D507

VERSLAG CYTOGENETIKA

uitgevoerd sept. 1968 - april 1969

o.l.v. L.P. Pijnacker

door C.C. ten Hallers-Tjabbes.

INHOUD.

INLEIDING	p 1
ONDERZOEK NAAR OOGENESE BIJ DIVERSE DIERSOORTEN	" 2
OPZET EN DOELSTELLING VAN HET ONDERZOEK	" 9
MATERIAAL EN METODEN	" 10
MAT & MET :SQUASHES	" 13
RESULTATEN	" 18
LITTERATUUR	" 20

INLEIDING .

De spintmijt, Tetranichus urticae (Koch), is zeer schadelijk voor fruitgewassen. De laatste jaren vertoonde het dier een zeer snelle uitbreiding, waarbij het vermoeden (21) rees dat onder invloed van DDT-produkten versnelling van de eivorming-en afzet optrad. De noodzaak van een gedegen onderzoek naar de oögenese, spermatogenese & de faktoren die hierbij een rol spelen deed zich gelden.

Er is over de spintmijt op dit gebied slechts zeer weinig bekend. De mogelijkheid dat de mijt zich zowel partenogeneties als amfigoon kan voortplanten wordt niet uitgesloten geacht. Voorts is bekend dat het ovarium van Tetranichus urticae asimmetries is.

Het hieronder vermelde onderzoek was erop gericht om iets meer omtrent het mijtenovarium gewaar te worden. Hierbij was het van belang om enig houvast te hebben aan onderzoek van ovaria van diverse andere dieren. Aan veelerlei insekten, andere geleedpotigen (waartoe ook Tetranichus behoort) & gewervelde dieren is reeds uitgebreid onderzoek op dit gebied verricht.

ONDERZOEK NAAR OOGENESE BIJ DIVERSE DIERSOORTEN

Algemeen geldt dat in jonge ovaria oögoniën aanwezig zijn waaruit oöcyten en bij bepaalde groepen ook voedingscellen ontstaan in latere stadia.
Hierbij wordt onderscheid gemaakt tussen het panoïsties en het meroïsties ovarium. Bij het panoïsties ovarium ontstaat uit ieder oögonium een oöcyt, bij het meroïsties ovarium ontstaan uit sommige oögonia oöcyten, uit andere zgn. voedingscellen. Bij de meeste dieren komen follikelcellen voor, deze liggen meestal als een envelop om de oöcyt of om een groep cellen, bestaande uit een oöcyt en een aantal voedingscellen, doch dan alleen tot aan de voedingscellen heen. zie fig (19, 13, 12).
In het panoïsties ovarium voorziet de 'germinal vesicle' de oöcyt van bepaalde stoffen die nodig zijn voor zijn ontwikkeling. In het minder primitieve meroïstiese ovarium wordt de funksie van de germinal vesicle overgenomen door de voedingscellen, die door cytoplasmastrengen verbonden zijn met de oöcyt (17).(12, 13)

Voorzover er onderzoek is verricht aan de ovaria van geleedpotigen (waartoe ook de Arachnoïdea behoren) kwam steeds een meroïsties ovarium voor. Bij Tetranichus staat dit echter nog niet vast. Over het voorkomen van follikelcellen is bekend dat bij Limulus polyphemus (kreeft) geen follikelcellen voorkomen, doch wel een laag

filamenteus materiaal (7), bij sommige spinnen zijn tamelijk rudimentaire follikelcellen gevonden (16) verwijzing)

Aan meroïstiese ovaria van insekten is uitgebreid onderzoek verricht; o.a. hierop wordt in het onderstaande nader ingegaan. Het vermoeden bestaat dat ook bij Tetranychus voedingscellen aan wezig zijn. Bestudering van onderzoek op dat gebied bij andere dieren is daarom van belang.

In het meroïstiese ovarium staan de voedingscellen in verbinding met de oöcyt doormiddel van plasmabruggen. Deze plasmabruggen werden bij de mitose gevormd door inkomplete cytoplasmadelingen. Deze bruggen zijn soms door een dichte prop afgesloten, welke in een aantal gevallen geperforeerd is, mogelijk dient deze prop als kontrôleventiel voor de uitwisseling tussen de twee cellen. Er is soms geen verbinding tussen de voedingscel en de oöcyt tijdens de dooiervorming, die in het vitellogenesestadium plaats vindt(19).

De follikelcellen die om de oöcyt heenliggen staan niet in verbinding met de oöcyt; tussen deze follikelcellen liggen echter dikwijls kanalen, zij geven een mogelijkheid tot verbinding tussen het cirkulatiesisteem en het oppervlak van de oöcyt(20). Ook aan de kanalen Tussen de follikelcellen bevindt zich tijdens de voortschrijdende ontwikkeling een dicht netwerk van microvilli op het oöcyten opp., deze vergroting van het oppervlak geeft een mogelijkheid tot

grotere opname van materiaal afkomstig van buiten de cel(18).

Gedurende de eerste ontwikkelingsstadia, tot en met de previtellogenese groeien de oöcyt en de dochtercellen met identieke snelheid. Tijdens de vitellogenese echter groeit de oöcyt veel sneller dan de voedingscellen, die na verloop van tijd slinken en degenereren (12). Soms groeit de voedingscel ook tijdens de vroege vitellogenese nog zeer snel, om dan later toch te degenereren (1). De nucleus van de oöcyt heeft in de vroegere ontwikkelingsstadia de vorm van een karyosoom, vanaf het stadium waarbij de oöcyt sneller gaat groeien dan de voedingscellen is zijn nucleus echter samengebald tot een karyosfeer, hetgeen op een sinteties niet aktief mechanisme duidt(11).

