

D 395

Kleurtechnieken voor de spoelfiguur in eieren van

Tetranychus urticae Koch.

Verslag van een doktoraal onderzoek ,
gedaan door ANNO HORST , onder leiding
van Dr. I.P.Pijnacker , van augustus 1972
tot januari 1973.

Rijksuniversiteit Groningen
Bibliotheek Biologisch Centrum
Kerklaan 30 — Postbus 14
9750 AA HAREN

Inhoud.

Inleiding	pag. 1.
Materiaal	pag. 1.
Methoden	pag. 2.
I. Haematoxyline kleuring	pag. 3.
II. Haemaluin kleuring	pag. 4.
III. Dubbelkleuring : safranine - methyleenblauw	pag. 6.
IV. De T.P.A. - techniek	pag. 8.
Enige notities betreffende de spoelfiguur	pag. 9.
Conclusie	pag. 9.
Samenvatting	pag. 9.
Literatuurlijst	pag. 10.

Inleiding.

De chromosomen van de spintmijt Tetranychus urticae Koch (fam. Tetranychidae, Acarina) hebben diffuse centromeren(11). Dit betekent dat de spoeldraden aan gehecht zijn over de gehele lengte van het chromosoom , in tegenstelling tot chromosomen met een gelocaliseerd centromeer , waarbij de draden aan dit centromeer zijn vastgehecht(1). Hieruit volgt dat de structuur van de spoel in het geval van de chromosomen met diffuse centromeren zou kunnen verschillen van de structuur van de spoel in het geval van chromosomen met een gelocaliseerd centromeer. Daarom is getracht de spoel van celdelingen van T. urticae Koch te onderzoeken aan coupes van klievingsdelingen.

Getracht werd met behulp van reeds bekende kleurtechniek- en de spoelfiguur zichtbaar te maken. Daar de resultaten binnen een en hetzelfde preparaat zeer wisselend waren , is geprobeerd de bestaande technieken aan dit materiaal aan te passen. Deze aangepaste technieken zullen in dit verslag beschreven worden.

Materiaal.

Tetranychus urticae Koch wordt gekweekt op bonenplanten bij een temperatuur van $23 \pm 1^{\circ}$ C. De eieren werden verzameld van de algemen kweek. Zowel bevruchte als onbevruchte eieren van verschillende leeftijden werden gebruikt. De beste resultaten zijn uiteindelijk verkregen met jonge eieren(2,4,8 en eventueel 16 cellig stadium) , omdat hierin de spoelen het grootst zijn. Met een Wild Heerbrugg M5 stereomikroskoop is het mogelijk de stadia van het blad te verzamelen(2).

Methoden.

Voor het maken van coupes ondergaan de eieren de volgende procedure:

- | | | |
|-----------------|--|-----------|
| Fixatie. | 1. Petrunkevitsch 60° C. I. (9) | : 60 min. |
| | 2. Petrunkevitsch 60° C. II. | : 60 min. |
| Dehydratie. | 3. alcohol 70% met J ₂ (cognackleurig) | : 24 uur. |
| | 4. alcohol 70% I. | : 24 uur. |
| | 5. alcohol 70% II. | : 24 uur. |
| | 6. alcohol 70% III. | : 24 uur. |
| | 7. alcohol 96% I. | : 30 min. |
| | 8. alcohol 96% II. | : 30 min. |
| | 9. alcohol 100% I. | : 30 min. |
| | 10. alcohol 100% II. | : 30 min. |
| | 11. toluol I. | : 60 min. |
| | 12. toluol II. | : 60 min. |
| Inbedden. | 13. in een paraffineblokje wordt een kuiltje gemaakt, waar de eieren ingebracht worden, terwijl vuil zoveel mogelijk verwijderd wordt. Het blokje wordt daarna in een stoof gezet bij 60° C. Na 4-5 uur wordt het blokje uit de stoof gehaald, waarna men de paraffine laat stollen. | |
| Snijden. | 14. met een microtoom worden coupes gesneden die 4 μ dik zijn. De coupes worden op objectglaasjes geplakt. | |
| Deparaffinatie. | 15. deparaffineren via xylol (2x), alcohol 100% (2x), alcohol 96% (2x), leidingwater (3x), en gedestilleerd water (3x). | |

Na het deparaffineren zijn de preparaten gekleurd. Hierna volgen de kleuringsmethoden, die gebruikt zijn.

