

D55g

B L A U W W I E R E N

A. Trox

doctoraal onderwerp
genetica
augustus 1967-maart 1968

Rijksuniversiteit Groningen
Fysisch Genetisch Centrum
Kand. 10 — Postbus 14
9730 AA HAREN

B L A U W W I E R E N

Een onderzoek naar het gedrag van het genetisch materiaal van enkele Cyanophyceen tijdens de celdeling.

Inhoudsoverzicht.

	blz.
Inhoudsoverzicht.	2
Inleiding en probleemstelling.	3
Systematiek van de Cyanophyta.	4
Bouw van de Cyanophyceencel.	4
Overzicht van de literatuur over het "blauwwierenprobleem"	7
Materiaal	14
Waarnemingen met het fasecontrast- microscop aan levend materiaal:	
a. Werkwijze	17
b. Waarnemingen	19
Waarnemingen aan gekleurde preparaten:	
a. Werkwijze bij kleuring met Feulgen's reagens en Giemsa	22
b. Waarnemingen	24
c. Andere fixaties en kleuringen	27
Discussie	28
Literatuur	31

Inleiding en probleemstelling.

De blauwwieren zijn een merkwaardige groep organismen, die over de gehele wereld verspreid zijn. Een klein gedeelte van de soorten komt in mariene gebieden voor en dan meestal in de getijdenzone. De zoetwatersoorten hebben een grote variatie in habitat, als extreem voorbeeld is het voorkomen van blauwwieren in hete bronnen (tot 85° C) bekend.

De blauwwieren worden ingedeeld in het phylum Cyanophyta. Er is één klasse, die van de Cyanophyceae (ook wel Myxophyceae of Schizophyceae), waarin ongeveer 150 genera met \pm 1500 soorten beschreven zijn.

De blauwwieren onderscheiden zich van andere algen en alle hogere planten, doordat het protoplasma niet duidelijk in cytoplasma en kern gedifferentieerd is. Voorts is kenmerkend voor deze groep het afwezig zijn van seksuele voortplanting, zodat de celdeling de enige wijze van reproductie is.

Hoewel er geen duidelijke differentiatie is in kern en cytoplasma, is er in de Cyanophyceencel een gedeelte van het protoplasma, dat zich op dezelfde wijze als het chromatisch materiaal van de kernen van hogere organismen laat kleuren (later in dit verslag zal hierop en op de zienswijzen van de verschillende auteurs nader worden ingegaan). Het is dan ook alleszins aannemelijk dat dit gedeelte van het protoplasma de drager is van de genetische eigenschappen van de Cyanophyceencel.

Na een celdeling moeten de beide dochtercellen, wat hun genetisch materiaal betreft, identiek zijn. De door sommige auteurs waargenomen eenvoudige verdeling door insnoering is te simplistisch, omdat dit geen verklaring geeft voor het feit dat beide dochtercellen dezelfde genetische eigenschappen hebben. Om een juiste verdeling van het genetisch materiaal te verkrijgen, moet voor de deling een verdubbeling ervan optreden, gevolgd door een verdeling van dit materiaal over de twee dochtercellen.

De verdeling van het genetisch materiaal bij de deling van de Cyanophyceencel is door meerdere onderzoekers

bestudeerd. Hun waarnemingen en conclusies variëren sterk en het is nog niet gelukt een antwoord te geven op de vraag hoe de deling van het genetisch materiaal bij de Cyanophyceae verloopt.

Het doel van het onderzoek was, met behulp van enkele cytologische technieken, dichterbij de oplossing van het hierboven beschreven probleem te komen.

Systematiek van de Cyanophyta.

Zoals in de inleiding reeds is opgemerkt, is er één klasse: de Cyanophyceae. Deze klasse wordt onderverdeeld in drie ordes, die onderling verschillen in organisatievorm en reproductiemethoden.

Deze ordes zijn:

- 1) de Chroococcales. De cellen zijn hier solitair of in niet draadvormige kolonies verenigd. Reproductie vindt plaats door celdeling en fragmentatie van kolonies. Er zijn ongeveer 35 genera met \pm 250 soorten, die vrijwel alle in zoet water voorkomen.
- 2) de Chamaesiphonales, waartoe de genera (ongeveer 30 in getal met \pm 150 meest mariene soorten) behoren, die endosporen vormen. De cellen zijn solitair of komen voor in kolonies die tenderen naar een draadvormige organisatie.
- 3) de Oscillatoriales of Hormogonales, waartoe de genera behoren, waarvan de cellen verenigd zijn in trichomen (een trichoom is een enkele rij cellen van een draadvormige kolonie). Reproductie vindt plaats door middel van hormogonia, dat is een stukje trichoom wat afgestoten wordt. Er zijn ongeveer 100 genera met \pm 1000 soorten, die voornamelijk in zoet water voorkomen.

Bouw van de Cyanophyceencel.

De protoplast vertoont, bij lichtmicroscopische waarneming, meer of minder duidelijk een onderscheid in een gekleurde schorslaag: het chromatoplasma en een

zwakker gekleurd binnenste deel: het centroplasma (in oudere literatuur "Zentralkörper" genoemd). Volgens vele auteurs is het chromatoplasma de drager van de assimilatiekleurstoffen en zou het centroplasma kleurloos zijn, maar lijkt het centroplasma gekleurd omdat het omgeven wordt door het chromatoplasma. Het centroplasma bevat DNA, dat netvormig, in korreltjes of in staafjes aangetroffen wordt.

Uit electronenmicroscopisch onderzoek is gebleken dat de scheiding tussen centroplasma en chromatoplasma veel minder duidelijk is dan lichtmicroscopische waarnemingen doen vermoeden. Het centroplasma blijkt te bestaan uit een continue driedimensionaal netwerk van kanalen, die DNA-fibrillen (2 - 5 $m\mu$ in doorsnede) bevatten. Het grootste gedeelte van het centroplasma ligt in het centrum van de cel, maar ook aan de periferie wordt dit materiaal aangetroffen. Ris en Singh (1961) stellen daarom voor de term "centroplasma" te vervangen door "nucleoplasma". De rest van de celinhoud bestaat uit het "chromatoplasma" of wat Ris en Singh, op grond van het volgende, voorstellen "cytoplasmatisch lamellensysteem" te noemen. Onder het lichtmicroscop is het "chromatoplasma" fijnkorrelig. Bij waarneming met het electronenmicroscop blijkt het te zijn opgebouwd uit een lamellensysteem dat een groot gedeelte van het protoplasma uitmaakt. Dit lamellensysteem, dat voor een groot deel perifeer ligt, bevat chlorophyl. Een lamel bestaat uit één continue membraan, die een afgeplatte zak vormt, waarvan de membraan 6 - 7 $m\mu$ en de interlamellaire ruimte 4 - 5 $m\mu$ in doorsnede is. Een dergelijk lamellensysteem vertoont overeenkomsten met de bouw van plastiden van hogere planten.

De interlamellaire ruimten zijn ongeveer 100 $m\mu$ in doorsnede en gewoonlijk gevuld met α -granula. Deze α -granula hebben een diameter van ca. 30 $m\mu$. Ze hebben mogelijk een metabolische functie; een andere mogelijkheid is dat deze granula het reservevoedsel van de cel zijn.