Het is aannemelijk dat in het meroïsties ovarium de oöcyt stoffen die nodig zijn voor de groei vanaf een bepaald stadium uit bronnen buiten de oöcyt moet betrekken. Deze stoffen kunnen zijn: RNA (N.B.) (nodig voor proteïne sintese), proteïnen en proteïnevoorlopers, lipiden, glycogeenpartikels; voorts kunnen mitochondria en partikels van aanverwante struktuur van buitenaf aangevoerd moeten worden. Deze toevoer kan verzorgd worden door: Follikelcellen, voedingscellen, het extracellulaire cirkulatiesisteem &, in het telotrofe ovarium trofies weefsel. Het telotroof ovarium heeft, in tegenstelling tot het po-

N.B. Dit RNA is ribosomaal, dit geldt ook voor het vervolg tenzij expliciet anders is gesteld

lytroof-meroïsties ovarium geen voedingscellen, doch een trofies weefsel dat met lange cytoplasmastrengen met de oöcyt verbonden is. Deze cytoplasmastrengen lijken op het axon van zenuwcellen (3).

Diverse onderzoekers hebben gevonden dat de jonge oöcyt, bij meroïsties & panoïsties ov. tijdens de stadia tot dat van de vitellogenese nog wel RNA maakt, hoewel dit soms zeer weinig is (2, 10). Dit RNA is van het ribosomale tiepe (6), het is in deze vroege stadia ook aantoonbaar metabolies aktief (4, 8). Bij het optreden van de vitellogenese of bij het voortschrijden van dit stadium (dit hangt af van het bestudeerde soort), werd in de meroïstiese ovaria geen RNA-sintese in de oöcyt of -aktiviteit meer waargenomen. Mogelijk treedt in de rijpe oöcyt een blokkering van het RNA op, welke blokkering opgeheven wordt door bevruchting of door partenogenetiese aktiviteit (8) (dit is een niet bewezen veronderstelling). Zo zou een maternale kontrôle op de vroege embryonale ontwikkeling geregeld kunnen worden. Bij Xenopus laevis (klauwkikker) (~~pad~~), die een niet-meroïsties ovarium bezit, manifesteert zich direkt na de bevruchting, in het dan aan te tonen germinaal cytoplasma, RNA dat waarschijnlijk ribosomaal is en als zodanig aktiviteit kan ontwikkelen (5). Dit kan eveneens duiden op maternale kontrôle, daar het RNA uit het ei afkomstig is.

Daar de oöcyt vanaf een bepaald stadium zelf geen RNA meer produceert, doch dit bij zijn ontwikkeling wel nodig heeft, dient dit RNA uit andere bron opgenomen te worden. In de follikelcellen (bij diverse diersoorten) is grote RNAsintetiese aktiviteit waargenomen, maar deze RNA gaat vermoedelijk niet naar de oöcyt. Aangenomen wordt dat het eenx rol speelt bij de sintese van proteïnen die naar de oöcyt gaan, hetzij

direkt, hetzij bij de vorming van een adsorbans om proteïnen uit het bloed op te nemen (19). Bij insekten is aangetoond dat proteïnen tijdens de vitellogenese door de oöcyt uit het bloed worden opgenomen (3), door pinocytose aan het uitgestulpte oppervlak van de oöcyt (2, 19). Deze pinocytose is mogelijk de oorzaak van het feit dat de dooierproteïnen in het oöplasma niet vrij aanwezig zijn, doch in bollen ingesloten (19). Waar deze bloedproteïnen worden gemaakt is niet bekend, evenmin als waarlangs ze naar binnen gaan.

Hoge RNA-omzet is ook waargenomen in de kernen van de voedingscellen; de hoogste RNA-omzet▲, ooit in dierlijk weefsel waargenomen, werd gevonden in de voedingscelkernen van Dipteren (3). Het in de nucleus van de voedingscel gevormde RNA gaat snel naar het cytoplasma & wordt via de cytoplasmabruggen getransporteerd naar de oöcyt (19). Bij Diptera is gevonden dat het RNA-transport van de voedingscel naar de oöcyt reeds lang voordat de voedingscel zijn maximale afmetingen heeft bereikt op gang komt. Het transport blijft met wisselende intensiteit doorgaan tot het einde der meiotiese profase. Bij de regulatie van de hierbij betrokken processen (groei van de kern van de voedingscel & toevoer van RNA aan de oöcyt) speelt de oöcyt een belangerijke rol.*(14). Uiteindelijk degenereert de voedingscel en vloeit een gedeelte van zijn cytoplasma in de oöcyt; de nucleus kan dan meegaan, doch dit hoeft niet het geval te zijn (19).

▲ Het RNA wordt gevormd als precursors van ribosomen.

* De aard van deze rol is niet bekend

Doordat bij het meroïsties Ovarium een RNA-bron buiten het premeioties genoom ingesteld wordt en door de polyploïditeit is de transkripsiekapaciteit per tijdseenheid sterk verhoogd. Dit blijkt bij een vergelijking van de ontwikkelingssnelheid van oöcyten bij dieren met een panoïsties en dieren met een meroïsties ovarium, de laatsten ontwikkelen zich veel sneller.(17).

