

D547

HERSTEL VAN DOOR RONTGENSTRALEN VEROORZAAKTE CHROMOSOOMSCHADE
IN DE KLIEVINGSDELINGEN VAN TETRANYCHUS URTICAE (KOCH).

Verslag van een doctoraalonderzoek door
Harmen Hofstra; sept. 1973- april 1974.

Hoofdstuk I: Inleiding.

De spintmijt, *Tetranychus urticae* Koch, brengt veel schade toe aan wilde, zowel als kultuurgewassen. In ons land (veroorzaakt) *Tetranychus* vooral in de glastuinbouw moeilijk te bestrijden plagen (o.a. op komkommer). De schade aan de plant wordt teweeggebracht doordat de mijt zijn monddelen in het blad steekt en vervolgens de inhoud van de cellen opzuigt. Hierdoor wordt het assimilerend oppervlak van het blad verkleind en de verdamping vergroot. (1). Aan de spintmijt wordt veel onderzoek verricht, ondermeer gericht op een effectieve bestrijding. Dit laatste is voor de tuinbouw van groot economisch belang.

T. urticae behoort tot de orde der Acari, de onderorde Trombidiformes (Reuter), de familie Tetranychidae (Dunnadieu) en het geslacht *Tetranychus* (Dufour) (1).

T. urticae is arrhenotook parthenogenetisch. Dat wil zeggen, dat uit de onbevuchte eieren haploïde mannetjes, en uit de bevruchte eieren diploïde vrouwtjes ontstaan. Het haploïde aantal chromosomen is drie. De chromosomen zijn holokinetisch. Hierdoor en door het lage aantal chromosomen, leent *T. urticae* zich, evenals enkele aanverwante organismen, bijzonder voor karyologisch onderzoek. (1,3,4)

In de eieren van de spintmijt zijn de klievingsdelingen m.b.v. een stereobinoculair zeer goed te volgen. (2). Vanaf het ei doorloopt *T. urticae* de volgende stadia: 1. larve, 2. Nymfochrysalis, 3. Protonymfe, 4. Deuterochrysalis, 5. Deuteronymfe, 6. Teleiochrysalis en 7. adult. De chrysalisstadia zijn onbeweeglijk, de overige beweeglijk. De larve heeft zes poten, de overige stadia acht. Alle beweeglijke stadia kunnen spinnen. (1).

Door middel van chemicaliën en ioniserende straling kan men een groot aantal verschillende chromosomale afwijkingen induceren, zoals fragmenten, ringen, bruggen enz. (5,7,12). De aberraties kunnen in de eieren van *T. urticae* op eenvoudige wijze worden overzien (lage aantal chromosomen), en hun gedrag is over een aantal delingen te volgen. Geïnduceerde fragmenten gaan n.l. niet verloren, zoals dat bij chromosomen met gelocaliseerd centromeer het geval is. (3,4,6,8,9)

Waarschijnlijk veroorzaakt de in dit onderzoek gebruikte Röntgenstraling een "primaire lesie", die ofwel (in zichzelf) kan herstellen, of via uitwis-

seling met andere breukvlakken leidt tot aberraties. De vorming van aberraties is het beste te verklaren, als men de chromatide beschouwt als een enkele eenheid met een dubbele DNA-helix. Een primaire lesie moet dan worden gezien als een enkel- dan wel dubbeldraadsbreuk in het DNA, of als een verandering van een of meer basen, welke (basen) vervolgens worden verwijderd d.m.v. enzymatische herstelprocessen. Aberraties ontstaan dan als gevolg van de activiteit van DN-ase, (herstelmechanismen) en DNA-replicatie. (12)

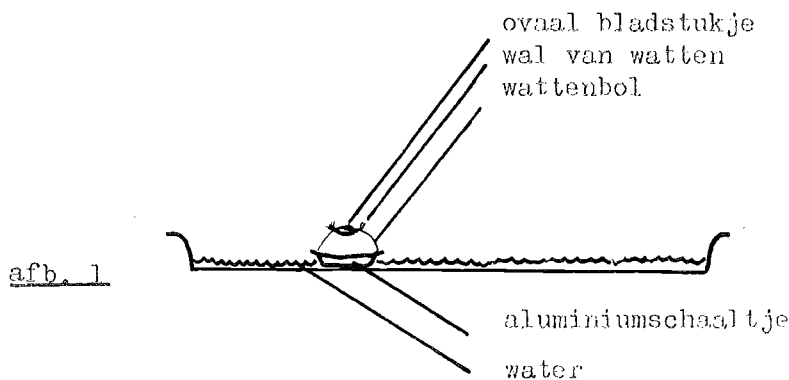
Aan herstel van chromosoomschade bij organismen met holokinetische chromosomen is nog slechts weinig onderzoek gedaan. In het onderhavige onderzoek is het gedrag van chromosomale afwijkingen, geïnduceerd met Röntgenstraling, gevolgd gedurende de eerste klievingsdelingen van de eieren van *T. urticae*.

Wat ...

Hoofdstuk 2: Materiaal en methoden.

Tetranychus urticae wordt gekweekt op jonge bonenplanten. (Phaseolus vulgaris, varieteit dubbele witte zonder draad.)

Van de flink aangetaste bladeren werden vrouwelijke teleiochrysalissen gezocht. Deze zijn gemakkelijk te herkennen aan het feit, dat ze meestal worden bezet of bewaakt door adulte mannetjes. De teleio's werden overgezet op ovale bladstukjes, die frisgehouden werden op een wattenbol in een aluminium schaalje (single-culture). Het geheel bevond zich in een bak met leidingwater. (zie afb. 1). Door rond het bladstukje een "wal" van watten op te trekken, werd voorkomen, dat de vrouwtjes, eenmaal uitgekomen, van het blad af zouden lopen.



Het werken met vrouwelijke teleio's heeft het voordeel, dat men later onbevuchte vrouwtjes krijgt, die slechts eieren leggen met het haploïde aantal chromosomen. Per blaadje van twee tot vier cm² werden ongeveer dertig teleio's verzameld. Twee tot drie dagen na het uitkomen van het adulte vrouwtje begint zij eieren te leggen.