I. Haematoxyline kleuring.

- Methode.
- | | |
|--|---------------|
| 1. beitsen in yzeraluin 3% | : 1½ - 3 uur. |
| 2. leidingwater 3x | : kort. |
| 3. gedestilleerd water 3x | : kort. |
| 4. kleuren in haematoxyline | : 1½ - 2 uur. |
| 5. leidingwater 3x | : kort. |
| 6. gedestilleerd water 3x | : kort. |
| 7. eventueel differentiëren in yzeraluin 1½% | |
| 8. leidingwater 3x | : kort. |
| 9. gedestilleerd water 3x | : kort. |
| 10. dehydreren via alcohol 96% (2x), alcohol 100% (2x), en xylol (2x). | |
| 11. permanent maken met canadabalsem. | |

Resultaat.

dooierschollen	: zwart.
protoplasma	: grijs-zwart gekorrelt op beige achtergrond.
chromosomen	: zwart.
spoel	: beige.

Opmerkingen. Wanneer bovengenoemde procedure wordt gevolgd, verkrijgt men een goed contrast tussen de dooierschollen en het protoplasma, terwijl in het protoplasma de spoel en de chromosomen duidelijk waarneembaar zijn. Bovendien garandeert deze procedure een konstant resultaat binnen één en hetzelfde preparaat.

Een langere beitsperiode dan drie uur veroorzaakt zo'n sterke kleuring, dat differentiatie zeker nodig is. Het eindresultaat binnen één preparaat is in dit geval zeer wisselend.

Laatst genoemde procedure is ook gebruikt na fixatie van de eieren in Carnoy, Bouin, Zenker, San Felice (14), Moricard (13) of niet verwarmde Petrunkevitsch (12). Het eindresultaat binnen één en hetzelfde preparaat was in alle gevallen zeer wisselend.

Suggestie. Wanneer de korte beitsperiode wordt gebruikt, zal hoogstwaarschijnlijk ook na fixatie in de hierboven genoemde middelen een goed resultaat worden verkregen.

Dr. J. Koster, Dier. Soc. (19) 1-56, 1909

1909

1909

1909

II. Haemaluin kleuring.

- Methode.
- | | | |
|--|----|--------------|
| 1. kleuren in haemaluin | | : 30-60 min. |
| 2. leidingwater | 3x | : kort. |
| 3. gedestilleerd water | 3x | : kort. |
| 4. dehydreren via alcohol 96% (2x), alcohol 100% (2x) en xylol (2x). | | |
| 5. permanent maken met canadabalsem. | | |

Resultaat. dooierschollen : paars (nr. 10 van Ostwald's 24-delige kleuren cirkel.(7)).
 protoplasma : licht paars=blauw gekorreld.
 chromosomen : donkerpaars.
 spoel : grijs=paars.

Opmerkingen. Het contrast tussen de verschillende onderdelen van het ei is niet zo groot als bij gebruik van de haematoxyline kleuring het geval is, maar de kleuring kan toegepast worden om snel enige bruikbare preparaten te verkrijgen.

Om een zo goed mogelijk resultaat te verkrijgen is het nodig de haemaluin oplossing op de volgende manier klaar te maken:

1. 0,1 gram haematoxyline tegelijkertijd met 0,02 gram NaJO_3 oplossen in 100 ml. gedestilleerd water.
2. na 10 minuten 5 gram kaliumaluin toevoegen. 15-30 minuten later is een egaal donkerpaarse oplossing verkregen.
3. 0,1 gram citroenzuur toevoegen. de kleur slaat nu om binnen enkele minuten van paars naar rood.
4. 1 tabletje (ca. 0,1 gram) NaOH toevoegen. de kleur slaat nu om van rood naar paars, terwijl de pH stijgt van 2,2 naar ca. 2,9.
5. gun de oplossing nu nog enige tijd (b.v. 30 min.) om te stabiliseren.

Het is beter de verschillende stoffen stap voor stap op te lossen zoals beschreven is, dan alles in een keer samen te voegen; dus ook niet, zoals genoemd door Romeis (12), haematoxyline, natriumjodaat en kaliumaluin tegelijkertijd oplossen.

Met eht door Romeis beschreven recept werden de preparaten te licht gekleurd. Daarom is het differentiatiemiddel chloraalhydraat niet meer aan latere oplossingen toegevoegd.

Het is gebleken dat de natriumhydroxyde beter na citroenzuur kan worden toegevoegd dan tegelijkertijd.

De kleurstof werkt het best in een pH-traject van 2,6 tot 3,1, alhoewel ook bij een hogere pH (tot ca. 4,5) nog een behoorlijk resultaat wordt verkregen, zodat men bij het bepalen van de pH niet al te nauwkeurig hoeft te zijn. De kleurstof werkt slecht bij een pH lager dan 2,6.

Wanneer meer dan 0,04 gram NaJO_3 wordt toegevoegd dan krijgt de vloeistof een donkere, bruine kleur, terwijl het kleureffekt van de vloeistof dan vergelijkbaar is met een korte lugol kleuring.

Door Romeis wordt aanbevolen de haemaluin oplossing te filtreren. Dit maakt de oplossing misschien langer houdbaar , maar geeft een minder sterke kleuring. Om dus het optimale kleureffect te verkrijgen is het van belang niet te filtreren.