In het panoïsties ovarium, waar de RNA-sintese in de oöcyt afneemt tijdens de vitellogenese (2), wordt een verhoogde effektiviteit bereikt door konservering van het m. RNA*, hoever dit effekt reikt is echter niet bekend (3).

De voedingscellen kunnen behalve RNA ook lipide druppels, mitochondria en andere filamenten van onbekende samenstelling aan de oöcyt leveren (3). In het verbindingsgebied tussen de oöcyt en de voedingscellen zijn talrijke mitrochondria aangetroffen, evenals organellen van heterogene struktuur, die mogelijk voorlopers zij van dooierschollen (18). Ook proteïnen en proteïnevoorlopers en de -losliggende- nucleoli uit de voedingscel kunnen vanuit de voedingscel naar de oöcyt getransporteerd worden .

Lipidetransport in de richting van de oöcyt kan ook door de follikelcellen geregeld worden, b.v. bijde klauwkikker, er is daar estrogeensintese, die resulteert in lipidemobilisatie, waargenomen (9).

Bij Limulus polyphemus, die geen follikelcellen heeft, wordt de initiale dooiervorming door intraoöcytaire processen verzorgd, later worden voorlopers van dooiermateriaal door micropinocytose uit extraoöcytaire bron opgenomen (7).

* Dit wordt mogelijk gemaakt door lange levensduur v.d. matrijzen.

Verschillen tussen de voedingscellen van amfigoniese en partenogenetiese dieren werden bestudeerd bij Aphidae (bladluis), een dier dat zich zowel amfigonies als partenogeneties kan voortplanten. Bij het amfigone wijfje ontstaan de voedingscellen tengevolge van endomitotiese delingen (zoals normaal is bij de ontwikkeling tot voedingscellen). Bij het partenogenetiese wijfje treedt echter ook meiose op in die oögoniën die voedingscellen moeten worden. Het delingsproces houdt hierbij op bij het pachyteenstadium, de bivalenten scheiden zich dan af. Terwijl bij het anfigone wijfje het ovariool is samengesteld uit een ei en een aantal hoogpolyploïde voedingscellen, bevat het ovariool van het partenogenetiese wijfje oöcyten in verschillende stadia & embryo's in diverse ontwikkelingsstadia naast voedingscellen die diploïd of tetraploïd blijven gedurende de gehele reproduktieve periode van het dier. (15)

Uiteindelijk is te zeggen dat in het meroïsties ovarium de oöcyt vanaf het vitellogenese stadium zijn RNA uit de voedingscellen betrekt, in het panoïsties ovarium moet de oöcyt zelf in zijn RNA behoefte voorzien.

OPZET EN DOELSTELLING VAN HET ONDERZOEK.

In het mijtenovarium zijn in een aantal ontwikkelingsstadia cellen aangetroffen die ogenschijnlijk met elkaar in verbinding stonden. (Pijnacker) Hoeveel cellen met elkaar in verbinding stonden was niet bekend. Hoewel de cellen die met elkaar in verbinding stonden steeds volkomen identiek leken, (van H?) leek dit een aanwijzing te zijn dat het hier ging om een sisteem van met elkaar in verbinding staande voedingscellen en oöcyt. De bedoeling van ondervermeld onderzoek was om na te gaan hoeveel van deze cellen met elkaar in verbinding stonden, eventueel na te gaan of zich in latere ontwikkelingsstadia van het mijtenovarium verschillen tussen de onderling met elkaar in verbinding staande cellen manifesteerden, en, als dit ~~xxx~~ onderzoek resultaat had opgeleverd RNA-transport door de verbindingsgebieden tussen de cellen plaats vond. Als dit laatste ~~xxxx xxx~~ aan te tonen zou zijn, en zeker als het transport gericht bleek op een van de cellen, zou dit een sterke aanwijzing zijn dat we hier met een voedingscellen-oöcyt verbindingssisteem te maken hebben.

MATERIAAL EN METODEN.

Het onderzoek werd verricht aan wijfjes van de spintmijt Tetranichus urticae Koch. Er werd gebruik gemaakt van wijfjes in het volwassen stadium, het zgn adultusstadium (21). Deze wijfjes werden met medewerking van mejuffrouw L. Diephuis verzameld, gefixeerd en tot mikrotoompreparaten verwerkt.
Het verzamelen geschiedde door de adultuswijfjes met een fijn glasbuisje op te zuigen van het blad, de dieren werden opgevangen in een verzamelpotje. De mijten werden vervolgens gefixeerd, afhankelijk van het soort kleuring die later toegepast zou worden in san felice(waterig) of carnoy (alkoholies fixatiemiddel). Het doel van de fixatie is om het weefsel hard te maken, [redacted]. In het waterige fixatiemiddel moesten de mijten kunstmatig ondergedompeld worden, dit geschiedde in een glazen buisje dat met lapjes aan beide uiteinden afgesloten werd en, geheel gevuld met sanfelice, in een bakje met hetzelfde fixatiemiddel ondergedompeld werd.