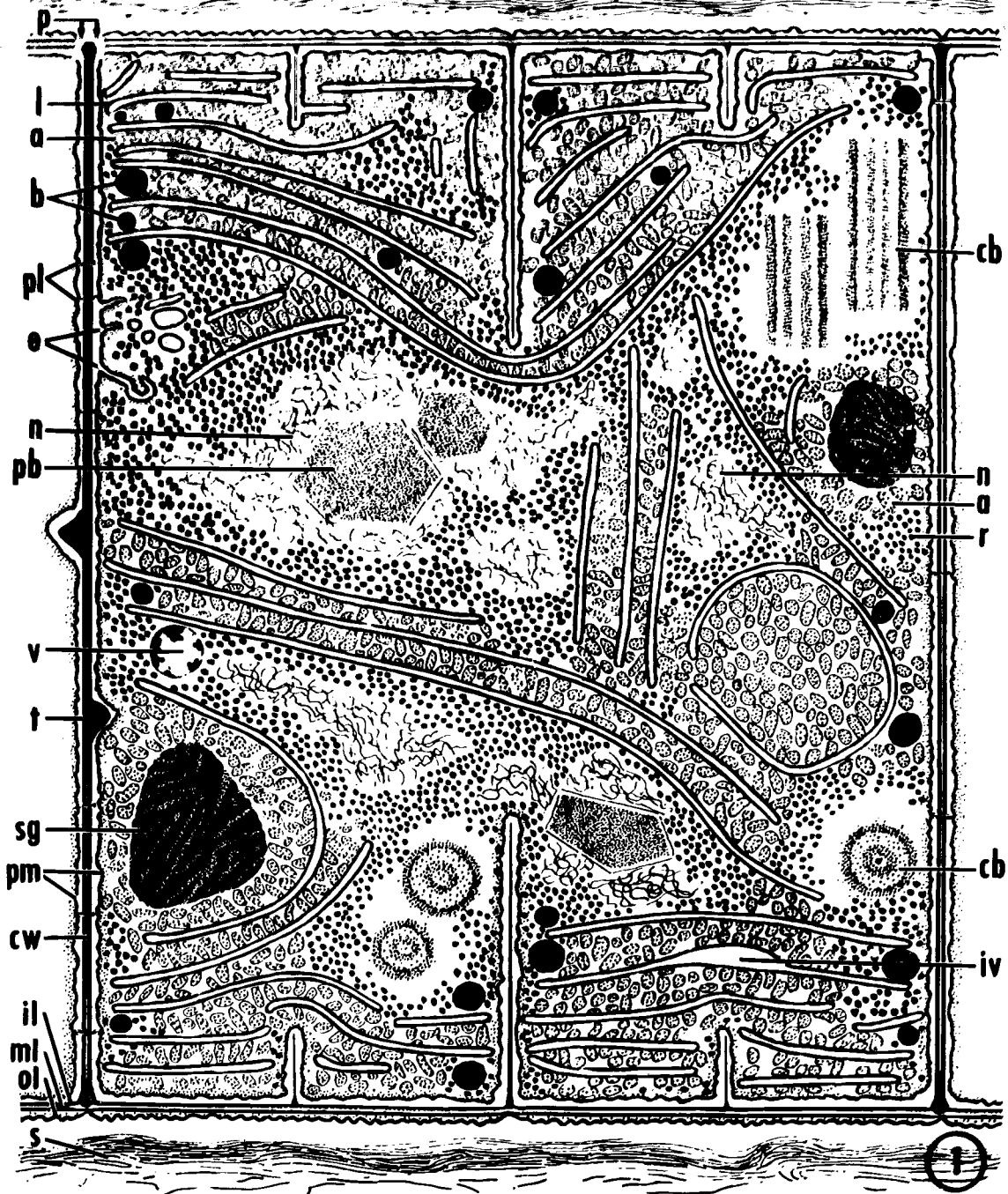


Fig. 1. Diagram of a median section of a cell of *Symploca muscorum*. Code for all Figures: a α granules; b β granules; cb-cylindrical bodies; cw-crosswall; e-elaboration of plasma membrane; il, ml, ol-inner, middle and outer layer, respectively, of inner investment; iv-intralamellar vesicle; l-lamellae; n-nucleoplasm; p-pores; pb-polyhedral bodies; pl-plasmodesms; pm-plasma membrane; r-ribosomes; s-sheath; sg-structured granules; t-local thickening; v-"vacuole-like" inclusions.

Schematische tekening van een mediane doorsnede van *Symploca muscorum*. (Volgens Pankratz en Bowen).

Tussen de lamellen worden, meest bij de dwarswanden, ook nog β -granula, met een nog onbekende functie aangetroffen.

Naast deze interlamellaire granula komen in de cel nog voor:

- a) granula met een diameter tot $0,5 \mu$, met een onregelmatig patroon van dichte en minder dichte plekken. Ze worden dicht bij de dwarswanden aangetroffen en zijn omgeven door α -granula. De grootte en de plaats van deze granula doen vermoeden dat het de cyanophycinekorrels zijn, die met het lichtmicroscop kunnen worden waargenomen. Ze worden door vele auteurs als equivalenten van mitochondrien beschouwd.
- b) veelvlakkige lichaampjes. Lichaampjes met een meer of minder veelhoekige vorm en een diameter van maximaal $0,5 \mu$. Ze zijn altijd in contact met het nucleoplasma. Mogelijk zijn deze lichaampjes dezelfde als de met het lichtmicroscop waarneembare polyfosfaatlichaampjes; in de oudere literatuur metachromatinelichaampjes genoemd, opgebouwd uit "volutine".

Bij de Cyanophyceae komen de volgende pigmenten voor: chlorophyl-a, β -caroteen, flavicine, myxoxanthine, myxoxanthophyl, c-phycoerythrine en c-phycocyanine.

Alle pigmenten zijn niet bij alle soorten aanwezig, terwijl ook per soort, afhankelijk van de levensomstandigheden, verschillen kunnen optreden.

De celwand is opgebouwd uit twee membranen (elk $\pm 7 m\mu$ in doorsnede), waartussen een laag dicht, homogeen materiaal. Tegen de buitenste membraan of hiervan door een kleine ruimte gescheiden, ligt een uit fibrillen opgebouwde schede.

Overzicht van de literatuur over het "blauwwierenprobleem".

De Cyanophyceae hebben al sinds het eind van de vorige eeuw een groot aantal onderzoekers bezig gehouden. Tussen 1880 en 1890 zijn er publicaties verschenen, waarin aanduidingen over het ontbreken of afwezig zijn van een kern te vinden zijn. Deze publicaties hebben

alleen nog historische waarde.

Bütschli (1890, 1896, 1898, 1902) dacht als eerste in de richting van de tegenwoordig als juist beschouwde opvatting, dat de protoplast van de Cyanophyceencel niet gedifferentieerd is in cytoplasma en kern. Hij onderscheidde een perifere schorslaag en een kleurloos "Zentralkörper". De deling van het "Zentralkörper" is volgens Bütschli amitotisch, terwijl de deling en doorsnoering van het "Zentralkörper" niet passief door de zich vormende tussenwand kan gebeuren, maar een onafhankelijk zelfstandig gebeuren moet zijn.

Hegler (1901) is daarentegen van mening dat het centrale deel van de Cyanophyceencel een scherp begrensde kleurloze kern is. Deze "kern" onderscheidt zich van de kern van andere organismen door het ontbreken van nucleolen en een kernmembraan. Bij de deling versmelten volgens Hegler kleine chromatinekorrels tot chromosomen, die zich in overlangse richting, loodrecht op de nieuw te vormen wand delen. Dit delingsproces lijkt zoveel op dat van andere organismen, dat Hegler het centrale deel van de cel een echte kern wil noemen. Ook Kohl (1903) noemt het centrale deel van de cel een kern, met als verschil met de kern van hogere organismen dat een duidelijk kleurbare kernmembraan en nucleolen ontbreken en de vorm afwijkend is. Hij argumenteert zijn opvatting als volgt: Voor de deling neemt de hoeveelheid chromatine toe en wordt er één draad zichtbaar, die in chromosomen uiteenvalt. Deze chromosomen verplaatsen zich in equivalente hoeveelheden naar de beide polen. De chromosomen delen zich volgens Kohl dwars, wat het tegengestelde is van wat Hegler meent waar te nemen. Hij meent een mitose te zien en meent, ondanks de verschillen van het centrale gedeelte van de Cyanophyceencel met de kern van hogere organismen, dit gedeelte toch als een echte kern te moeten beschouwen.

Guilliermond (1906, 1926) onderscheidt:

- a) een schorsachtige zone. Hierin komt het diffuus verdeelde pigment voor, er wordt geen georganiseerde

chromatofoor aangetroffen. Vaak komen er cyanophycinekorrels in voor.

- b) een centraal gedeelte, dat bestaat uit "hyaloplasma" en een chromatisch reticulum. Dit reticulum zou zijn opgebouwd uit een achromatische grondsubstantie, waarop chromatische granula. De draden van het reticulum lijken soms parallel georiënteerd.

Bij de deling verschijnt er een insnoering van het reticulum. Het centrale gedeelte deelt zich volgens Guilliermond als een kern, maar amitotisch. Hij beschouwt het chromatinenetwerk als een kernequivalent.

Haupt (1923) onderscheidt eveneens een gekleurde "cortex" en een kleurloos centraal gedeelte in de Cyanophyceencel. Hij beschouwt het centrale gedeelte niet als een structureel zelfstandig deel, maar als een deel van een continue protoplasma, waarin de pigmenten ontbreken. Deze pigmenten zijn opgelost in de perifere grondsubstantie.

De celdeling is amitotisch, waarbij wel een nauwkeurige verdeling van de centrale massa plaats vindt. Haupt's opvatting omtrent het centrale gedeelte van de Cyanophyceencel luidt als volgt: De kern wordt in de cel van de Cyanophyceae vertegenwoordigd door een substantie, die in verschillende opzichten op chromatine lijkt, maar zonder de organisatie van een kern.

Poljansky en Petruschewky (1929) tonen in het "Zentralkörper" met behulp van Feulgen's reagens organische fosfor aan, die met basische kleurstoffen gekleurd wordt. De vorm verschilt van soort tot soort, meest net- en staafvormig, terwijl ook veranderingen gedurende het leven van de cel waargenomen worden.

