

D554

KARYOTYPISCHE VERANDERINGEN IN WEEFSEL- EN CELKWEKEN

VAN DE AARDAPPEL, SOLANUM TUBEROSUM.

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

ANS HERMELINK

Laboratorium voor Cel-
en Plantengenetica,
Haren, juli, 1984.

INHOUD

	<u>pagina</u>
SAMENVATTING	I
INLEIDING	3
MATERIAAL EN METHODEN	6
RESULTATEN	II
1. Karyologische waarnemingen aan Giemsa-gekleurde preparaten	II
2. Cytofotometrische waarnemingen aan Feulgen-gekleurde preparaten	18
3. Samenvatting resultaten	21
DISKUSSIE	25
1. Eigen resultaten	25
2. Bespreking literatuur	30
3. Vergelijking tussen eigen resultaten en de literatuur	33
4. Suggesties voor verder onderzoek	33
LITERATUUR	36
FOTO'S (figuren 2 t/m 13)	41

SAMENVATTING

Verbetering van kwaliteit, opbrengst en resistentie van bestaande cultuurgewassen kan mogelijk bereikt worden met behulp van somatische hybridisatie. Bij deze techniek wordt vaak gebruik gemaakt van protoplasten uit celsuspensies. Het is een bekend gegeven, dat in weefsel- en celkweken veranderingen in chromosoomaantallen en chromosoomstructuur kunnen optreden. Van veel planten zijn de weefsel- en celkweken reeds onderzocht op genoomafwijkingen, maar van de aardappel, *Solanum tuberosum*, is hierover nauwelijks iets bekend. Informatie hierover is wel noodzakelijk, omdat de genetica van de aardappel onderzocht gaan worden met behulp van somatische hybridisatie.

Het doel van dit onderzoek was een indruk te krijgen van
1 de aard en de frequenties van de afwijkingen,
2 de veranderingen in een celsuspensie in de loop van de tijd,
3 de verschillen tussen jonge celsuspensies van enkele weken tot enkele maanden en een oude celsuspensie van een jaar oud, en
4 de mogelijke oorzaken van de afwijkingen.

Onderzocht werden calli en celsuspensies van de dihaploïde cellijn 007 ($2n = 24$) van *S. tuberosum*. Op bepaalde tijden werden monsters genomen, waarvan preparaten werden gemaakt. Deze preparaten werden gescoord op afwijkingen aan zowel delende als niet-delende kernen. Bovendien werden cytofotometrische DNA-bepalingen verricht.

Gebleden is, dat de calli aanzienlijke afwijkingen in chromosoomaantallen hadden, die al in het begin van de kweek moeten zijn ontstaan. Deze afwijkingen namen toe in de loop van de tijd. Ook de celsuspensies vertoonden onmiddellijk na de eerste delingen in de schudcultures aantalsafwijkingen, die in het begin minder frequent waren dan in de calli, waaruit de suspensies waren gemaakt. De percentages "aantalsafwijkingen" namen snel toe tot waargenomen maxima van 30 tot 60%. De percentages "eliminatiemechanismen" schommelden bij de jonge suspensies tussen de 5 en 13%. Strukturele chromosoomafwijkingen ontstonden pas op het moment, dat het percentage "aantalsveranderingen" zich gestabiliseerd had. Uiteindelijk had 30%

van de cellen in mitose structurele chromosoomafwijkingen. De oude celsuspensie leek zich gestabiliseerd te hebben. Bijna alle kernen waren gepolyploidiseerd, eliminatiemechanismen kwamen bij I2 tot 20% van de mitotische cellen voor. Structurele afwijkingen aan chromosomen werden regelmatig gezien en ongeveer de helft van alle anafasen en telofasen had bruggen.

De oorzaken van de genoomafwijkingen in de calli kunnen gelegen zijn in milieu-omstandigheden, het uitgangsmateriaal (blad), het feit dat het blad geknipt was en het feit dat de bladcellen moesten dedifferentieren om het callus te kunnen vormen. De aantalsveranderingen van chromosomen in de celsuspensies waren waarschijnlijk voor een deel overgenomen uit de calli en voor een ander deel geïnduceerd door factoren als verlies van onderling contact tussen cellen, toxische stoffen in het medium, gebrek aan bepaalde stoffen als bijvoorbeeld mineralen en andere, voor de cellen vreemde, milieu-omstandigheden. Al deze factoren leidden in de eerste weken van de celkweek waarschijnlijk tot defekten in vorm en functie van de spoelfiguren. Waarom later pas de structurele chromosoomafwijkingen optraden is niet duidelijk.