Na fixatie werden de mijten soms na spoelen (sanfelice) via een aantal overgangsbaden (alkohol 70 %, alkohol 96 %, absolute alkohol, xylol of toluol) ingebed in parafine. Van dit in parafine ingebedde materiaal werden blokjes gesneden waarvan met behulp van het mikrotoom opeenvolgende koeps werden gesneden. Deze koeps werden in volgorde op objektglazen geplakt, het plakmiddel was hierbij verdunde eiwitglycerine. De dikte van de preparaten was 7 of 4 µ.

De preparaten werden nu verwarmd, zodat de parafine smolt. Vervolgens werd door doorvoering door xylol-alkohol-water-baden het preparaat geschikt gemaakt om een [redacted] kleuring te ondergaan. Nadat het preparaat gekleurd was werd het water weer uit de koeps verdreven door w-a-x-baden, het preparaat was nu geschikt om ingebed te worden in canadabalsem, op de candabalsem werd een dekglas geplakt, na droging was het preparaatnu permanent geworden.

Het kleuren van preparaten bestaat vaak uit drie behandelingen:

1. Het [redacted], beitsen.
2. Het kleuren.
3. Het differentiëren; vaak werd de kleur bij de eerste behandeling te donker, door spoelen met water werd dan een gedeelte van de kleurstof onttrokken. Deze behandeling is echter niet altijd nodig.

Als eerste kleuring werd een enkelkleuring, de haematoxilynekleuring toegepast. Hierdoor werden de kernen [redacted] donkerblauw en het overige weefsel zwak of niet gekleurd. De toegepaste fixatie was sanfelice. Bij deze kleuring was differentiëren wel nodig. evenals beitsen Celwanden en kernen waren met deze kleuring goed te zien. Voor het overige leken de resultaten voor ons doel nogal onbevredigend, zodat werd overgegaan op een andere kleuringsmetode, een dubbelkleuring: Mayers haemaluin- erytrosine. hierbij werden de preparaten door twee verschillende

kleurstofbaden gevoerd, zodat nu niet een kontrast gekleurd-ongekleurd optrad, doch een kontrast kleur A-kleur B. Haemaluin kleurde hier blauw en erythrosine rood. De kleuring geschiedde als volgt: het preparaat werd eerst enige tijd in haemaluin gedompeld, vervolgens werd goed gespoeld met water, waarna het preparaat in een erytrosine kleurbad werd geplaatst. Hierna werd weer gespoeld met water. Goede kleuringsresultaten werden verkregen met de volgende behandelingstijden voor:

Haemaluin	spoelen	erytrosine	(tijd in minuten)
15	8/7,5	2/3	min.

Bij langere spoeltijden en/of langere tijden in het erytrosinebad werd de kleuring over het algemeen te rood. Zeer goede resultaten gaf ook een omgekeerde kleuringsvolgorde met de volgende tijden te zien:

erytrosine	spoelen	haemaluin	
2	17,5	15	min.

De permanent gemaakte preparaten werden steeds bekeken onder een gewone lichtmikroskoop met objektief vergroting van 40 en 100 X.

Er traden bij deze wijze van preparaten maken nogal wat moeilijkheden op. Ten eerste was het maken van goede opeenvolgende preparaten zeer moeilijk te verwezelijken, daar door het nogal tere materiaal veel van de koeps tijdens een van de behandelingen sneuvelden of verkreukeld werden (meestal bij het snijden of opplakken van het materiaal). Ook het verwezelijken van een goede kleuring, waarbij we iets te weten konden komen omtrent de aard van de cellen bleek zeer moeilijk.* Voorts was in deze

* Buiten de kernen was van de celinhoud weinig te zien, hergeen onderscheid tussen er. verschijnende cellen moeilijk maakte

preparaten niet te onderscheiden hoeveel cellen met elkaar verbonden waren, de dikte van de cellen was hiervoor te groot tenopzichte van de koepdikte, doch bij het maken van dikkere koepes vanaf 20 μ zou de duidelijkheid van het preparaat te sterk achteruit gaan. Er werd daarom overgegaan op het maken van squash-preparaten.

SQUASHES.

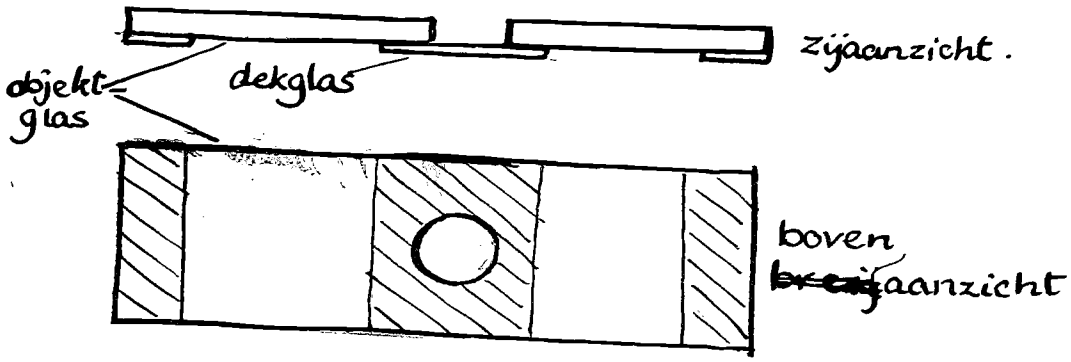
De opzet van het maken van deze squashes was de mijt, die wij bij voorkeur op haar zij leggen, zó uit te drukken dat het ovarium in zijn geheel uit het abdomen van de mijt komt zonder dat de onderdelen hun onderling verband verliezen en zonder dat de cellen verschrompelen of stuk gaan. Eerst werd dit gedaan nadat de mijten gefixeerd waren in alkohol 70%. Dit verharden van het materiaal leek echter een belemmering voor het gaaf uitdrukken van het ovarium. De mijten werden nu gesquashed in een fisiologiese zoutoplossing (NaCl 0,6%). Na het uitdrukken van het ovarium werd de NaCl oplossing afgezogen en vervangen door een orseïneoplossing, die als kleuringsmiddel & fixatie middel diende. Het uitdrukken geschiedde onder ~~het binokulair~~ de stereomikroskoop omdat daar ~~veel~~ meer ruimte was om te manipuleren. dan bij het gewone mikr. De orseïnekleuring had enige tijd nodig om in te werken, 5 - 30 min. doch diende dan vervangen te worden door azijnzuur 45% (het middel waarin de kleurstof opgelost was), aangezien het preparaat te donker gekleurd zou worden.