De gevonden structuren in het centrale deel van de cel, die gekleurd worden door basische kleurstoffen, zijn volgens Poljansky en Petruschewky identiek of verregaand overeenkomend met het chromatine van een kern. Ze zijn wel van mening dat de door hen bestudeerde Cyanophyceae geen begrensde celkern bezitten, terwijl de deling van het centrale gedeelte van de cel een eenvoudige insnoering zou zijn.

Von Zastrow (1953) beschrijft de vorm van de "Zentral-substanz" na kleuring met acridine oranje als sterk variabel en karakteristiek voor de systematische groepen. Ook is de vorm afhankelijk van de leeftijd van de cellen: wanneer de cellen nog in staat zijn om te delen is de "Zentralsubstanz" een samenhangend complex. Wanneer de cellen ouder worden, verdeelt de "Zentralsubstanz" zich meer en meer tot ze volledig in grana is uiteengevallen. Von Zastrow toonde tevens de aanwezigheid van DNA en RNA in de "Zentralsubstanz" aan.

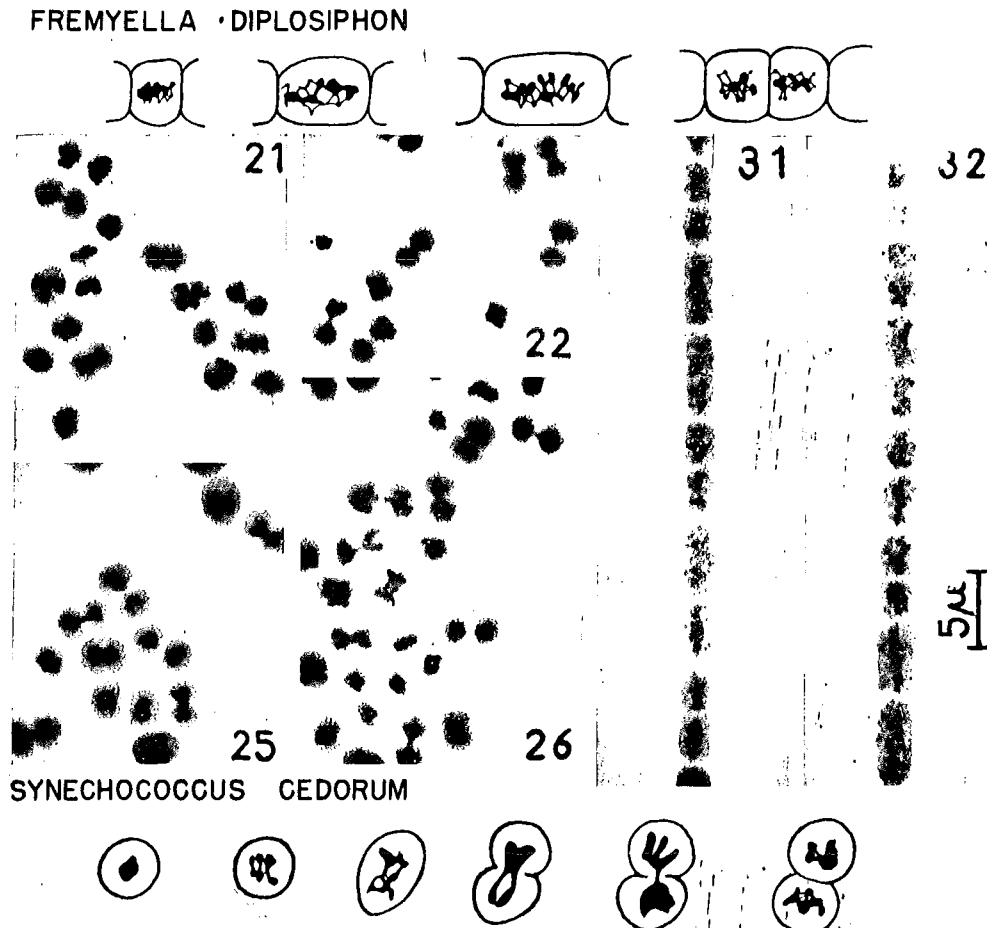
Ook Cassel en Hutchinson (1954) toonden de aanwezigheid van DNA in het centrale gedeelte van de Cyanophyceen-cel aan. Ze onderscheidden bij de Cyanophyceae in de rangschikking van de chromatineelementen 3 typen:

- 1) een losse netachtige structuur
- 2) staafachtige elementen, die in de lengte as van de cel liggen.
- 3) meer gecondenseerde, zeer variabele vormen.

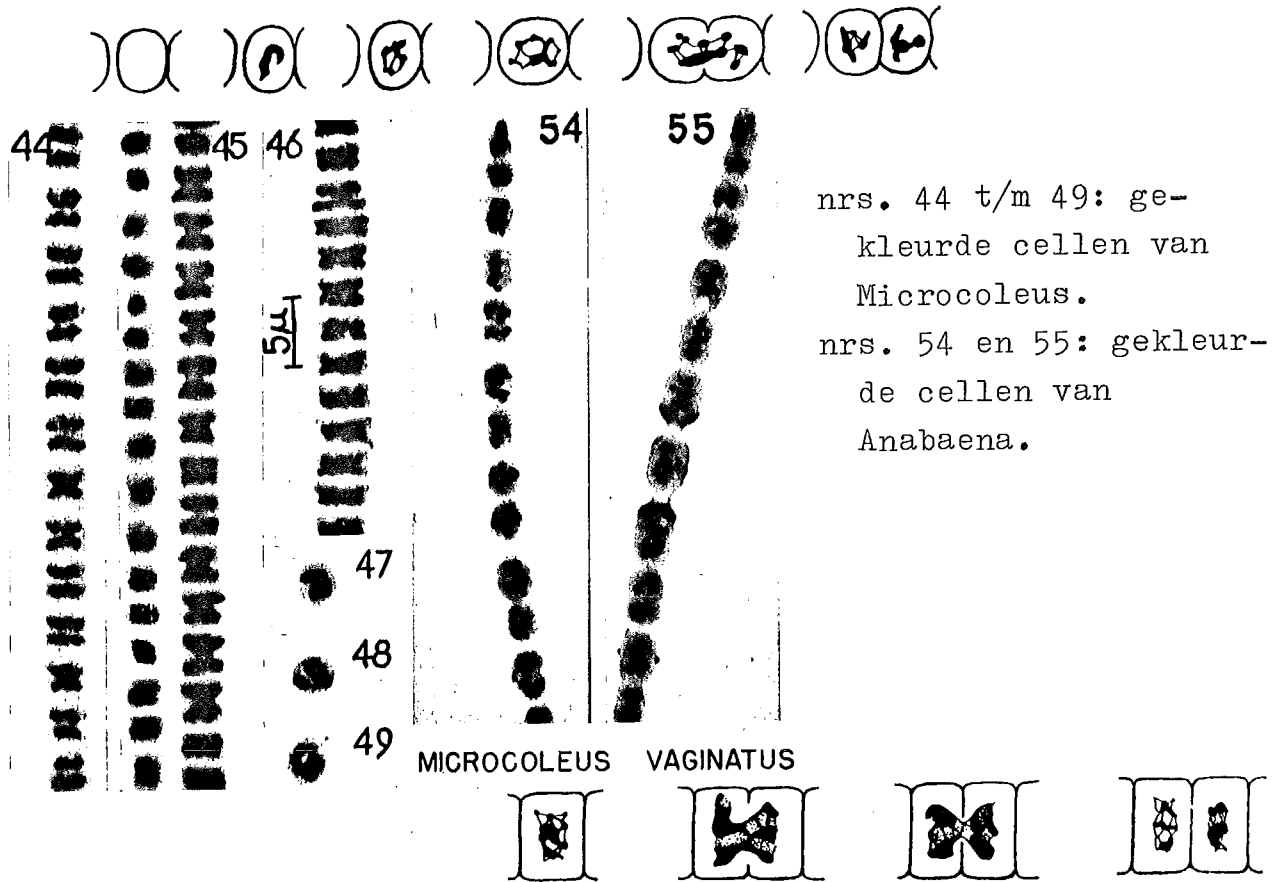
Hieronder enkele fotocopyeën van tekeningen en foto's uit de publicatie van Cassel en Hutchinson.

nrs. 21, 22, 25 en 26: gekleurde cellen van *Synechococcus*.

nrs. 31 en 32: gekleurde cellen van *Fremyella*.