Om meer informatie te verkrijgen over de oorzaken van de karyotypische afwijkingen in celsuspensies is het noodzakelijk de milieu-omstandigheden zo veel mogelijk konstant te houden en de suspensies vanaf het begin te vervolgen en ook het uitgangsmateriaal te onderzoeken. Het kweken van een enkele cel in een microcultuurkamertje kan met name leiden tot meer inzicht in het tijdstip, waarop abnormaliteiten ontstaan. Verder kan door middel van een soort eliminatieproces misschien achterhaald worden welke milieufactor tot welke afwijking in het genoom leidt.

Voor fusie-experimenten is het aan te bevelen celsuspensies van jong callus te maken en die celsuspensies zo snel mogelijk te gaan gebruiken.

INLEIDING

Verbetering van kwaliteit, opbrengst en resistentie tegen ziekten van bestaande cultuurgewassen kan bereikt worden door middel van sexuele hybridisatie, dat wil zeggen kruisen, van planten. Aan deze methode kleven echter enkele nadelen. Veel plantensoorten zijn bijvoorbeeld sexueel incompatibel, zodat sexuele hybridisatie meestal beperkt blijft tot planten van één soort of sterk verwante soorten. Bovendien is de generatietijd van planten erg lang (Bajaj, 1974; Linskens, 1977; Schieder et al., 1980; Adachi et al., 1982).

Om deze problemen te omzeilen werd gezocht naar nieuwe methoden voor de plantenveredeling. Een van de nieuwste methoden is de somatische hybridisatie. Dit houdt in, dat somatische cellen in vitro worden gefuseerd tot levensvatbare hybride cellen. Bij plantenmateriaal worden in plaats van cellen protoplasten gebruikt, omdat celwanden een barrière vormen voor de fusie van cellen. Bij fusie tussen protoplasten van genetisch verschillende planten ontstaat eerst een heterokaryon, dat wil zeggen dat de kernen van beide oudercellen zich in één plasma bevinden. Door synchrone kerndeling worden twee dochterkernen gevormd met de chromosomen van de oudercellen in elke kern. Dit is dan de hybride cel (synkaryon), die door regeneratie een hybride plant op kan leveren. Een groot voordeel van somatische hybridisatie is, dat problemen als lange generatietijd en sexuele incompatibiliteit overwonnen kunnen worden (Schilperoort, 1977).

Protoplasten worden in het algemeen geïsoleerd uit blad, maar ook uit callus en celsuspensies. Callus is een ongeorganiseerde woekering van ongedifferentieerde cellen, die onder andere kan groeien uit weefselstukjes van een plant, die uitgelegd zijn op een agarbodem met voedingsoplossing.

Het werken met protoplasten uit callus en celsuspensies biedt enkele voordelen boven het werken met protoplasten uit blad. In de eerste plaats zijn bepaalde kenmerken, die gebruikt worden om na de fusie de hybride cellen uit de niet-gehybrideerde cellen te selekteren, wel aanwezig in callus, maar niet

in de intakte plant. Bij het gebruik van protoplasten uit blad wordt het selekteren van hybride cellen uit de grote massa niet-hybride cellen dus veel moeilijker. De tweede reden is, dat de fysiologie van cellen in calli en celsuspensies beter te standaardiseren is dan van cellen in een intakte plant, vooral omdat in het laatste geval een cel beïnvloed wordt door vele andere gedifferentieerde cellen. Bovendien dragen planten vaak pathogenen bij zich, die moeilijk zijn te verwijderen (Opatrny et al., 1980; Vries, 1983a). Vandaar dat bij de somatische hybridisatie veel gewerkt wordt met callus en celsuspensies. Maar ook deze in vitro cultures hebben hun nadelen. Het is bijvoorbeeld een bekend verschijnsel, dat cellen in weefsel- en celkweek aanleiding geven tot veranderingen van het aantal chromosomen en de chromosoomstructuur.

