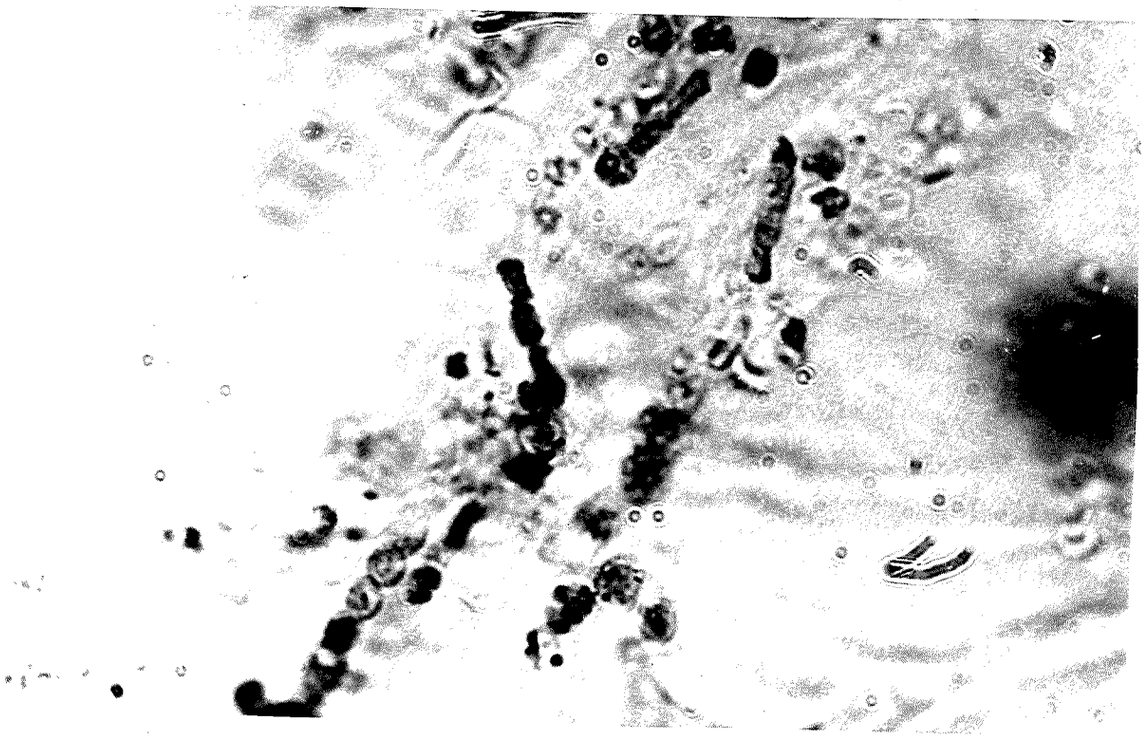
SERIE V



f. 21.

f. 22

SERIE V



f. 23.