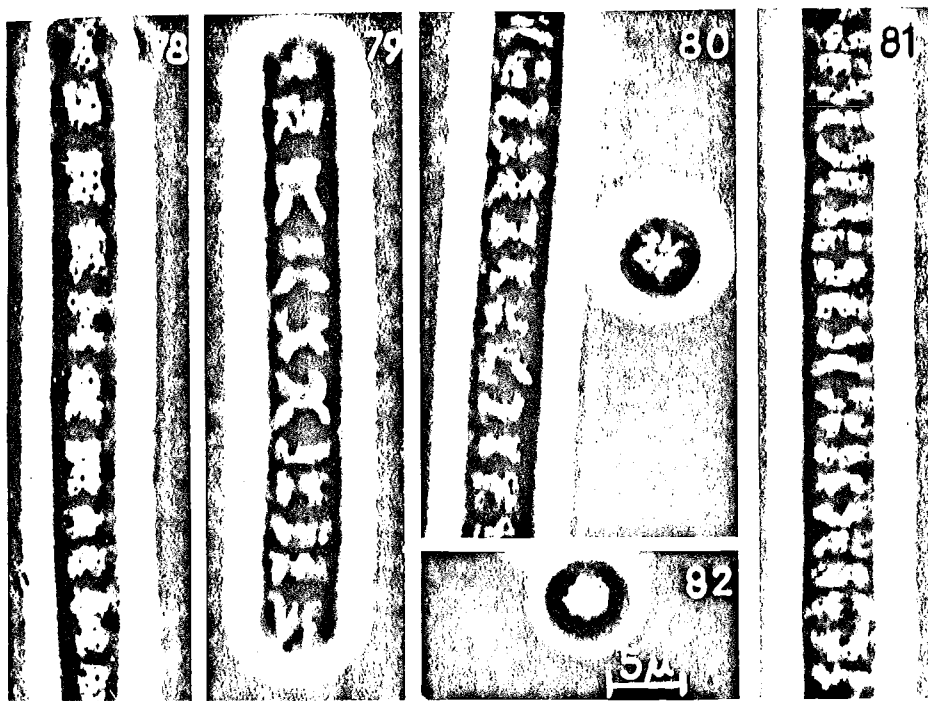
ANABAENA CYLINDRICA



nrs. 44 t/m 49: gekleurde cellen van Microcoleus.
 nrs. 54 en 55: gekleurde cellen van Anabaena.

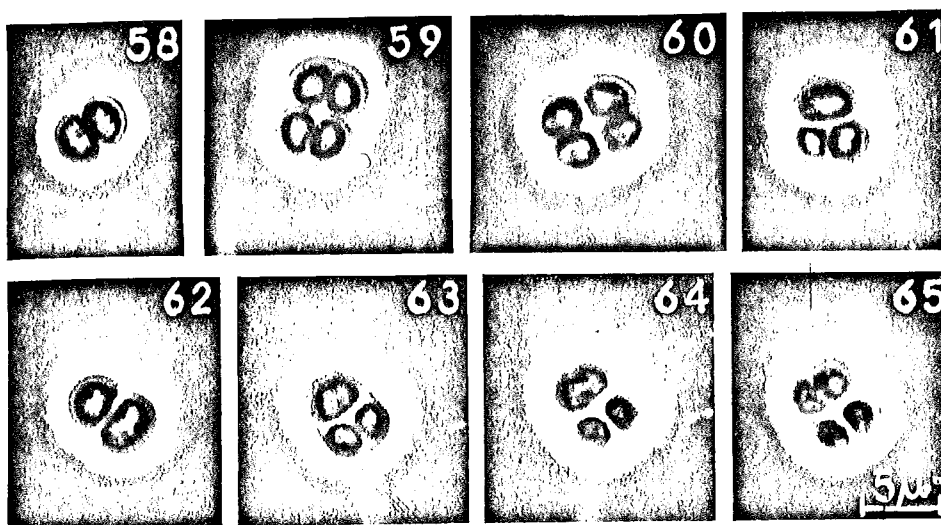
Naast de waarnemingen aan gekleurde preparaten werden ook levende cellen bestudeerd met behulp van fasecontrastmicroscopie. In de cellen werden plekken gezien die overeenstemden met het chromatinemateriaal van gekleurde cellen, alleen waren er geen details te zien. Ook hiervan enkele foto's:

nrs. 78 t/m 82: levende cellen van Microcoleus.



Het volgen van levende cellen leverde moeilijkheden op, omdat de organismen of voortdurend in beweging waren, of zich niet ontwikkelden onder omstandigheden, die gunstig waren voor waarneming met het phasecontrast-microscop. Van waarnemingen gedurende enige dagen achtereen aan enige cellen van *Chroococcus*, werden enkele foto's gepubliceerd.

nrs. 58 t/m 65: levende cellen van *Chroococcus*, nrs. 63 t/m 65: opeenvolgende stadia van de celdeling.



Over het delingsproces bij de Cyanophyceae kunnen Cassel en Hutchinson niets anders zeggen, dan dat er geen mitose plaats vindt en dat de rol van de centripetaal ingroeiende wand niet duidelijk is.

In 1958 verscheen een artikel van Fuhs, die een uitvoerig onderzoek gedaan heeft naar de bouw en het gedrag van de kernequivalente structuren bij *Oscillatoria amoena* (Kütz) Gomont. Hij onderscheidt in de cel van *Oscillatoria amoena*:

- 1) een tweelagige membraan.
- 2) een lichtoptisch homogeen, pigment en RNA bevattend, cytoplasma.
- 3) Feulgen-positieve kernequivalente structuren.
- 4) polyfosfaatkorrels (= vultine of metachromatische grana).
- 5) cyanophycinekorrels.
- 6) vacuolen.

De resultaten van het onderzoek waren sterk afhankelijk van de gebruikte methoden.

Levende objecten: het kernequivalent wordt waargenomen als een minder sterk gekleurd centraal deel met structuren in de lengteas van de draad. De waarnemingen worden gehinderd door polyfosfaatkorrels. Waarnemingen met het fasecontrastmicroscop komen overeen met de waarnemingen van Cassel en Hutchinson.

Kleuring met Feulgen's reagens, zonder voorafgaande hydrolyse veroorzaakt een intensieve roodkleuring van polyfosfaten. Het chromatineapparaat blijkt uit lineaire elementen, die in de lengterichting van de cel liggen, te zijn opgebouwd.

Hydrolyse met HCl elimineert het plasmatisch RNA en breekt de polyfosfaten af. Kleuring na hydrolyse met Giemsa geeft een beeld dat overeenkomt met de waarnemingen van Cassel en Hutchinson. Het contrast is met deze kleuring groter dan met de Feulgen-reactie.

Bij behandeling van de cellen met ribonuclease en pepsine worden na kleuring met Giemsa, eveneens weer staafjes zichtbaar.

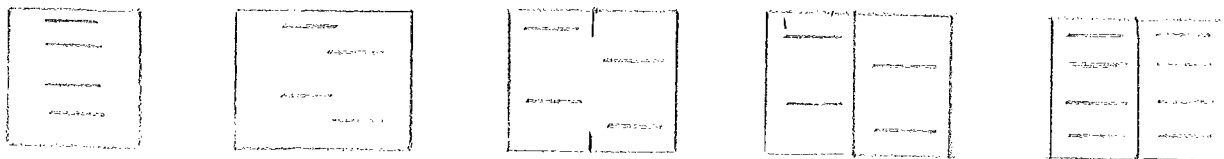
Op grond van deze waarnemingen trekt Fuhs de conclusie dat het chromatineapparaat bij *Oscillatoria amoena* is opgebouwd uit lineaire structuren, die vrij in het plasma liggen en waarvan de lengte constant is.

Het aantal chromatine elementen varieert per cel, waarbij één element per cel voldoende is. Elk element moet dan een volledig genoom dragen. Bij *Oscillatoria amoena* komen in normale cellen zes tot acht elementen voor, deze cellen zijn dus polyploïd, wat een verklaring kan zijn voor de hoge resistentie van blauwwiercellen tegen ultraviolette straling. Een chromatine element kan dus functioneel als een chromosoom beschouwd worden.

Over het verloop van de deling heeft Fuhs de volgende hypothese opgesteld: De chromatine elementen ontstaan uit elkaar door overlangse deling. Tijdens de celdeling schuiven de elementen langs elkaar (in de lengterichting van de cel!) en verdelen zich zo over de dochtercellen.

De verdubbeling van het aantal chromatine elementen treedt direkt na de deling op.

Schematisch voorgesteld:



deling

Onderzoek met het electronenmicroscop door Hopwood en Glauert (1960), Ris en Singh (1961) en Pankratz en Bowen (1963) geeft een duidelijker beeld van de bouw van een blauwwiercel. Dit is op pag. 5 e.v. beschreven. Hierbij valt nog op te merken, dat Hopwood en Glauert overeenkomst vinden tussen de vormen van het nucleoplasma bij electronenmicroscopische waarneming en de vormen die Cassel en Hutchinson vonden. Zij achten het onwaarschijnlijk dat er exacte vormen en eenheden in het genetisch materiaal te vinden zijn. Dit dus in tegenstelling tot wat Fuhs beschrijft.