Om nu afzonderlijk behandelbare eieren te verkrijgen, werd de volgende procedure gevolgd: Op een zeer natte, sterk afgeplatte wattenbol in een grote petrischaal (Ø 15 cm.) werden ongeveer 40 kleine bladstukjes gelegd in een spiraalvorm. (afb.2)

Op ieder bladstukje werd vervolgens m.b.v.

een penseel een vrouwtje geplaatst. Een dergelijke serie kan onder een stereomicroscop zeer snel (binnen twee min.) worden afgedraaid. Zodra geconstateerd werd, dat op een bepaald blaadje een ei was gelegd, werd het betreffende vrouwtje teruggezet en het blaadje overgeplaatst op een andere soortgelijke wattenbol. Dit laatste zonder het ei aan te raken. Zo konden op eenvoudige wijze, binnen enige uren, een redelijke hoeveelheid eieren worden verzameld. (± 30) De legtijd van ieder ei werd genoteerd.

Ieder ei werd daarna afzonderlijk, op een klein schaaltje met een natgemaakte wattenprop, bestraald met steeds 2000 Röntgen.

Gegevens bestralingsapparatuur: spanning 90 K.V.

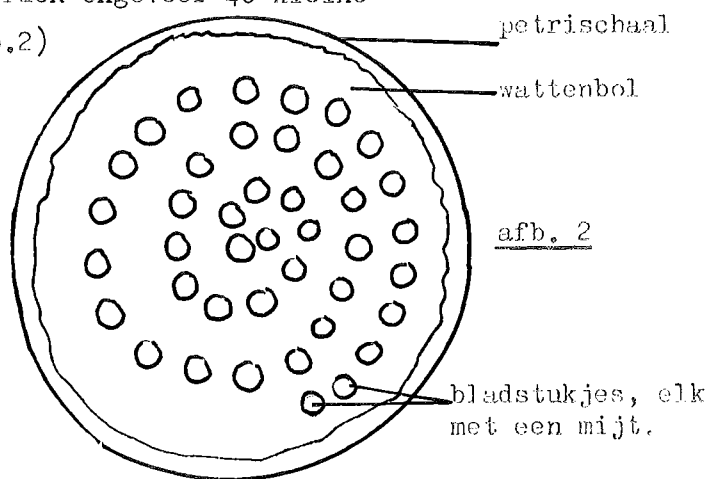
stroomsterkte 2 mA.

filter: 1 mm. aluminiumfilter.

afstand van onderrand koperen ring: 10 mm.

De hoeveelheid R. per tijdseenheid is dan 11,2 R/s, zodat 2'59" bestraald moest worden om 2000 R. toe te dienen.

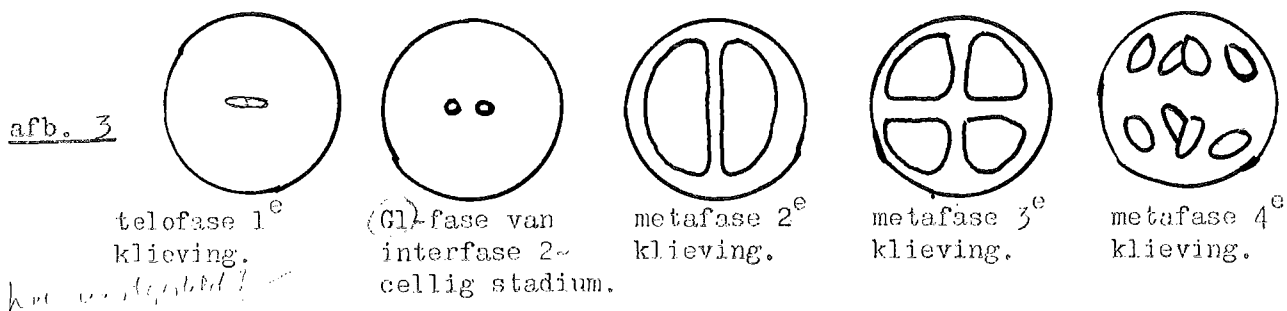
De bestraling vond plaats 2h 50' na het leggen van het ei. Dit bevond zich op dat tijdstip in de meeste gevallen in de vroege interfase van het tweecellige stadium, soms nog in de telofase van de eerste klieving. Na de bestraling kregen de eieren de gelegenheid zich nog enige tijd verder te ontwikkelen. Ze werden gefixeerd in Carnoy (abs. alcohol en ijsazijn 3:1)



op een van de volgende tijdstippen:

- 3,50 h - 4,00 h metafase tweede klieving,
- 4,40 h - 4,50 h metafase derde klieving en
- 5,40 h - 5,50 h metafase vierde klieving.

Bovengenoemde tijdstippen werden bepaald in een vooronderzoek, waarin de eieren in hun ontwikkeling werden gevolgd, getekend en op verschillende tijden gefixeerd en gesquasht. De temperatuur in de kamer werd hierbij zoveel mogelijk op 23-24°C gehouden, welke temperatuur bij het gehele onderzoek werd gehandhaafd. (afb. 3)



Na een fixatie van 5 tot 7 dagen werden de eieren gesquasht in ijzerhaematoxiline-chloraalhydraat, volgens Wittmann⁽⁻⁾. Van alle goed gekleurde en goed zichtbare metafaseplaten werd een tekening gemaakt. Met behulp van een oculair-micrometer werden alle chromosomen gemeten. De lengte werd in micrometer-eenheden genoteerd. Zo ontstonden 53 tekeningen van tweede klievingsmetafasen, 56 van derde klievingsmetafasen, waarvan vele als paren afkomstig van dezelfde bestraalde cel waren te herkennen, en 60 tekeningen van vierde klievingsmetafasen, waarvan er vele in 2-, 3- of viertallen waren te plaatsen. Van enkele preparaten werden bovendien foto's gemaakt. De tekeningen, evenals de foto's en negatieven worden als bijlage bij dit verslag gevoegd.

De tekeningen werden als volgt gekwantificeerd:

Van iedere metafase werd genoteerd:

- 1, Het aantal losse elementen, d.w.z. duidelijk als losliggend herkenbare chromosomale elementen.
- 2, Het aantal fragmenten. Deze werden gedefinieerd als duidelijk van het chromosoom losgeraakte delen, de chromosoomrest niet meegerekend.
- 3, Het aantal evidente breuken, d.w.z. het aantal breuken, dat zeker moet

- Hebben plaatsgevonden om het geregistreerde beeld te krijgen.
- 4, Het aantal potentiële breuken. (insnoeringen, indeukingen van een kant enz.)
 - 5, Hetaantal beschadigde chromosomen.

Verder werden nog enkele morfologische bijzonderheden genoteerd, als enkele uiteinden, ringen enz.