Eigenaardig is , dat de vloeistof na 12-24 uur een goudkleurig oppervlak krijgt , ook na filtratie terwijl dit niet het geval is met de van Merck gekochte Mayer's haemaluin oplossing.

III. Dubbelkleuring : safranine-methyleenblauw.

Methode.	1. beitsen in chroomzuur 1%	: 96 uur.
	2. leidingwater 3x	: kort.
	3. gedestilleerd water 3x	: kort.
	4. kleuren in safranine in alcohol 40%	: 10 min.
	5. leidingwater 3x	: kort.
	6. gedestilleerd water 3x	: kort.
	7. kleuren in methyleenblauw 1%	: 4 uur.
	8. leidingwater 3x	: kort.
	9. gedestilleerd water 3x	: kort.
	10. dehydreren via alcohol 96% (2x), alcohol 100% (2x), en xylol (2x).	
	11. permanent maken met canadabalsem.	

Resultaat. dooierschollen : blauw.
 protoplasma : licht grijs-blauw gekorrelt.
 chromosomen : blauwzwart.
 spoel : licht grijs-blauw.
 Het contrast tussen de verschillende onderdelen is niet erg groot. Vooral de spoelfiguur is moeilijk van het protoplasma te onderscheiden.

Opmerkingen. Hoewel deze kleuring is afgeleid van het door Sentein(13) beschreven recept, is er weinig overeenkomst meer.

De chroomzuuroplossing wordt verkregen door 1 gram CrO_3 op te lossen in 100 ml gedestilleerd water. De voorgestelde beitsperiode is de minimumtijd. Het is wenselijk te beitsen gedurende bijvoorbeeld een week, terwijl Sentein juist een kortere periode voorstelt (12-24 uur).

De safranine oplossing wordt verkregen door 1 gram safranine op te lossen in 100 ml. alcohol 40%. In het door Sentein beschreven recept wordt gekleurd gedurende 24 uur, waarna gedifferentieerd moet worden met alcohol 100%, waarin chloraalhydraat is opgelost tot 1 gewichtsprocent. Het is gebleken, dat een veel kortere safranine kleuring mogelijk is (10 minuten), waarna geen differentiatie nodig is. Er is gevonden, dat in beide gevallen de roodkleuring in het preparaat niet meer te herkennen is na kleuring met methyleenblauw.

De methyleenblauwoplossing is op de volgende manier verkregen:

1. 0,25 gram citroenzuur oplossen in 100 ml. gedestilleerd water. De pH wordt nu 2,3.
2. 1 gram methyleenblauw toevoegen. Wanneer methyleenblauw volledig is opgelost, is de pH gedaald naar 2,0. Het oplossen van methyleenblauw duurt enige uren.
3. 1 tabletje (ca. 0,1 gram) NaOH toevoegen. Hierdoor stijgt de pH tot ongeveer 4,0.

De kleurstof geeft het beste resultaat, wanneer NaOH wordt toegevoegd na het oplossen van methyleenblauw.

Een te zure oplossing (b.v. pH=ca. 3,0) kleurt minder goed dan de beschreven oplossing, terwijl een meer neutrale oplossing (pH=ca. 5,0) ook niet het gewenste resultaat geeft.

Hoewel Sentein onder andere gebruik maakt van een kleurbad, waar ook oranje G in is opgelost, is in deze procedure oranje G achterwege gelaten, daar het niet een wezenlijke contrastverhoging geeft.

Suggesties. Het isoëlektrisch punt van de spoelfiguur ligt bij een pH van ongeveer 4,5 (3). Methyleenblauw is een basofiele kleurstof. Methylblauw is een acidofiele kleurstof (4). Waarschijnlijk is het mogelijk om bij gebruik van methylblauw, zoals door Sentein voorgesteld, een groter contrast tussen de verschillende onderdelen te verkrijgen dan bij gebruik van methyleenblauw.

Wanneer het fixatiemiddel van Carnoy wordt gebruikt in plaats van de verwarmde Petrunkevitsch, kleuren de dooierschollen niet of nauwelijks met methyleenblauw. Ook het protoplasma houdt de kleurstof lang niet altijd even goed vast, maar altijd beter dan de dooierschollen, zodat het protoplasma gemakkelijker bestudeerd kan worden. Vanwege het wisselende resultaat echter gaat veel materiaal van een preparaat verloren. Misschien is het mogelijk een recept te ontwikkelen, waarbij het protoplasma, na fixatie in Carnoy, de kleurstof goed blijft vasthouden, ook tijdens het dehydreren.