Pankratz en Bowen kunnen bij hun onderzoek met het electronenmicroscop geen correlatie vinden tussen de oriëntatie van het nucleoplasma en de vorming van dwarswanden.

Materiaal.

Voor het onderzoek waren de volgende Cyanophyceensoorten, afkomstig uit de algotheek van Göttingen, beschikbaar.

1. Gloeothrychia echinulata (J.E.) Smith P.Richter.
catalogus nr. LB 1432-1
2. Merismopedia glauca (Ehrenb.) Näg.
catalogus nr. LB 1448-1
3. Anabaena ambigua Rao, CB, of Wollea ambigua
catalogus nr. LB 1403-7
4. Fischerella muscicola (Thuret) Gom.
catalogus nr. LB 1427-1
5. Calothrix membranacea Schmidle.
catalogus nr. LB 1410-1

6. Plectonema boryanum
catalogus nr. B 1463-1a
7. Phormidium foveolanum (Mont.) Gomont.
catalogus nr. B 1462-1
8. Anabaena variabilis Kützing ex. Born et Flah.
catalogus nr. LB 1403-4a
9. Oscillatoria tenuis Ag. ex. Gomont.
catalogus nr. B 1459-4
10. Nostoc muscorum Ag. ex. Born et Flah.
catalogus nr. B 1453-12a

De cultures waren niet bacterievrij, maar dit had geen nadelige invloed op de cultures en was niet hinderlijk bij de proeven.

De nrs. 1 t/m 4 werden gekweekt in reageerbuizen met een voedingsoplossing, de nrs. 5 t/m 10 werden gekweekt in petrischalen, waarin aan de voedingsoplossing agar was toegevoegd. Op elke reageerbuis werd een metalen kapje gezet, dat overmatige verdamping en verontreiniging voorkwam. De petrischalen werden, om snel uitdrogen te voorkomen, in glasdozen geplaatst.

De schalen en buizen werden op ongeveer 0,5 m van een oostvenster geplaatst, waarbij de ochtendzou werd afgeschermd.

De voedingsoplossing was aanvankelijk als volgt samengesteld:

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0,04	g/l
KH_2PO_4	0,01	g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,025	g/l
Na_2CO_3	0,02	g/l
Na_2SiO_3	0,025	g/l
Na-citraat	0,01	g/l
Fe-citraat	0,01	g/l
sporenoplossing	10	ml/l

Later werd overgeschakeld op een eenvoudiger samengestelde voedingsoplossing, waarvan de samenstelling was:

KNO_3	0,2	g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0,2	g/l

MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,01	g/l
CaSO ₄	20 ml	van een verzadigde oplossing
sporenoplossing	10	ml/l

De sporenoplossing was als volgt samengesteld:

EDTA	0,2	g/l
FeSO ₄ .7 H ₂ O	0,1	g/l
ZnSO ₄ .7 H ₂ O	0,01	g/l
MnSO ₄ .7 H ₂ O	0,002	g/l
CuSO ₄ .5 H ₂ O	0,000005	g/l
H ₃ BO ₃	0,01	g/l
Co(NO ₃) ₂	0,001	g/l
Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O	0,001	g/l

Het voordeel van de tweede voedingsoplossing was, naast de eenvoudiger samenstelling, dat alle gebruikte voedingszouten gemakkelijk oplostten, terwijl bij de eerste oplossing de citraten zeer moeilijk in oplossing gingen. Voor de blauwwieren had het wisselen van voedingsoplossing geen zichtbare invloed op de groei.

Voor het gebruik in de petrischalen werd 2% agar aan de voedingsoplossing toegevoegd. Vóór het gebruik werden de voedingsoplossingen gesteriliseerd.

De watercultures werden overgeënt door met een pipet enkele druppels van een culture over te brengen in een reageerbuis met voedingsoplossing. De cultures in de petrischalen werden overgeënt door met een naald met een verbrede punt een stukje van een bestaande culture over te brengen op een agar-voedingsbodem.

Hoewel de cultures niet bacterievrij waren, werd om infectie met schimmels te voorkomen, steriel gewerkt. De blauwwieren groeiden onder de beschreven omstandigheden zeer verschillend. *Anabaena ambigua*, *Anabaena variabilis* en *Calothrix membranacea* groeiden duidelijk sneller dan de andere soorten.

Na \pm 6 weken werden de wieren telkens overgeënt, waarbij de oude cultures nog 6 weken bewaard werden; dit om voldoende materiaal te houden om mee te werken en als reserve voor het geval er iets mis zou gaan met de nieuwe cultures.

Grote vertraging leverde een mijtensoor, die plotseling in alle petrischalen met blauwwiercultures bleek voor te komen en die het blauwwier afgraasde. Door over te enten op nieuwe voedingsbodems en door tijdelijk de cultures naar een andere ruimte te verplaatsen, is het gelukt de infectie weer te verwijderen, maar dit had tot gevolg dat er gedurende enkele weken geen materiaal ter beschikking was voor proeven. De blauwwieren hadden aanvankelijk, waarschijnlijk doordat er uiterst kleine hoeveelheden waren overgeënt, last van overdadige bacteriegroei. Door bestraling met ultraviolet licht werden deze bacteriën voor het grootste gedeelte geëlimineerd. Om een eventuele nieuwe infectie met de mijt te voorkomen, werden de glasdozen, waarin de petrischalen met cultures, geplaatst in een bak met een laagje water.

Waarnemingen met fasecontrastmicroscop aan levend materiaal.

Werkwijze.

Het waarnemen aan levend materiaal heeft het grote voordeel, dat de veranderingen in één bepaalde cel gedurende een bepaald tijdsverloop, waargenomen kunnen worden. Om deze waarnemingen te kunnen doen, moet aan de volgende voorwaarden worden voldaan:

- 1) de culture moet onder zodanige omstandigheden groeien, dat zonder verstoring met het fasecontrastmicroscop kan worden waargenomen.
- 2) de cellen van het wier mogen zich niet verplaatsen, zodat steeds dezelfde cel weer teruggevonden kan worden.

Om aan deze voorwaarden te voldoen, werden op een objectglas met ingeslepen holte een paar druppels voedingsoplossing gebracht. Van een culture in een petrischaal werd een kleine hoeveelheid blauwwier overgebracht in deze voedingsoplossing. Vervolgens werd een dekglasje aangebracht. De blauwwieren waren zo goed zichtbaar

met het microscoop, alleen droogde het preparaat snel uit en dreven de wieren vrij door de voedingsoplossing. Om uitdroging te voorkomen werden de preparaten afgesloten. Hiervoor werden de volgende afsluitmiddelen geprobeerd: euparal, canadabalsem, nagellak, paraffine en vaseline. Bij gebruik van de eerste vier middelen gingen de blauwwieren na korte tijd dood, bij gebruik van nagellak vrijwel direct. Alleen wanneer vaseline gebruikt werd bleven de wieren gedurende ongeveer vier weken in leven.

Om te voorkomen dat de wieren zich vrij door de voedingsoplossing zouden bewegen, werd met een naald een kleine hoeveelheid blauwwier op een dekglasje uitgestreken. Dit dekglasje werd vervolgens in een bakje met voedingsoplossing gelegd en dit geheel (dekglasje + bakje) in een glasdoos geplaatst; dit om veel bacteriën in de voedingsoplossing te voorkomen. De wieren groeiden dan over het dekglasje. Na 4 à 5 dagen werd zo'n dekglasje dan op een objectglas met ingeslepen holte, waarin enkele druppels voedingsoplossing, gelegd. Wanneer de preparaten op deze wijze gemaakt werden bleven de blauwwieren voornamelijk tegen het dekglasje groeien en bleven zo goed waarneembaar met het fasecontrastmicroscoop.

Een preparaat werd dus als volgt gemaakt:

- 1) dekglasje met blauwwier in een voedingsoplossing gedurende 4 à 5 dagen.
- 2) dekglasje op objectglas met ingeslepen holte, waarin voedingsoplossing.
- 3) randen met vaseline afsluiten.

De preparaten werden, evenals de cultures, voor een oostvenster geplaatst.

Deze preparaten werden gemaakt van alle zes blauwwier-soorten, die in petrischalen gekweekt werden. Hiervan vertoonden alleen *Calothrix membranacea* en *Anabaena variabilis* duidelijke groei. Dit komt overeen met de groeisnelheid van de cultures in de petrischalen.