De gegevens van bijeenhorende tweetallen in de derde klievingsmetafase, alsmede de gegevens van bijeenhorende twee-, drie- of viertallen in de vierde klievingsmetafase werden gemiddeld. Zo ontstonden voor de derde 31, en voor de vierde klieving 18 gegevens omtrent ieder aspect. De gegevens betreffende ieder aspect binnen een klievingsdeling werden eveneens gemiddeld. De bovengenoemde gegevens en de gemiddelden bevinden zich op tabellen die als bijlagen bij dit verslag gevoegd worden.

De gegevens werden als volgt statistisch verwerkt:

1. Binnen iedere klievingsdeling werden de correlaties tussen de verschillende aspecten berekend m.b.v. de volgende formule:

$$r = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sqrt{\left[\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}\right] \left[\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}\right]}} \quad (14)$$

De significantie van iedere gevonde correlatiecoëfficiënt werd nagegaan met de formule:

$$t = \frac{r \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad \text{met } n-2 \text{ vrijheidsgraden} \quad (14)$$

2. Van de gemiddelden van de uitkomsten betreffende een aspect binnen een klievingsdeling werden blokdiagrammen gemaakt.

3. Vervolgens werd de correlatie bepaald tussen de verschillende aspecten over de drie klievingsdelingen. Dat wil zeggen, dat steeds de correlatie werd bepaald tussen twee rijtjes van de in punt 2 genoemde gemiddelden.
4. Tenslotte werd nagegaan, of er tussen de verschillende klievingsdelingen significante veranderingen in het aantal chromosomale afwijkingen optraden. Daar de gegevens binnen een klievingsdeling niet normaal verdeeld waren, werd gebruik gemaakt van een parametervrije toetsingsmethode. (15)

De massa der chromosomen werd binnen iedere klievingsdeling ingedeeld in: a) chromosomen zonder evidente breuk tegenover chr. met een evidente breuk.

b) chr. zonder beschadigingen tegenover chr. die wel beschadigd waren.

c) chr. zonder potentiële breuk tegenover chr. met (een) potentiële breuk(en).

Ingedeeld werd in de volgende schema's:

	Chromosomen met aspect a	chromosomen zonder asp. a	
klieving x	A	B	totaal aantal chrom. bij klieving x.
klieving y	C	D	totaal aantal chrom. bij klieving y.
	totaal aantal chrom. met as- pekt a.	totaal aantal chrom. zonder aspect a.	

Getoetst werd met de formule:

$$\chi^2 = \frac{N \left(|AD - BC| - \frac{N}{2} \right)^2}{(A+B)(C+D)(A+C)(B+D)} \quad (15)$$

Hoofdstuk 3, Resultaten.

In vrijwel alle geregistreerde metafasen kwamen in ruime mate chromosomale afwijkingen voor. Deze bestonden uit: breuken, fragmenten, insnoeringen (halve breuken), en enkele translocaties, isochromatiden en ringen. De tekeningen van alle metafasen, de foto's, negatieven en de tabellen met alle gegevens bevinden zich als bijlage bij dit verslag achter in de map.

1. De correlaties tussen de verschillende aspecten binnen een klieving, d.w.z.: voor elke klievingsdeling afzonderlijk (tabel Ia, Ib en Ic) werden de correlaties berekend tussen steeds twee rijen gegevens.

a) Correlaties in de tweede klievingsdeling. (Tabel Ia, rijen van 53 gegevens).

r_1 losse elem.- fragm.	= 0,734
r_2 fragm. - evid. br.	= 0,774
r_3 losse elem. - evid. br.	= 0,498
r_4 besch. chr.-potent. br.	= 0,240
r_5 potent. br. -fragm.	= 0,079

Significantie van deze gegevens; p = de kans, dat een zo hoge, of nog hogere correlatie door toeval is ontstaan.

$t_{r_1} = 7,718$	} extreem significante correlatie: $p \ll 0,001$
$t_{r_2} = 8,729$	
$t_{r_3} = 4,101$	
$t_{r_4} = 1,765$	} geen significante correlatie.
$t_{r_5} = 0,569$	

b) Correlaties in de derde klievingsmetafase. (tabel Ib, rijen van 31 gegevens)

$r_1 = 0,947$
$r_2 = 0,852$
$r_3 = 0,799$
$r_4 = 0,441$
$r_5 = 0,254$

Significantie:

$t_{r1} = 15,881$	}	extreme significantie $p \ll 0,001$.
$t_{r2} = 8,762$		
$t_{r3} = 7,160$		
$t_{r4} = 2,646$	—	waarschijnlijk gecorreleerd $p \approx 0,04$.
$t_{r5} = 1,141$	—	geen correlatie.

c) Correlaties in de vierde klievingsmetafase. (tabel Ic, 18 gegevens)

$r_1 = 0,928$
$r_2 = 0,961$
$r_3 = 0,914$
$r_4 = 0,691$
$r_5 = 0,336$

Significantie :