D. H. J. van der Vliet
van der Vliet
van der Vliet
van der Vliet

IV. De T.P.A.-techniek.

- Methode. 1. beitsen in looizuur.
2. beitsen in fosfomolybdeenzuur.
3. kleuren in amidozwart.
4. dehydreren via alcohol 96% (2x), alcohol 100% (2x)
en xylol (2x).
5. permanent maken.

Opmerking. Wegens gebrek aan tijd en de juiste literatuur(10) is het niet mogelijk om het juiste recept voor deze kleuring aangepast aan dit materiaal te beschrijven, noch om enige resultaten te geven.

Wel is in de literatuur (6,8) gevonden dat deze techniek speciaal kontraktiele eiwitten en spoel-
draden kleurt. Vanwege deze specifieke kleuring is het wenselijk het juiste recept uit te werken voor Tetranychus urticae Koch, zodat de spoelfiguur zo goed mogelijk bestudeerd kan worden.

Enige notities betreffende de spoelfiguur.

Met een aantal haematoxyline preparaten is geconstateerd dat de spoel uit chromosomale draden en doorlopende draden is opgebouwd. Comings en Okada (1) vinden overeenkomstige gegevens voor Oncopeltus fasciatus, een hemipteer met diffuse centromeren, terwijl Hughes-Schrader (5) doorlopende draden niet heeft kunnen aantonen bij Cocciden.

Er zijn tevens aanwijzingen dat, terwijl de chromosomen in de metafase plaat een driehoek vormen, de spoelfiguur een cilindrische structuur bevat. Dit wijst erop dat er niet alleen doorlopende spoeldraden tussen de chromosomen doorlopen, maar ook buitenlangs.

Tenslotte is gebleken dat de spoel tijdens de anafase en de telofase langer is dan tijdens de metafase.

Conclusie.

Uit de verkregen resultaten blijkt dat de haematoxyline kleuring een duidelijk contrast geeft tussen de verschillende onderdelen van het ei van Tetranychus urticae Koch, zodat met behulp van deze techniek de spoelfiguur goed bestudeerd kan worden, en deze techniek de voorkeur verdient boven de haemaluinkleuring en de safraninemethyleenblauw dubbelkleuring.

Samenvatting.

Een aantal kleurtechnieken die de spoelfiguur tijdens klievingsdelingen van Tetranychus urticae Koch zichtbaar maken, zijn beschreven.

Literatuurlijst.

1. Comings, D. E., Okada, T.A. - Holocentric chromosomes in *Onco-peltus*: Kinetochore Plates are present in Mitosis but absent in Meiosis - *Chromosoma* vol. 37, no.2, 1972, pag. 177.
2. Dittrich, V. - Die Embryonalentwicklung von *Tetranychus urticae* Koch in der Auflichtmikroskopie - *Zeitschrift für angewandte Entomologie*, Bd 61, 1968, H2,S, pag. 142-153.
3. DuPraw, E. J. - DNA and Chromosomes - Holt, Rinehart and Winston, Inc., 1970.
4. Gurr, E. - The rational use of dyes in biology - Leonard Hill, London, 1965.
5. Hughes-Schrader, S. - Cytology of Coccids (Coccoidea - Homoptera) - *Advances in Genetics*, vol. II, 1948, pag. 127-203.
6. Kallenbach, E. - A staining reaction associated with the cell membrane of dividing cells in the cleavage furrow - *Experimental Cell Research* 33, 1964, pag. 581-583.
7. Kerdijk, F. - Orde en harmonie in het rijk der kleuren - Talens en zoon, Apeldoorn, 1927.
8. Leblond, C.P., Puchtler, H., Clermont, Y. - Structures corresponding to terminal bars and terminal web in many types of cells - *Nature* 186, 1960, pag. 784-788.
9. Matthey, R. - Cytologie de la parthénogénèse chez *Pycnoscelus surinamensis* L. - *Revue Suisse de Zoologie*, Tome 52, Fascicule supplémentaire no. 1, 1945.
10. Puchtler, H., Leblond, C. P. - *American Journal of Anatomy* 102, 1, 1958. *Histochemical analysis of cell membranes and associated structures as seen in the intestinal epithelium.*
11. Pijnacker, L. P., Ferwerda, M. A. - Diffuse Kinetochores in the Chromosomes of the Arrhenotokous Spider Mite *Tetranychus urticae* Koch - *Experientia* 28, 1972, pag. 354.
12. Romeis, B. - *Mikroskopische Technik* - R. Oldenburg Verlag, München, Wien, 1968.
13. Sentain, P. - Le Determinisme des Mitoses Pluripolaires et leur Mécanisme d'après l'action interrompue du Phonyluréthane sur l'Oeuf D' Urodèle - *Chromosoma (Berl.)* 13, 1962, pag. 67-105.
14. Sharma, A. K., Sharma, A. - *Chromosome Techniques* - Butterworths, London, 1965.