Het zonder meer uitdrukken van een vrij liggende mijt leverde nogal wat bezwaren op. Ten eerste was het moeilijk de mijt op haar zij te leggen, de beesten rolden door hun

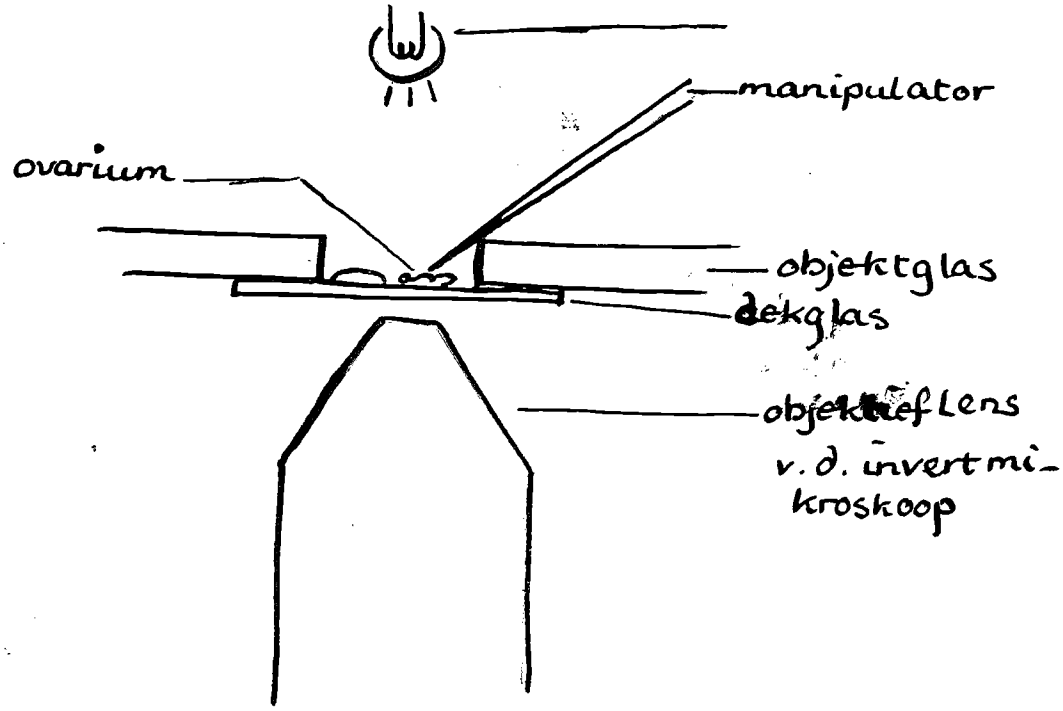
bolle zijkanten meestal op de buik of de rug. Ten tweede kwam bij het uitdrukken van het ovarium ook de darminhoud mee naar buiten, hierdoor was van de stuktuur van het ovarium niets te onderscheiden. Er werd getracht met behulp van filtreerpapier de darminhoud af te zuigen, doch er bleef dan nog veel op het ovarium liggen en de kans was groot dat het ovarium zelf hierbij beschadigd werd.

Er werd nu gepoogd het ovarium los te maken van de mijt en het over te brengen naar een orseïnedruppel, doch dit had helaas tot gevolg dat het ovarium steeds zwaar beschadigd werd. Ook werd gebruik gemaakt van objektglazen met een ingeslepen uitholling. Dit had als voordeel dat de mijt op het diepste punt bleef liggen, zodat bewerkingen eraan iets beter uit te voeren waren; een nadeel bleek echter dat de mijten vaak tegen het erop gelegde dekglas aanplakten en droog kwwamen te liggen. Dit dekglas was nodig, daar de kans bestond dat het mikroskoop door de zure dampen van de nogal grote hoeveelheid orseïne beschadigd werd.