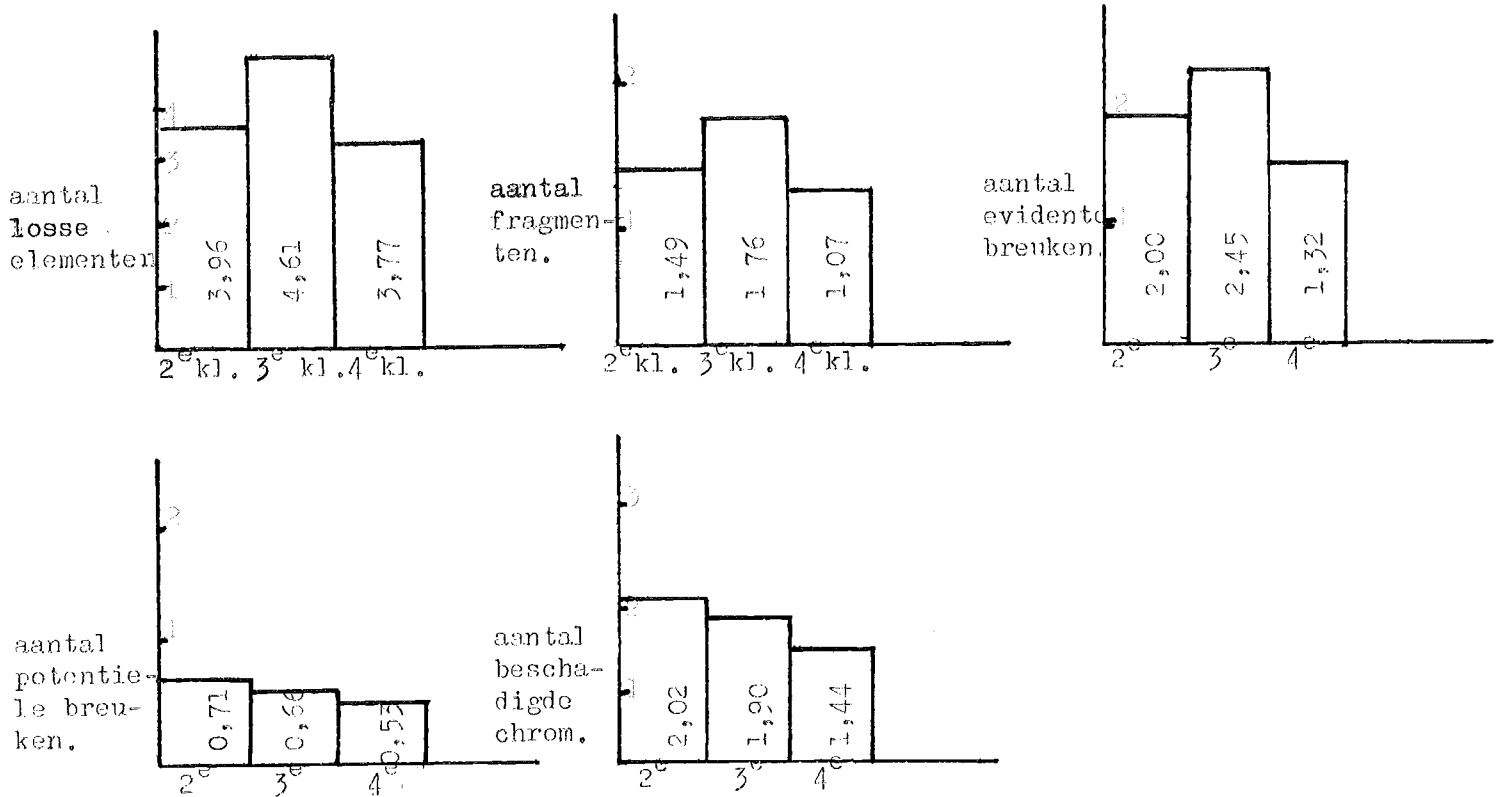
$t_{r1} = 9,963$	}	extreme significantie $p \ll 0,001$
$t_{r2} = 13,899$		
$t_{r3} = 9,011$		
$t_{r4} = 3,821$	—	significant gecorr. $p \approx 0,001$
$t_{r5} = 1,427$	—	geen correlatie.

2. Vergelijking tussen de drie klievingsdelingen.

a) Hiertoe werden eerst de uitkomsten van elk aspect binnen een klieving gemiddeld:

	2 ^e klieving (2cell.)	3 ^e klieving (4 c.)	4 ^e klieving (8 c.)
aant. losse el.	3,96	4,61	3,77
aant. fragm.	1,49	1,76	1,07
aant. evid. br.	2,00	2,45	1,32
aant. potent. br.	0,71	0,66	0,53
aant. besch. chr.	2,02	1,90	1,14

b) Van deze gemiddelden werden de volgende blokdiagrammen getekend:



c) De correlaties tussen de verschillende bekeken aspecten, over de drie klievingen, werden berekend d.m.v. de in 2a genoemde gemiddelden.

$$\begin{aligned}
 r_1 \text{ losse elem.- fragm.} &= 0,9085 \\
 r_2 \text{ fragm.- evid. br.} &= 0,9999 \\
 r_3 \text{ losse elem.- evid.br} &= 0,9118 \\
 r_4 \text{ besch. chr.- pot. br} &= 0,9972 \\
 r_5 \text{ potent. br.- fragm.} &= 0,7834
 \end{aligned}$$

Opmerking: Over de waarde van bovengenoemde correlaties kan getwist worden. Significantie ervan kan niet worden getoetst. Een correlatie tussen twee rijtjes van drie getallen kan nooit significant zijn. Significantie wordt namelijk bereikt als $t \rightarrow \infty$; ter illustratie: $t_{r_2} = 70,705$. (14).

d) Toetsing van de verschillen tussen de klievingen.

1. Evidente breuken.

2 ^e	klievingsmetafase:	159	chromosomen,	waarvan	75	met evid. breuk.
3 ^e	,,	93	,,	,,	54	,, ,, ,, .
4 ^e	,,	54	,,	,,	17,75	,, ,, ,, .

$$\begin{array}{l} \chi^2 \\ \chi^2 \\ \chi^2 \end{array} \begin{array}{l} 2^e - 3^e = 2,37 \\ 3^e - 4^e = 7,69 \\ 2^e - 4^e = 2,80 \end{array} \quad \begin{array}{l} p > 0,05 \text{ : juist niet significant.} \\ p < 0,01 \text{ : zeer significant.} \\ p > 0,05 \text{ juist niet significant.} \end{array}$$

Opm: Vanwege de extreem hoge correlatie tussen de drie aspecten: evidente breuken, fragmenten en losse elementen onderling, (Result. Ia, b en c) is bij de berekening der significantie van de verschillen tussen de klievingen slechts van een van deze gegevens gebruik gemaakt, en wel van de evidente breuken. Zie ook hoofdstuk 4, tweede alinea.

2. Beschadigde chromosomen.

2 ^e	klievingsmetafase:	159	chromosomen,	waarvan	107	beschadigd.
3 ^e	,,	93	,,	,,	59	,, .
4 ^e	,,	54	,,	,,	25,84	,, .

$$\begin{array}{l} \chi^2 \\ \chi^2 \\ \chi^2 \end{array} \begin{array}{l} 2^e - 3^e = 0,235 \\ 3^e - 4^e = 2,79 \\ 2^e - 4^e = 5,69 \end{array} \quad \begin{array}{l} p \gg 0,05 \text{ niet significant.} \\ p > 0,05 \text{ juist niet significant.} \\ p \approx 0,01 \text{ zeer significant.} \end{array}$$

3. Potentiele breuken.

2 ^e	klievingsmetafase:	159	chromosomen,	waarvan	38	met potentiele breuk.
3 ^e	,,	93	,,	,,	19,5	,, ,, ,, .
4 ^e	,,	54	,,	,,	9,58	,, ,, ,, .