Het insluiten van een kleine luchtbel bleek een gunstige invloed te hebben op de groei, de wieren groeiden dan het best op het grensvlak van lucht en voedingsoplossing.

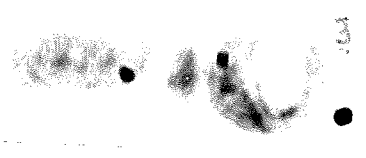
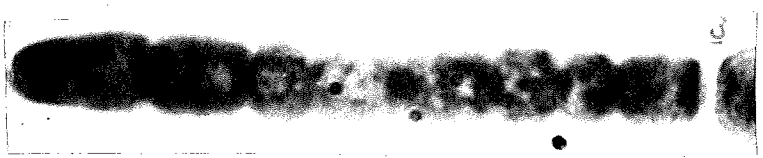
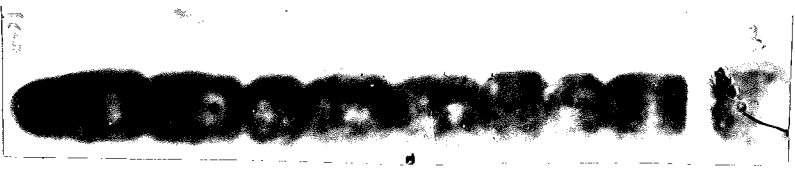
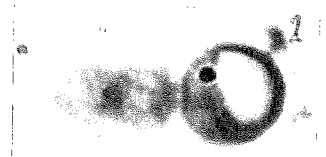
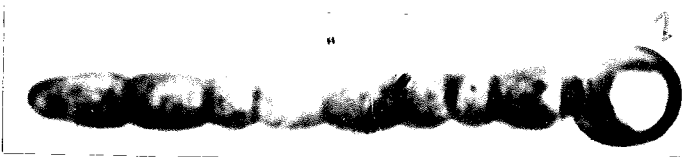
Omdat *Calothrix membranacea* het gemakkelijkst te kweken was, werd deze soort gebruikt.

De preparaten werden bekeken met een Zeisz-Winkel microscoop, dat voorzien was van een fasecontrastinrichting, met objectief 90x. Voor de verlichting werd gebruik gemaakt van een 6 Volts microscooplampje. Voor het maken van foto's was een camera met opzetstuk beschikbaar. Bij gebruik van een Agfa 10 Din zwart-wit negatieffilm was een belichtingstijd van 5 seconden nodig, waarbij het microscooplampje op 8 Volt geschakeld werd. Wanneer er in aangrenzende vertrekken gelopen werd, trilde de tafel waarop het microscoop stond opgesteld, wat erg hinderlijk was bij een zo lange belichtingstijd.

Waarnemingen.

Calothrix membranacea is een draadvormig wier. Onder het lichtmicroscop is er een lichtgroen gekleurd centraal gedeelte en een meer intensief gekleurd perifeer gedeelte. Wanneer het blauwwier met het fasecontrastmicroscop wordt bekeken, wordt er iets meer zichtbaar. In het centrum licht dan een onduidelijk, onregelmatig begrensd, licht gekleurd gedeelte en daar buiten een intensiever gekleurd perifeer gedeelte. Op en om het centrale gedeelte liggen vaak donker gekleurde korrels van verschillende grootte (polyfosfaatkorrels). In het lichtgekleurde centrale gedeelte ligt het nucleoplasma. De vorm van dit centrale gedeelte varieert sterk en is vaak niet duidelijk.

Enkele preparaten, die zoals hierboven beschreven waren gemaakt, werden gedurende enige dagen achtereen bekeken. Van enkele draden werden ook foto's gemaakt, waarvan hieronder een paar series.



serie A.

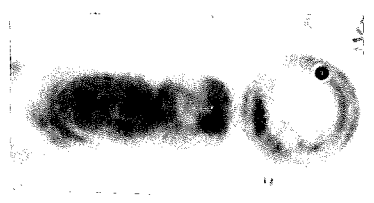
Calothrix membranacea. Levend, fase-contrastmicroscop.

serie A: 2 en 3 resp. 2 en 4 dagen na 1

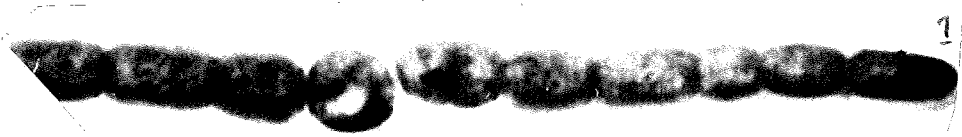
serie B: 2 vijf uren, 3, 4 en 5 resp.

1, 2 en 4 dagen na 1.

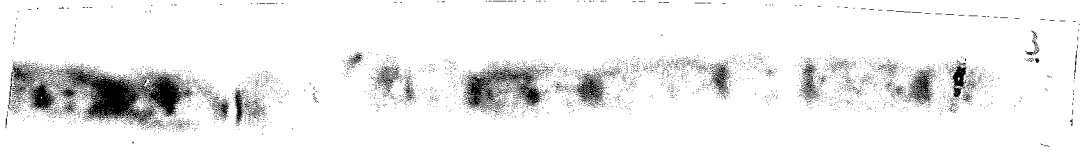
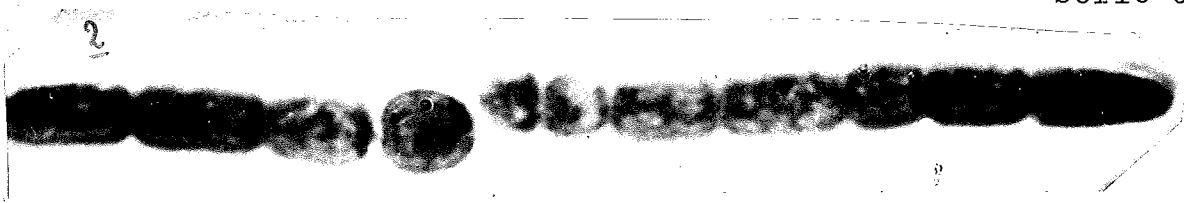
serie C: 2 en 3 resp. 1 en 5 dagen na 1

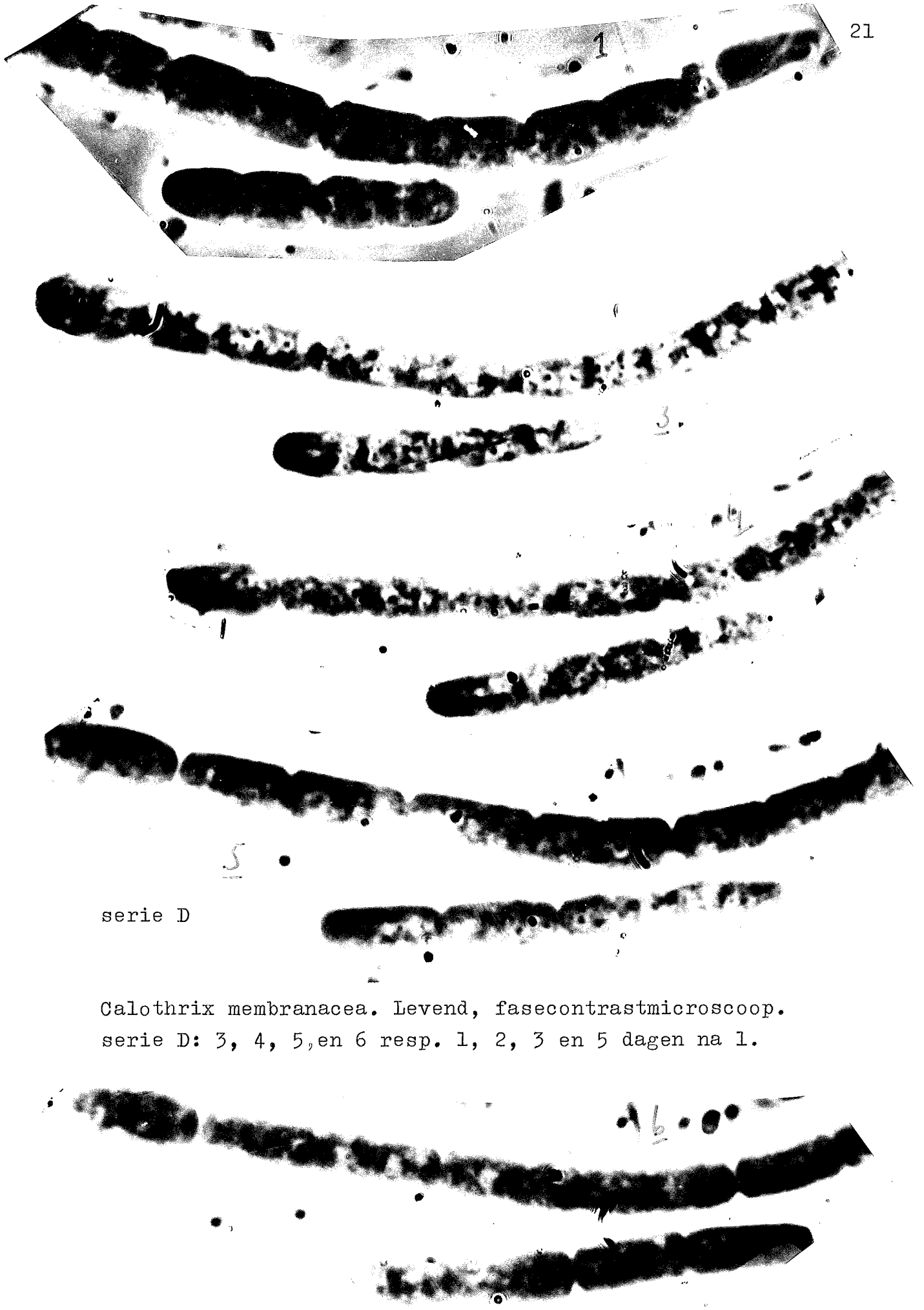


serie B.