Een metode om de verontreinigende darminhoud te verwijderen welke in Amsterdam toegepast werd werd vervolgens geprobeerd. De mijt werd hierbij op de rug vastgeplakt op de rand van een stukje plakband of met vaseline; zó, dat het abdomen vrij lag. Bij het abdomen werd een druppel water gelegd, hierin vloeide de inhoud van het spijsverteringsmechanisme, eventueel met behulp van uitdrukken die met filtreerpapier afgezogen kon worden. Vervolgens werd het ovarium uitgedrukt en gekleurd. Doordat de mijt hierbij op de rug lag en bovendien op enige afstand boven het glas, traden veel beschadigingen van het ovarium op. Meestal kwam het ova-



OBJEKTGLAS MET INGEBOORD GAT



rium als een onontwarbaar klontje naar buiten. Het was bovendien erg moeilijk om te voorkomen dat het ovarium in kontakt kwam met het plakband of de vaseline, dit had voor het intakt blijven van het ovarium desastreuze gevolgen. Deze metode bleek wel gekompliceerder dan de voorgaanden, doch leverde zeker geen zichtbaar betere resultaten op. Van deze metode werd in het vervolg dan ook weer afgezien.

Om aan het geprepareerde ovarium tijdens het bekijken onder het mikroskoop beter te kunnen manipuleren werd gebruik gemaakt van een geïnverteerde mikroskoop. Bij dit apparaat wordt het preparaat niet onder het objektief gelegd, doch erbovenop; het objektief is dus naar boven gericht. Er werd bij dit mikroskoop gebruik gemaakt van objektglazen waarin een rond gat geslepen was. Aan de onderkant werd dit gat afgesloten met een dekglas, hierdoor werd de afstand van het objektief tot het preparaat niet groter dan bij een normaal mikroskoop het geval is. Aan de beide uiteinden werden ook stukjes objektglas tegen de onderkant van het objektglas geplakt, hierdoor bleef het geheel stabiel liggen. (Zie fig.). Aan de bovenkant is nu ruimte om te manipuleren aan het preparaat.
Bij dit mikroskoop was het tevens mogelijk om met fasekontrast te kijken.

De mijt werd onder het binokulair uitgedrukt. De darminhoud die tegelijk met het ovarium naar buiten komt werdt met een filtreerpapiertje weggezogen. Doordat de mijt hier in een soort kamertje in het objektglas ligt is de kans veel kleiner dat het ovarium meeweggezogen of beschadigd wordt. Om het afzuigen zo veilig mogelijk te doen verlopen

werd bij het afzuigen het filtreerpapier tegen de zijwand, iets boven de bodem van het kamertje gehouden. Er bestaat hierbij het risiko dat het ovarium naar de zijwanden getrokken wordt, waar het niet meer goed te bekijken is; doch door voorzichtig af te zuigen is dit meestal te voorkomen. Als kleuring werd weer orseïne gebruikt, die na verloop van tijd vervangen werd door azijnzuur, of door glycerine, dit laatste om uitdroging te voorkomen. Het manipuleren wordt echter door de stroperigheid van de glycerine bemoeilijkt. Het preparaat werd op het geïnverteerde mikroskoop gelegd, waar het ovarium verder uitelkaar geplozen werd.

Doordat hier op zeer subtiele wijze gemanipuleerd moest worden werd het probleem van een goed hanteerbare dunne naald urgent. De naalden die fijn genoeg waren voor dit werk waren meestal niet stevig genoeg. O.a. werd er gebruik gemaakt van wolfraamdraad. Dit kan men dun laten uitlopen door de punt van het draad steeds in verbit natriumnitriet te dompelen. De punt wordt hierdoor geëtst, en uiteraard zo dat het gedeelte dat het langst in de vloeistof blijft (de top) het dunst wordt. We krijgen zo soms mooi spits toelopende naalden. Het gebeurde ook vaak dat de punt plat uitliep, of dat er stukken afbrokkelden. Een andere moeilijkheid was dat de draden zeer slap waren en daardoor moeilijk te hanteren. Op het zoölogies laboratorium werden deze draden door J. v. d. Pers aan een koperen staaf gelast. Dit gaf voldoende stevigheid om te manipeleren, hetgeen door het insmelten in glas van de wolfraamdraad niet bereikt werd. Tevens betrokken wij van dezelfde persoon als super-dunne naalden zilverelektroden, die in verband met het elektrofisiologies praktikum vervaardigd werden.

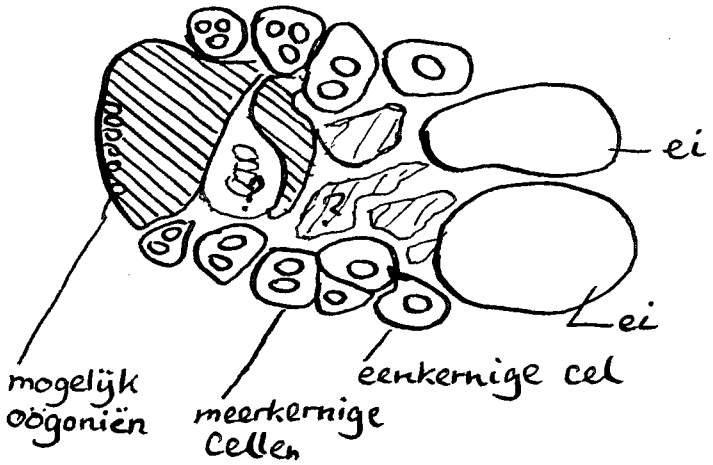


Fig 1. ? geeft volmaakt onherkenbaar weefsel aan

ovarium.