χ^2	2^e-3^e kl. = 0,015	volkomen insignificant.
χ^2	3^e-4^e kl. = 0,07	„ „ „
χ^2	2^e-4^e kl. = 0,08	„ „ „

3. Verder werden nog enkele morfologische bijzonderheden genoteerd:

	2^e kl. metafase	3^e kl. metafase	4^e kl. metafase
chrom. langer door isochrom. of trans- locaties.	4	14	6
chrom. met een enkel uiteinde	12	3	0

Hoofdstuk 4, Diskussie.

Aan de gevolgen, voor de chromosomen, van een behandeling met ioniserende straling, is in het verleden reeds door velen onderzoek verricht. Het overgrote deel van dit onderzoek vond echter plaats aan organismen, die in het bezit zijn van chromosomen met een gelocaliseerd centromeer. Er werd gewerkt met *Vicia faba* en *Tradescantiasoorten* (o.a. 5,6,7,11), met *Drosophila* en *Paramecium* (6), of met kweken van zoogdiercellen (9,10). In verhouding zeer weinig onderzoek vond plaats aan organismen met holokinetische chromosomen (3,4). Het verschil is zeer groot, immers bij chromosomen met gelocaliseerd centromeer gaan eventuele a-centrische fragmenten bij een volgende celdeling grotendeels verloren (9 e.a.). Bij organismen met holokinetische chromosomen kunnen de fragmenten blijven "meedraaien" en eventueel ook in latere celdelingen deelnemen aan herstelprocessen, replicatie enz. (3,4).

In dit onderzoek werden eieren van *T. urticae* bestraald in de G I-fase van de tweecellige interfase, en in de opvolgende metafasesstadia gefixeerd en bekeken. In alle drie de onderzochte stadia, (de metafasen van de tweede, derde en vierde klieving) werd een zeer hoge correlatie gevonden tussen de aantallen fragmenten, losse elementen en evidente breuken. Elk van deze drie aspecten kan daarom zonder bezwaar als eenzelfde gegeven omtrent de chromosoomschade worden opgevat. Ook bij vergelijking van deze drie aspecten tussen de drie stadia (result. 2c) valt de hoge correlatie op. Deze correlatie is echter geen waardevol gegeven. (zie opmerking bij result. 2c). Bij de berekening van de overige benodigde gegevens en bij de bespreking daarvan, werd slechts van een van de drie bovengenoemde aspecten gebruik gemaakt. Deze "algemene chromosoomschade" vertoont van de tweede tot de derde klieving een juist niet significante toename. Van de derde tot de vierde klieving volgt dan een wel significante afname. De toename van de chromosoomschade van de tweede tot de derde klievingsmetafase kan op verschillende manieren worden verklaard:

1. Door breuken aan te nemen op het niveau van een onderdeel van de chromatide:
Volgens Kihlman (11) gedraagt de chromatide zich t.o.v. Röntgenstraling in de S- en de G2-fase van de interfase als een eenheid. Als gevolg van de bestraling ontstaan dan aberraties op chromatideniveau in de volgende metafase. In de profase gedraagt de chromatide zich als een dubbele eenheid. Bestraling geeft dan aanleiding tot aberraties op subchromatideniveau, een deling later eventueel op chromatideniveau. In de G1-fase lijkt de chromatide weer een eenheid te zijn, met als gevolg van bestraling chromosoomaberraties. Wolff (1969) veronderstelt, dat de subeenheden van de chromatide in de G2-fase zeer hecht aaneengesloten zijn, in de profase minder en in de G1-fase weer hechter.(11). In de late G1-fase ontstaan echter na bestraling weer aberraties op chromatideniveau. (Evans & Savage 1963; Wolff & Luippold 1964, aangehaald door Kihlman (11)). Mogelijke verklaring: Enkeldraadsbreuken in de dubbele DNA-helix worden niet meer voor de verdubbeling hersteld. (Evans & Scott 1969 (11)). Deze verklaring komt overeen met de theorie van Bender Griggs en Bedford (12). Zij gaan ervan uit, dat de chromatide zich in de G1-fase gedraagt als een dubbele DNA-helix. Aberraties worden dan gevormd door breuken en herstelmechanismen op DNA-niveau. Een dubbeldraads breuk in G1 leidt tot een chromosoombreuk in de opvolgende metafase. Enkeldraads breuken worden snel hersteld, waardoor de chromatide zich als een enkelvoudige eenheid voordoet. Slechts in het allerlaatste gedeelte van G1 is de tijd voor herstel te kort geworden. De dan ontstane enkeldraads breuken geven een chromatidebreuk in de eerstvolgende metafase. In het geval van dit onderzoek (met holocentrische chromosomen) ontstaat dan een breuk op chromosoomniveau in de daaropvolgende metafase. Echter slechts in een van de beide dochtercellen. (zie bijv. tek. IX, IXa en XIX, XIXa). In vele gevallen zal het chromatidefragment al voor de metafase losgeraakt zijn van de rest van het chromosoom. Het resultaat is dan te zien als een chromosoom met een enkel uiteinde en een enkel fragment. (zie afb. 4).

afb. 4



Zie tekeningen: 2C.IV,VI,VIII,XIV,XVII,
XXII,XXIII,XXV,XXVI,
XXVIII,XXXI,XLIX.

In andere gevallen is mogelijk het chromatidefragment aan de rest van het chromosoom blijven zitten. Dit is dan een van de mogelijke verklaringen voor de potentiële breuken (zie afb. 5). Deze komen zeker niet overeen met de door verschillende auteurs genoemde "gaps" (5,8,11,12), achromatische gedeelten, die alleen met de DNA-specifieke feulgenkleuring worden gevonden.

afb. 5



Zie o.a. tekeningen 2C. II,V,X,
XXVII,XXXV,XLIII,
L,LIII.

Chromosomen met een "enkel uiteinde" komen in de derde klievingsmetafase slechts in zeer gering aantal meer voor (tek. 4C. IIa,XIII,XXVIIa), in de vierde klieving in het geheel niet meer. Een verklaring hiervoor met bovengenoemde theorie is, dat het hier enkeldraads breuken betreft in gedeelten, die zich reeds verdubbeld hadden op het ogenblik van de bestraling. (zie afb. 6)

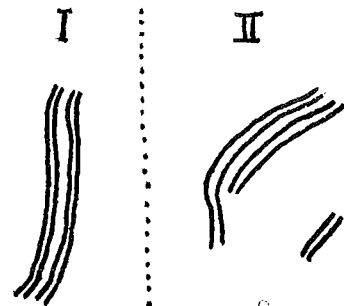
afb. 6



metafase 2^e klieving



4-cell. interfase



metafase 3^e kl.