serie C.





serie D

Calothrix membranacea. Levend, fasecontrastmicroscop.
serie D: 3, 4, 5, en 6 resp. 1, 2, 3 en 5 dagen na 1.

Door de pigmenten en de polyfosfaatkorrels is de vorm van het nucleoplasma niet nauwkeurig te zien en is het ook niet mogelijk in deze vorm veranderingen waar te nemen, die in verband zouden kunnen staan met een celdeling.

Geprobeerd werd, door de wieren meer licht te geven, de hoeveelheid pigment te laten afnemen. Daartoe werden de preparaten op ongeveer 50 cm van een 40 W TL-buis, die ononderbroken brandde, geplaatst. De wieren gingen hier echter snel dood, zonder dat de hoeveelheid pigment in de cel merkbaar afnam.

Waarnemingen aan gekleurde preparaten.

Omdat het waarnemen aan levende preparaten geen resultaat opleverde, werd geprobeerd of het kleuren van preparaten meer duidelijkheid in het probleem zou brengen.

Werkwijze bij kleuring met Feulgen's reagens en Giemsa.

Feulgen's reagens kleurt specifiek het DNA in de cel en leek daarom de aangewezen kleuring. Aanvankelijk werd *Calothrix membranacea* voor deze kleuring gebruikt. Er werd een aantal preparaten na verschillende fixatie- en hydrolysetijden gekleurd. Zonder resultaat echter, omdat de cellen helemaal gekleurd werden. Ook lukte het niet goed *Calothrix membranacea* op een glaasje te laten hechten, zodat tijdens de kleuring het grootste gedeelte van de wieren van het glaasje spoelde.

Daarom werd overgeschakeld op één van de wieren van de vloeistofcultures n.l. *Anabaena ambigua*. Van deze culture werd één druppel op een dekglasje gebracht. Daarna werd gewacht tot de voedingsoplossing geheel verdampd was. De wieren bleken nu zo vast op het dekglasje te zitten, dat ze er tijdens de kleuring niet afspoelden. Omdat de kleuring met Feulgen's reagens aanvankelijk niet tot resultaten leidde, werd gekleurd volgens de HCl-Giemsa methode. Giemsa is een kleurstof die niet specifiek DNA kleurt, maar ook RNA en polyfosfaten.

Wanneer echter met ^NHCl gehydrolyseerd wordt, worden RNA en polyfosfaten afgebroken. Daarna wordt met Giemsa alleen DNA gekleurd. Het voordeel van Giemsa boven Feulgen's reagens is, dat de kleuring in het eerste geval intensiever is, wat vooral bij kleine hoeveelheden DNA van belang is.

Voor *Anabaena ambigua* bleek de volgende methode om te kleuren de meest geschikte:

- 1) indrogen van één druppel culture op een dekglasje.
- 2) fixatie in Carnoy 3:1 (drie delen absolute alcohol op één deel ijsazijn), 45 minuten.
- 3) vijf minuten spoelen met leidingwater.
- 4) hydrolyse in N HCl bij 60°C gedurende vijf minuten.
- 5) vijf minuten spoelen met leidingwater.
- 6) twee uren kleuren met Giemsa.
- 7) tien minuten ontkleuren met 96% alcohol.
- 8) één minuut in absolute alcohol.
- 9) insluiten in euparal.

Later werden ook enkele preparaten gekleurd met Feulgen's reagens. (Dit reagens was als volgt gemaakt: 1 gram basische fuchsine oplossen in 200cc kokend water. Afkoelen tot 50°C en dan 20cc N HCl toevoegen. Verder afkoelen tot 25°C en dan 2 gram watervrij $K_2S_2O_5$ toevoegen en gedurende 24 uur in de koelkast. Dan schudden met $\frac{1}{2}$ gram norit en snel filtreren. Bewaren in een bruine fles in de koelkast.) De werkwijze was dezelfde als bij kleuring met Giemsa, alleen werd de Giemsa vervangen door Feulgen's reagens gedurende drie uren en werd daarna vijftien minuten gespoeld met leidingwater. Vervolgens via absolute alcohol ingesloten in euparal. Tevens werden enkele preparaten, die met Giemsa gekleurd werden niet gehydrolyseerd, maar gedurende vijf uren in een RN-ase oplossing gelegd.

De preparaten werden bekeken met een Zeisz-Winkel microscoop, voorzien van een 6 Volt microscooplampje. Later kwam een Leitz microscoop met verlichting door een xenonlamp beschikbaar. Deze microscoop was voorzien

van een camera met automatische belichtingsregeling. Deze apparatuur was een grote vooruitgang, in het bijzonder door de voortreffelijke verlichting, wat van groot belang is bij kleine en vaak zwak gekleurde structuren.

Waarnemingen.

Wanneer de in het voorgaande beschreven kleuring werd toegepast, bleef de celwand vaag zichtbaar. In het centrum van de cel werden structuren met zeer variabele vorm zichtbaar. De rest van de cel was kleurloos. Hieronder een aantal foto's van preparaten:



1.



Anabaena
ambigua.
kleuring: HCl-
Giemsa

2.

3.

4.

Anabaena ambigua.
kleuring: HCl-Giemsa

5.

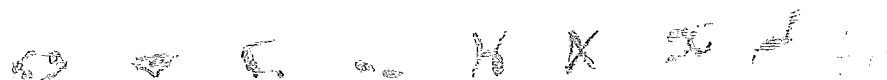
6.



Anabaena ambigua.
 kleuring: HCl-Giemsa

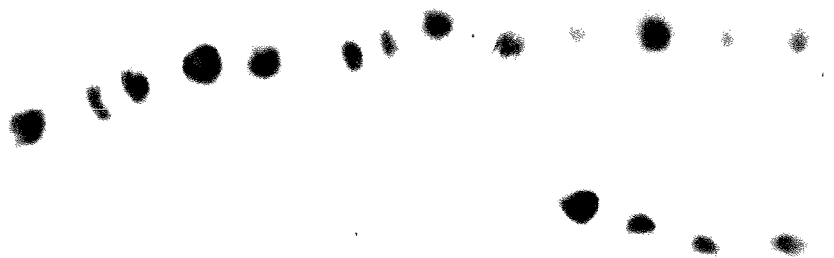
7.

Tevens werd van een aantal cellen de gekleurde structuur getekend:



Zoals op de foto's en tekeningen te zien is variëren de vormen van deze structuren van een soort netwerk tot staafjes met gespleten einden.

Kleuring met Giemsa na behandeling met RN-ase leverde preparaten met intensiever gekleurde cellen op. De fijne structuren die na hydrolyse met HCl zichtbaar werden, waren hier niet te zien, waarschijnlijk doordat de polyfosfaten hier eveneens gekleurd werden.



Anabaena
ambigua.
kleuring:
RN-ase-Giemsa

Kleuring met Feulgen's reagens leverde zeer zwak gekleurde structuren, die overeenkwamen met de structuren, die met HCl-Giemsa kleuring zichtbaar werden. Het bleek wegens de zwakke kleuring niet mogelijk deze beelden fotografisch vast te leggen. De overeenkomst met de HCl-Giemsa kleuring toonde echter wel aan dat ook daar het DNA gekleurd was.

Andere fixaties en kleuringen.

Er werden enkele preparaten gefixeerd met Zenker's fixatiemiddel. Resultaat was dat de hele cel enigszins rose gekleurd werd door Giemsa. De oorzaak is waarschijnlijk dat het chlorophyl door dit fixatiemiddel niet geëxtraheerd wordt, zoals dit bij Carnoy door de alcohol gebeurt.