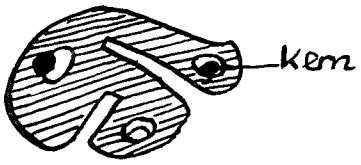


Fig 2.
meerkernige
cel met spleten

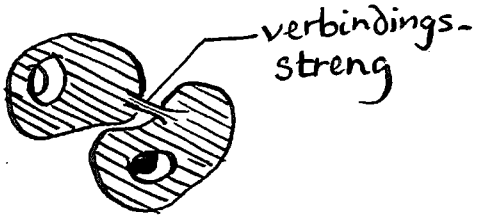


Fig. 3.
eenkernige cellen
met verbindingsstreng

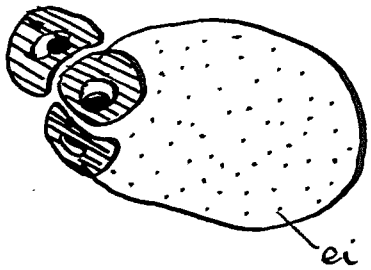


Fig 4
eenkernige cellen
liggen op het ei
(kan een kwestie van
oriëntatie v.d. koep zijn).

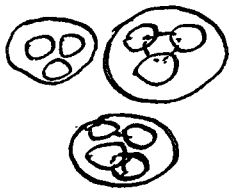


Fig 5
meerkernige cellen
in squash preparaat

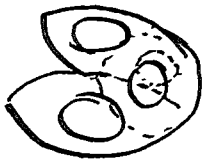


Fig 6.
meerkernige cel
met spleten in
squash preparaat.

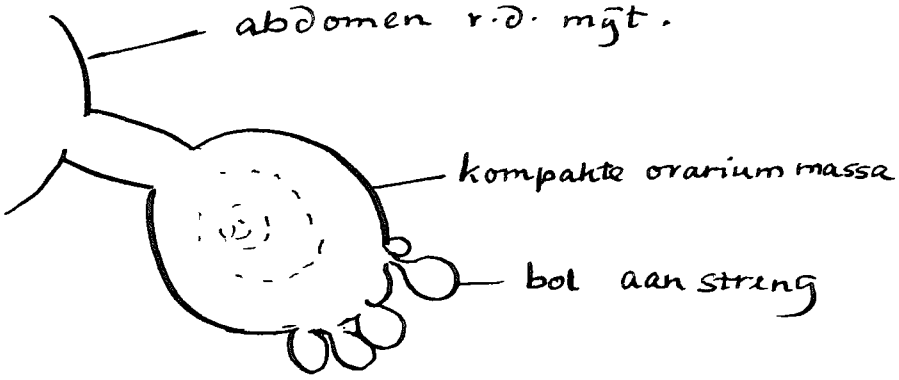


Fig 7.

Uitgedrukt ovarium, met bollen die aanstrengen aan de ovariummassa bevestigd schijnen

De zilverelektrode werd gemaakt doordat een zilverdraad van 20 μ dikte aan een kant , onder uitrekking in een glaskapillair werd vastgesmolten, zo,dat het uiteinde van de zilverdraad met een dun laagje glas was bedekt, rondom, maar niet op de punt. De zilverelektroden bleken in de praktijk in deze vorm niet te voldoen. Als grootste bezwaar gold dat het niet vastgesmolten gedeelte van het kapillair, wat wij als handvat gebruikten, te kort was om goed houvast eraan te hebben. Misschien was ook de dikte van de draad voor ons doel te gering, of was de punt van de draad te lang uitgerekt. Dit zijn echter allen techniese kwesties die te verhelpen zijn. Het principe van een onbreekbare, doch buigzame metaaldraad die met glas verstevigd wordt lijkt ons gunstig voor het met de hand bewerken van mikroskopiese ovariumpreparaten.

RESULTATEN.

Bij het adultus wijfje van Tetranichus urticae ziet men in het ovarium de opeenvolgende stadia, bestaande uit: kleine cellen die vermoedelijk oögoniën zijn, cellen met meerdere kernen & eenkernige cellen die soms met elkaar verbonden zijn, tenslotte, het dichtst bij de abdominale ovarium uitgang een of meer (nagenoeg) rijpe eicyten (fig 1). In sommige koeps is te zien dat de cellen die meer kernen hebben (ten hoogste 3 kernen) soms spleten vertonen (fig 2). Vermoedelijk zijn deze cellen in een later stadium geworden tot de eenkernige cellen die nu en dan onderling plasma(?)-verbindingen hebben. (fig 3). Voor deze veronderstelling is echter geen bewijs gevonden.

Op het rijpe (of bijna rijpe) ei liggen soms een of meer (2) van de eenkernige cellen (fig 4), er is niet een verbinding tussen deze cellen en het ei gevonden.

Weefsel dat wijst in de richting van follikelcellen is niet gevonden.

Omdat met de koeps geen ruimtelijk beeld te krijgen was, door techniese moeilijkheden bestond er geen reden om aan te nemen dat de eenheid van drie aanelkaar verbonden cellen de grootst mogelijke was, noch dat de twee-of driekernige cellen nooit meer dan drie kernen konden bezitten.