Dit laatste valt buiten het eigenlijke terrein van dit onderzoek, waarin immers de G1-fase werd bestraald. Gezien de aard van het materiaal (snel delend weefsel met een zeer korte G1-fase) is het echter niet verwonderlijk, dat in enkele gevallen de S-fase reeds was bereikt tijdens de bestraling.

1a. Een tweede verklaring voor de toename van de chromosoomschade zou de volgende kunnen zijn: De bestraling veroorzaakt zwakke plekken (lesies) of niet volledige breuken in de chromatide. Deze gaan pas in de eerstvolgende anafase, o.i.v. de mechanische spanningen over in echte breuken. In dit geval zou alleen de eiwitmantel beschadigd zijn en niet het DNA, of het herstel van het DNA zou sneller voltooid zijn (reeds voor de S-fase), dan eventueel herstel van de eiwitmantel.

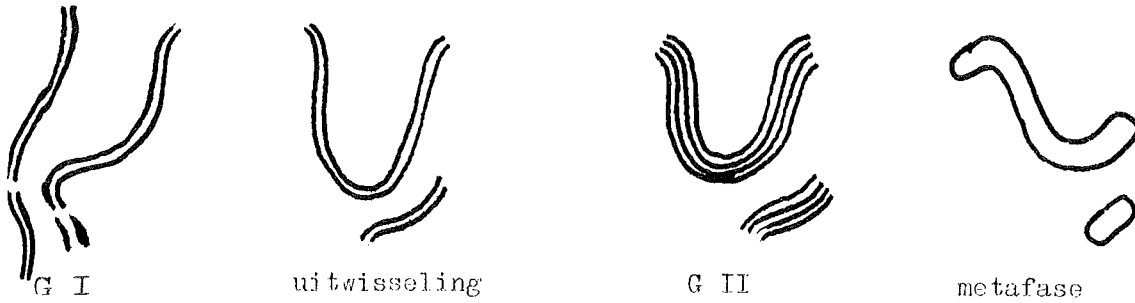
Voor deze verklaring pleit de afname van de tweede tot de derde klieving van de als "potentiele breuken" geregistreerde afwijkingen. (insnoeringen of indeukingen van een kant, die niet evident een breuk in het chromosoom betreffen.) Potentiele breuken zouden zo in evidente zijn overgegaan.

2. Van de derde tot de vierde klieving neemt de chromosoomschade significant af. Dit kan als volgt verklaard worden: Gezien het holokinetische karakter van de chromosomen (4) en ook gezien de (gemeten) lengteverhoudingen kan de afname van het aantal fragmenten en breuken niet te wijten zijn aan het verlies van fragmenten. Dit is wel het geval in soortgelijke experimenten met monocentrische chromosomen (o.a. 9). Experimenten met stralingsintensiteit en dosisfractionering met o.a. *Tradescantia* (Sax & Fabergé), toonden aan, dat herstel van breuken slechts een beperkte tijd mogelijk zou zijn, nl. tot ongeveer een uur. (5). Daarna zou er stabilisatie van de breukvlakken optreden (telomeervorming). Dit is niet in overeenstemming met de in dit onderzoek gevonden gegevens, die erop wijzen, dat herstel veel langer mogelijk blijft. Aangezien de fragmenten in dit materiaal niet verloren gaan, maar (althans theoretisch) onbeperkt kunnen blijven "meedraaien", is herstel ook in volgende celgeneraties mogelijk.

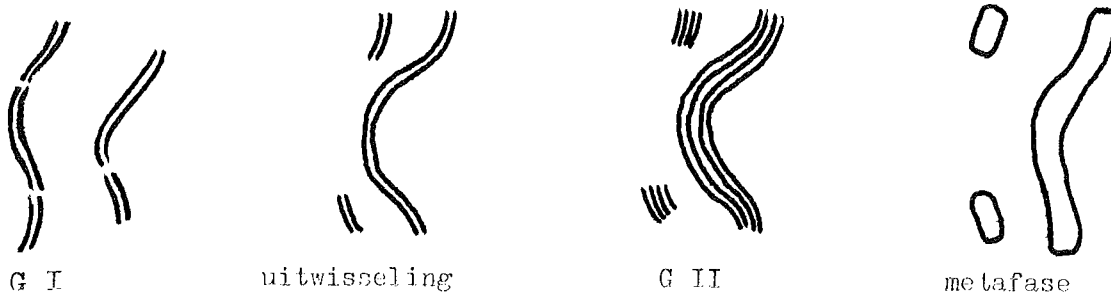
3. Tenslotte nog iets over de chromosomen, die langer waren dan normaal:

Deze kunnen zijn ontstaan door translocaties, d.m.v. interchromosomale uitwisseling. Zie afb. 7 en 8.

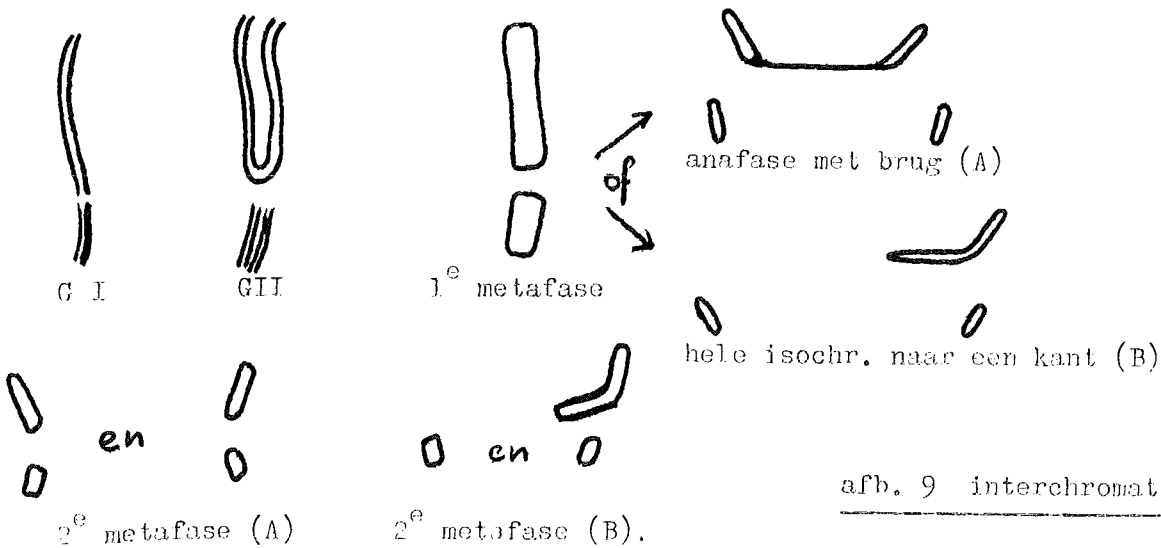
Een tweede mogelijkheid vormen de isochromatiden, ontstaan door inter- of intrachromatide uitwisseling. Zie afb.9.



afb. 7 interchromosomale uitwisseling.



afb. 8 interchromosomale uitwisseling.



afb. 9 interchromatide uitwisseling.