Ook fixatie met Randolph's fixatiemiddel gaf, waarschijnlijk om de zelfde reden als Zenker's fixatief, een slecht resultaat.

Enige preparaten werden gekleurd met acridine-oranje, een fluoriserende kleurstof. Om onduidelijke redenen lukte de kleuring hier niet.

Discussie.

Doordat aan het levend materiaal omtrent het delingsproces niets anders te zien was dan het verschijnen van een wand, moest worden gewerkt met preparaten. Nadeel is dan dat een preparaat een beeld geeft van de situatie op het ogenblik van fixatie en zodoende de delingsstadia alle of voor een deel aanwezig zijn. De veranderingen tijdens een deling kunnen niet gevolgd worden; de volgorde waarin de verschillende stadia voorkomen moet gereconstrueerd worden uit de beelden die een preparaat te zien geeft. Hierbij moet rekening worden gehouden met de mogelijkheid dat de opgestelde volgorde onjuistheden bevat.

Aan de hand van de preparaten die met HCl-Giemsa gekleurd waren, werd een hypothese opgesteld voor het verloop van de deling van het genetisch materiaal van *Anabaena ambigua*.

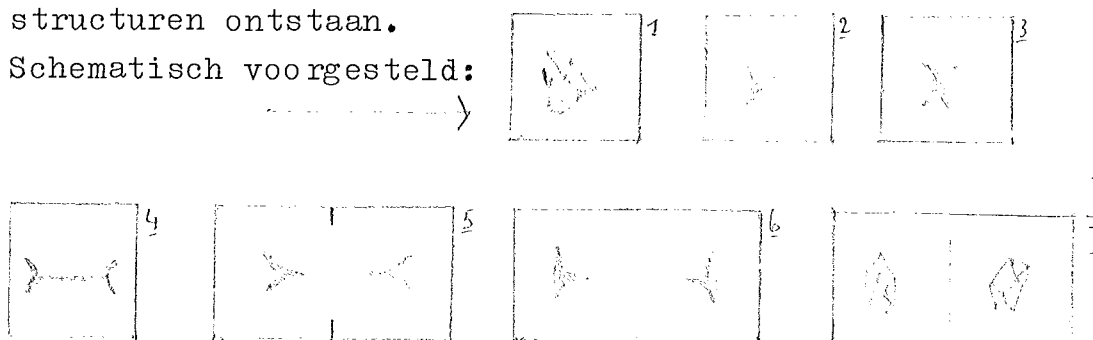
Het veelvuldig voorkomen van cirkel- en netvormige structuren, met concentraties van DNA in bepaalde punten, doet veronderstellen, dat dit de vorm is waarin het genetisch materiaal voorkomt wanneer de cel niet in deling is.

In zeer lange cellen, waarvan verondersteld kan worden dat ze in deling zijn of dit spoedig zouden gaan doen, liggen vaak staafvormige structuren, waarvan de uiteinden gespleten zijn.

Met deze gegevens en andere in de preparaten waargenomen beelden, werd het verloop van de deling van het genetisch materiaal geconstrueerd: De net- en cirkelvormige structuren gaan door concentratie van het ge-

netisch materiaal over in x-vormige. Vervolgens ontstaan staafjes met gespleten einden, die zich door midden delen, waarna in de dochtercellen weer de netvormige structuren ontstaan.

Schematisch voorgesteld:



De verdubbeling van het genetisch materiaal vindt hier waarschijnlijk in een stadium kort voor de deling plaats. Een deling zoals hierboven beschreven, komt niet overeen met de hypothese van Fuhs; ook de staafjes, die hij waarneemt, zijn hier afwezig. Een verklaring voor deze verschillen kan zijn dat Fuhs met een andere soort (*Oscillatoria amoena* (Kütz) Gomont.) gewerkt heeft en dat de delingen bij alle blauwwieren niet gelijk verlopen. Overeenkomst is er met de waarnemingen van Cassel en Hutchinson. Bij *Anabaena cylindrica* en *Microcoleus vaginatus* vonden zij netvormige structuren (zie blz. 11), die overeenkomen met de netvormige structuren die bij *Anabaena ambigua* aangetroffen worden. De x-vormige structuren, die eveneens bij *Anabaena ambigua* gevonden worden, vertonen overeenkomst met de structuren die Cassel en Hutchinson bij *Microcoleus vaginatus*, zowel bij gekleurde als levende wieren, vonden.

Overeenkomst is er ook met de waarnemingen met het electronenmicroscop. Het hierbij gevonden driedimensionale netwerk, komt overeen met de netvormige structuren van het "ruststadium". Om aan de hand van electronenmicroscopische preparaten een beeld te vormen van het verloop van een deling van het genetisch materiaal levert grotere problemen dan bij preparaten die gekleurd zijn voor het lichtmicroscop. Bij electronenmicroscopie wordt gewerkt met coupes van een cel. Een beeld van

de structuren van het genetisch materiaal in een cel moet daarbij dan uit een serie coupes worden opgebouwd. Het herkennen van delingsstadia wordt daarbij bijzonder moeilijk.

Een oplossing van het "blauwwierenprobleem" zal gezocht moeten worden in het verbeteren van de methoden bij het maken van preparaten. Hierbij zou kunnen worden gedacht aan:

- 1) het synchroniseren van de delingen van de blauwwieren, zodat de opeenvolgende stadia in een delingsproces met grotere zekerheid kunnen worden vastgesteld.
- 2) werken met radioactief gemerkt DNA om de verdeling hiervan over de dochtercellen te kunnen volgen.

Literatuur:

- Allen, M.B. 1952. The cultivation of Myxophyceae.
Arch. Mikrobiol. 17:34.
- Bütschli, O. 1902. Bemerkungen über Cyanophyceen und
Bakterien.
Arch. f. Protok. 1:41.
- Cassel, W.A. and W.G. Hutchinson. 1954. Nuclear studies
on the smaller Myxophyceae.
Exp. Cell Res. 6:134.
- Desikachary, T.V. Cyanophyceae.
- Fuhs, G.W. 1958. Bau, Verhalten und Bedeutung der Kern-
äquivalenten Strukturen bei *Oscillatoria*
amoena (Kütz) Gomont.
Arch. Mikrobiol. 28:270.
- Geitler, L. 1960. Schizophyzeen.
Handbuch der Pflanzenanatomie, Band VI, Teil I.
Berlin.
- Guilliermond, A. 1906. Contribution à l'étude cytologique
des Cyanophycées.
Rev. gén. Bot. 18:392, 447.
- ___, 1926. Nouvelles recherches sur la structure des
Cyanophycées.
Rev. gén. Bot. 38:129, 177.
- Haupt, A.W. 1923. Cell structure and cell division in
the Cyanophyceae.
Bot. Gaz. 75:170.
- Hegler, R. 1901. Untersuchungen über die Organisation
der Phycochromaceenzelle.
Jahrb. wiss. Bot. 36:229.
- Hopwood, D.A. and A.M. Glauert. 1960. The fine structure
of the nuclear material of the blue-green
alga, *Anabaena cylindrica* Lemm.
Jour. Bioph. Bioch. Cytology 8:813.
- Kohl, F.G. 1903. Über die Organisation und Physiologie
der Cyanophyceenzelle.
Jena.

- Pankratz, H.S. and C.C. Bowen. 1963. Cytology of blue-green algae. I. The cells of *Symploca muscorum*.
Am. Jour. of Botany 50:387.
- Poljansky, G und G. Petruschewsky, 1929. Zur frage über die Struktur der Cyanophyceenzelle.
Arch. f. Protok. 67:11.
- Ris, H. and R.N. Singh. 1961. Elektronmicroscope studies on blue-green algae.
Jour. Bioph. Bioch. Cytology 9:63.
- Smith, G.S. 1955. Cryptogamic Botany I.
New York.
- Zastrow, E.M.v. 1953. Über die Organisation der Cyanophyceenzelle.
Arch. Mikrobiol. 19:174.

Berekening van de vergroting van de foto's van de gekleurde preparaten.

- 1). Vergroting microscoop: $90 \times 10 \times 1,25 = 1125 \times$
Opnameverhouding camera: $3,2 : 1$
dus vergroting op negatief: $1125/3,2 = \text{ca. } 350 \times$
Vergroting van het positief: $7,5 \times$
dus uiteindelijke vergroting $7,5 \times 350 = \underline{\text{ca. } 2625 \times}$

- 2). Meting van de lengte van 100 cellen in het preparaat:
gemiddeld ca. 3μ per cel.
Meting van de lengte van 40 cellen op de foto:
gemiddeld 8 mm per cel.
Vergroting dus $8000/3 = \underline{\text{ca. } 2660 \times}$