Een ruimtelijk beeld, zij het op veel kleinere schaal, was wel te verkrijgen met squashpreparaten. Hieraan was dikwijls te zien dat de meerkernige cellen vier kernen bezaten (fig 5). In deze vierkernige cellen waren soms grote insnijdingen te zien (fig 6). De meerkernige cellen waren aanmerkelijk groter dan de eenkernige die ongeveer hetzelfde uiterlijk vertoonden, het leek erop dat de afme-

tingen van zo'n eenkernige cel 1/4 van de afmetingen van de vierkernige cel bedroegen. Verbindingen van duidelijke strengen tussen de eenkernige cellen zijn niet waargenomen. Wel werd eenmaal bij een ongekleurd ovarium een aantal bollen die met strengen aan de grote ovariummassa vastzaten waargenomen, van hun struktuur was echter niets te zien (fig 7). Bij het afzuigen van de fisiologiese zoutoplossing en toediening van orseïne werd deze struktuur helaas vernietigd.

Er is uiteindelijk alleen maar te zeggen dat in het ovarium van de volwassen mijt vierkernige (of: minstens-vierkernige)cellen voorkomen, die zich vermoedelijk splitsen in vier eenkernige cellen, die ongeveer een kwart maal zo groot zijn als de vierkernige cellen. Of deze eenkernige cellen met plasmastrengen aan elkaar verbonden zijn is in de squashes niet waargenomen. Plasmaverbindingen tussen eenkernigecellen zijn wel waargenomen in mikrotoompreparaten, door de eenmaligheid en dunheid van de koep is echter weinig over de dikte van deze verbingszônes te zeggen, [redacted].

LITTERATUUR.

1 ANDERSON, D. T. & LYFORD, G. C. Oögenesis in Dacus tryoni (Frogg.) (Diptera Trypitidae) Reprint. from australian J. of zoöl. 1965, 13, p 423-435

2 BIER, KARLHEINZ Die Kern-Plasmarelation & das Riesenwachstum der Eizellen. Leipzig 1964. Verhandlungen der Deutschen zoöl. gesellsch. Juni 1963, münchen.

3 BIER, KARLHEINZ Oögene, das Wachstum von Riesenzellen. Die Naturwissenschaften, 8, p 189-195. 1967.

4 CROWDEN DONALD, R. Cytochemical studies on cytoplasmic, RNA associated basig proteïns in oöcytes, somatic cells & ribosomes. Histochemie, 6, p 226-242, 1966

5 CZOLOWSKA, RENATA Observations on the origin of the 'germinal cytoplasma' in Xenopus laevis. J. Embryol. exp. Morph. , 22, p 229-251, 1969.

6 DAVENPORT, R. & JANICE C. A cytochemical study of cytoplasmic basic proteïns in echinoderm oögenesis. Exper. cell research, 42, p 429-437, 1966

7 DUMONT, JAMES N. & ANDERSON, EVERETT Vitellogenese in the Horseshoe Crab, Limulus polyphemus. J. Microscopie, 6, p 791-806, 1967.

8 FICQ, A. Nucleoplasmic relations in the oöcyte. Revue de la faculté des sciences de l' université d' Istanbul. 1964.

9 FOLLETT, B. K. NICHOLS, T. J. & REDSHAW, M. R. The viteelogenetic response in the south african Clawed Toad (Xenopus laevis). Ann. Med. Exp. Fenn, 44, p 120-124, 1966.

10 HALKA, OLLI & HEINONEN, LIISA Radioautographic studies on the gonads of Acheta domesticus (L.). J. of Cell. Phys. suppl. to 72, p 91-101, 1968.

11 HIGHAM, K. C. Insect reproduction. Symposia of the royal entomological society of London, no. 2. London 1964, p 13-25.

12 KING,R.C.& KOCH,ELIZABETH A. Studies on the ovarian follicle cells of Drosophila 1964. N.W. univ. Evanston Illinois U.S.A. p 297-320.

13 KING,R.C.& AGGARWAL,S.K. Oögenesis in Hyalophora cecropia. Growth 29, p 17-83, 1965

14 MATUSZOWSKY,BOHDAN Regulation of Growth of Nurse Nucleï in in the Development of Egg Follicles in Cecydomiïdae (Diptera). Chromosoma(Berl), 25, p429-469,1968.

15 ORLANDO,ENZO Studio Autroradiografico sull' Attivita delle Celluli Nutrici negli Affidi. ~~Estratto da~~ Caryologia, 20, p 217-227, 1967.

17 RIBBERT,DIETRICH & BIER,KARLHEINZ Multiple Nucleoli & Enhanced Nucleolar Activity in the Nurse Cells of the Insect Ovary. Chrom.(Berl), 27, p178-197, 1969.

18 STEINERT,G.& URBANI,E. Communications intercellulaires dans les ovarioles de Oysticus marginalis L. J. Embryol. exp. Morph. 22, p45-54, 1969.

16 RAVEN,CH.P. Oögenesis, the formation of the egg cells. Pure 7 applied biology

19 TELFER,WILLIAM H. The Mechanism & Control of Yolk Formation. Annual review of entomology, 72, p73-89, 1965.

20 WALLACE,R.A.& DUMONT,J.N. The induced Synthesis & Transport of Yolk ~~Plaxelxxx~~ Proteïns & their Accumulation by the Oöcyt in Xenopus laevis. J. of Cell Physiol., 72, p73-89, 1968.

21 GASSER,R. Zur Kenntnis der gemeinen Spinmilbe, Tetranichus urticae Koch. Mitteilungen der Sweizerischen Entomologischen Gesellschaft. 24, no.3, p 216-262, 1951.