De translocaties zijn meteen in de opvolgende metafase (de tweede klievingsmetafase) te zien. De isochromatiden komen pas een klieving later naar voren. In het geval van translocaties krijgt men in de beide dochtercellen van de derde klieving hetzelfde beeld. bij isochromatiden is dat verschillend. Hierbij moet echter worden opgemerkt, dat er eveneens veranderingen kunnen zijn opgetreden door herstelmechanismen tussen de tweede en de derde klieving.

Omdat de meeste langere chromosomen in de derde klievingsmetafase in paren voorkomen (d.w.z. in beide dochtercellen een), kan men konkluderen, dat er in de meeste gevallen sprake is van translocaties. (o.a. tekeningen 4C. I en Ia, IX en IXa).

Isochromatiden komen in slechts enkele gevallen voor. (tek. 4C. XXIXa, mogelijk ook XV). In geval 8C. VIII b en c is waarschijnlijk ook sprake van isochromatiden.

Konklusie: uit de gegevens is, mede door mogelijke herstelprocessen tussen de klievingen, niet vast te stellen welk mechanisme in de meeste gevallen heeft geleid tot het ontstaan van chromosomen langer dan normaal.

4. Algemene Konklusie.

Het onder punt 1 en 2 genoemde resumerende, kan men stellen, dat tot aan de derde klieving, (de tweede celdeling na bestraling) het herstel wordt overvleugeld door de toename van de chromosoomschade. Deze toename is voor het merendeel het gevolg van niet meer herstelde enkeldraads breuken in de dubbele DNA-helix, ontstaan in de late G I-fase. Na de derde klieving speelt deze toename geen rol meer, omdat deze dan alleen voorkomt a.g.v. enige enkeldraadsbreuken in de S-fase. De gehele afname van de chromosoomschade na de derde klieving kan dan gezien worden als het resultaat van herstelmechanismen.

Hoofdstuk 5, Samenvatting.

Eieren van *Tetranychus urticae* Koch werden in de G1-fase van de tweecellige interfase bestraald met steeds 2000 Röntgen. Ze werden vervolgens onderzocht op chromosoomschade in de metafase van de tweede, de derde en de vierde klieving. De stralenschade bestond uit: fragmenten, evidente en niet evidente (potentiele) breuken, translocaties, isochromatiden en enige minder voorkomende afwijkingen.

Van de tweede tot de derde klieving werd een lichte toename van de chromosoomschade geconstateerd, van de derde tot de vierde klieving een significante afname.

Deze resultaten werden verklaard met behulp van de theorie van Bender, Griggs en Bedford omtrent het gedrag van chromosomen en chromatiden t.o.v. ioniserende stralen. (12): De chromatide gedraagt zich in de G1-fase als een dubbele DNA-helix. Een dubbeldraadsbreuk in G1 leidt tot een chromosoombreuk en een fragment in de eerstvolgende metafase. Een enkeldraadsbreuk in G1 wordt snel hersteld, behalve in het laatste gedeelte van de G1-fase, wanneer de tijd voor herstel te kort geworden is. Het resultaat is dan een chromosoombreuk in de eerstvolgende en een chromosoombreuk in een der beide dochtercellen in de daaropvolgende metafase.

Zo wordt tot de tweede celdeling na de bestraling (de derde klieving in dit onderzoek) eventueel herstel overschaduwed door een toename van de zichtbare chromosoomschade, als gevolg van enkeldraadsbreuken in G1. Hierna vind volgens bovengeschetst mechanisme geen toename van de stralenschade meer plaats. De afname van de schade na de tweede celdeling na bestraling komt dan geheel op rekening van herstelprocessen.

Literatuur.

1. Gasser R. 1951.
Zur Kenntnis der gemeinen Spinnmilbe *Tetranychus urticae* Koch.
Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft
24-3
2. Dittrich V. 1968.
Die Embryonalentwicklung von *Tetranychus urticae* Koch in der
Auflichtmikroskopie.
Z. für angewandte Entomologie 61 142-153.
3. Cooper R.S. 1972.
Experimental Demonstration of Holokinetic Chromosomes and of
Differential 'Radiosensitivity' during Oogenesis, in the
Grassmite, *Siteroptes graminum* (Reuter).
J. exp. zool. 182 69-94
4. Pijnacker L.P. and Ferwerda M.A. 1972.
Diffuse Kinetochores in the Chromosomes of the Arrhenotokous
Spidermite *Tetranychus urticae* Koch.
Experientia 28 354.
5. Evans H.J. 1962.
Chromosome aberrations induced by Ionizing Radiations.
Int. Review of Cytology 13, ..
6. Sobels F.H. 1962.
Repair from Genetic Radiation damage.
Proceedings of an international symposium at Leiden University 1962.
Pergamon Press 1963.

7. Lea D. E. 1946
Actions of Radiations on living Cells.
Cambridge University Press.
8. Evans H.J. 1966.
Repair and Recovery from Chromosome Damage induced by fractionated X-Ray Exposure.
Radiation Research. 1967.
North Holland Publishing Comp. Amsterdam, 1967.
9. Carrano A.V. and Heddle J.A. 1973.
The fate of Chromosome aberrations.
J. Theor. Biol. 38: 298-304.
10. Carrano A.V. 1972.
Chromosome Aberrations and Radiation induced Cell-death, parts I and II.
Mutation Research 17 : 341-353 en 355-366
11. Kihlman B.A. 1970.
Subchromatid exchanges and the strandedness of Chromosomes.
Hereditas 65: 171-186.
12. Bender M.A. Griggs G. and Bedford J.S. 1974.
Mechanisms of Chromosomal Aberration Production. Part III:
Chemicals and Ionizing Radiation.
Mutation Res. 23: 197-212.

13. Wolff Sh. 1963.
Radiation induced Chromosome-aberrations.
Columbia University Press New-York London.

14. Moroney M.J.
Facts from Figures.
Penguin Books Ltd. 1963.

15. Siegel S. 1956
Nonparametric Statistics.
Mc. Graw- Hill Book Company.

Tabel Ia : Stralenschade aan de chromosomen in de tweecellige meta-
fase van eieren van *T. urticae*.

nr.	aantal losse elementen.	aantal frag- menten.	aantal evi- dente breuken.	aantal pöten- tiele breuken	aantal bescha- digde chromosomen.
I	3	0	2	1	3
II	3	2	4	0	3
III	4	2	3	0	3
IV	5	3	4	1	3
V	5	3	3	1	3
VI	3	0	2	0	2
VII	4	1	1	0	1
VIII	5	2	3	0	2
IX	4	3	4	0	3
X	3	0	2	2	3
XI	6	3	3	0	3
XII	4	1	1	1	3
XIII	3	1	1	0	2
XIV	5	2	2	0	1
XV	4	1	1	0	1
XVI	3	1	2	0	2
XVII	3	0	0	1	3
XVIII	3	0	2	0	1
XIX	5	2	2	0	1
XX	3	2	3	0	2
XXI	3	3	2	2	3
XXII	4	2	2	2	3
XXIII	5	2	2	0	1
XXIV	5	2	3	1	2
XXV	6	3	2	1	3
XXVI	4	2	1	2	2
XXVII	3	1	2	1	2
XXVIII	5	2	2	1	1
XXIX	4	1	1	1	2
XXX	3	0	0	0	0
XXXI	5	2	2	1	1
XXXII	3	0	0	0	0
XXXIII	3	1	1	0	3
XXXIV	4	1	2	2	3
XXXV	6	3	4	2	2
XXXVI	4	2	2	0	2
XXXVII	4	2	2	1	2
XXXVIII	3	1	1	0	1
XXXIX	4	1	1	0	1
XL	5	2	2	1	2
XLI	3	0	2	0	2
XLII	5	3	4	2	3
XLIII	3	0	0	1	1
XLIV	4	2	2	1	2

Tabel Ia; de tweecellige klievingsmetafase.

nr.	losse elem.	fragm.	evid. breuken	potent. br.	besch. chr.
XLV	3	0	2	1	2
XLVI	5	3	4	0	3
XLVII	3	1	2	1	2
XLVIII	4	1	1	0	1
XLIX	5	3	4	1	3
L	3	2	3	2	3
LI	4	1	1	2	1
LII	3	0	1	0	1
LIII	4	1	1	1	2
gemiddeld:	3,96	1,49	2,00	0,71	2,02

Tabel Ib: Stralenschade aan de chromosomen in de viercellige metafase, (derde klieving) van eieren van *T. urticae*. Gegevens van bijbehorende tweetallen zijn gemiddeld.

nr.	losse elem.	fragm.	evid. breuken	potent. br.	besch. chr.
I	4	1	2	2	2
II	3 $\frac{1}{2}$	1	2	$\frac{1}{2}$	1 $\frac{1}{2}$
III	3	0	0	0	0
IV	5	2	2	0	1
V	4	1	1	1	2
VI	5	2	2	0	1
VII	3	0	0	1	1 $\frac{1}{2}$
VIII	3 $\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	2 $\frac{1}{2}$	1	2 $\frac{1}{2}$
IX	4 $\frac{1}{2}$	1 $\frac{1}{2}$	2 $\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	2
X	5	2	2	0	2
XI	4	1	1	$\frac{1}{2}$	1 $\frac{1}{2}$
XII	5	2	2	1	1
XIII	4 $\frac{1}{2}$	2	2	0	2
XIV	5	2	4	1	3
XV	4	1	3	0	1
XVI	6	3	3	0	3
XVII	4	1	3	0	2
XVIII	3 $\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	1 $\frac{1}{2}$	1	2 $\frac{1}{2}$
XIX	5 $\frac{1}{2}$	3	3 $\frac{1}{2}$	1 $\frac{1}{2}$	2 $\frac{1}{2}$
XX	6 $\frac{1}{2}$	3 $\frac{1}{2}$	5 $\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	3
XXI	6 $\frac{1}{2}$	3 $\frac{1}{2}$	4 $\frac{1}{2}$	1 $\frac{1}{2}$	3
XXII	7 $\frac{1}{2}$	4 $\frac{1}{2}$	5	2	3
XXIII	5 $\frac{1}{2}$	4	4 $\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	3
XXIV	6	3	4	1	2
XXV	5	2	2 $\frac{1}{2}$	1	3
XXVI	5 $\frac{1}{2}$	2 $\frac{1}{2}$	2 $\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	2
XXVII	4	2 $\frac{1}{2}$	3 $\frac{1}{2}$	1	3
XXVIII	3	$\frac{1}{2}$	2	$\frac{1}{2}$	2
XXIX	3	0	0	0	0
XXX	3	0	1	0	1
XXXI	5	2	2	1	1
gemiddeld	4,61	1,76	2,45	0,66	1,90

Tabel Ic: Stralenschade aan de chromosomen in de viercellige metafase, (vierde klieving) van eieren van *P. verticae*. Gegevens van bijeenhorende twee-, drie-, of viertallen zijn gemiddeld.

nr.	losse elem.	fragm.	evind. breuken	potent. br.	besch. chr.
I	$3\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	$1\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{3}{4}$
II	$3\frac{1}{4}$	$\frac{3}{4}$	$1\frac{1}{4}$	0	$1\frac{1}{4}$
III	6	$3\frac{1}{2}$	$4\frac{1}{2}$	$1\frac{3}{4}$	$2\frac{3}{4}$
IV	3	0	0	0	0
V	5	3	3	0	2
VI	3	0	0	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$
VII	$3\frac{1}{4}$	$\frac{1}{2}$	1	$\frac{1}{2}$	1
VIII	3	$\frac{1}{2}$	1	0	1
IX	4	$1\frac{1}{4}$	2	$1\frac{3}{4}$	$2\frac{1}{2}$
X	3	1	1	1	2
XII	$3\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	1	$1\frac{1}{2}$	2
XIII	$4\frac{3}{4}$	$1\frac{3}{4}$	2	0	$1\frac{3}{4}$
XIV	3	0	0	0	0
XV	4	1	$1\frac{1}{2}$	1	2
XVI	$3\frac{2}{3}$	1	1	0	1
XVII	4	1	1	0	1
XIX	4	1	1	$\frac{1}{3}$	$1\frac{1}{3}$
XX	4	2	2	1	3
gemiddeld:	3,77	1,07	1,32	0,53	1,44