De meest waargenomen verandering is toename in het ploidy-nivo. Hoe ouder de kweek en hoe meer veranderingen er in de nucleï hebben plaats gevonden, des te moeilijker wordt het om uit de kweek nog planten te regenereren (Schilperoort, 1977; Street, 1977; Sunderland, 1977; Skirvin, 1978; Bayliss, 1980; Kibler et al., 1980; Jacobsen et al., 1983).

Aantalsveranderingen kunnen ontstaan door restitutie, endomitose, endoreduplicatie, kernfusie en het uitblijven van de cytokinese met daarop volgend een synchrone kerndeling. Deze processen leiden alle tot polyploidy. Aneuploidy kan ontstaan door eliminatie van chromosomen ten gevolge van lagging, non-disjunction van chromatiden en multipolaire spoelfiguren. Verder kan amitose leiden tot een afname van het DNA-gehalte in de kern (Rieger et al., 1976; Sunderland, 1977; Pijnacker, 1984/1985). Bij al deze processen verandert wel de totale hoeveelheid DNA per nucleus, maar niet de hoeveelheid DNA per chromosoom.

Breuken in chromosomen kunnen leiden tot structurele veranderingen en verlies van genetisch materiaal. Lengteveranderingen van de chromosomen ontstaan ten gevolge van translocaties, indien de segmenten die transloceren verschillend lang zijn, ten gevolge van deleties en duplicaties. Inversies geven wel aanleiding tot structuurveranderingen, maar niet tot

lengteveranderingen van chromosomen. Deleties, duplicaties en inversies leiden niet tot aantalsveranderingen. Translocaties kunnen wel leiden tot andere chromosoomaantallen, wanneer er dicentrische chromosomen worden gevormd, bij Robertsoniaanse fusies, centrische splijting (centric fission) en soms bij de vorming van ringchromosomen (Rieger et al., 1976; Sunderland, 1977; Schulz-Schaeffer, 1980; Pijnacker, 1984/1985).

De veranderingen in chromosoomcomplementen zijn onderzocht in weefsel- en celkweken van verschillende planten (Bayliss, 1980). De veranderingen zijn echter nog weinig onderzocht aan de aardappel, *Solanum tuberosum* (Jacobsen et al., 1983). Informatie hierover is echter wel noodzakelijk, omdat de genetica van de aardappel onderzocht gaat worden met behulp van somatische hybridisatie en daarbij gebruik gemaakt wordt van protoplasten uit celsuspensies. Daarom is in dit onderzoek geprobeerd een inventarisatie te maken van de structuur- en aantalsveranderingen van chromosomen, die optreden in de cellen van calli en celsuspensies van *S. tuberosum*.

Het doel was een indruk te krijgen van :

- 1 de aard en de frequenties van de afwijkingen in chromosoomaantallen en chromosoomstructuur,
- 2 de veranderingen in een celsuspensie in de loop van de tijd,
- 3 de verschillen tussen jonge celsuspensies (enkele weken tot enkele maanden) en een oude celsuspensie (een jaar oud),
- 4 de mogelijke oorzaken van de afwijkingen.

MATERIAAL EN METHODEN

Onderzocht werden calli en celsuspensies van *Solanum tuberosum*, cellijn 007 (= H²578), zoals weergegeven in tabel I. Deze cellijn is dihaploid met $2n = 24$.

De calli ontstonden uit stukjes blad, die uitgelegd waren op een vaste agarbodem met een voedingsoplossing. De voedingsoplossing was van Murashige en Skoog, waaraan groeihormonen waren toegevoegd en wel 5,0 mg/l. NAA (α -naftaleenazijnzuur) en 0,1 mg/l. BAP (6-benzylaminopurine). Dit voedingsmedium wordt M308 genoemd. De calli werden één keer per maand overgeënt op een verse voedingsbodem. (Vries, 1983b).

Celsuspensies werden gemaakt door calli in schudcultuur met vloeibaar medium over te brengen. Het voortdurend schudden doet het callus uit elkaar vallen. Het vloeibare medium bestond uit M308 met uitzondering van celsuspensie 6, die eerst 7 maanden op M238 (Vries, 1983b) werd gekweekt, daarna eveneens op M308. De celsuspensies werden twee keer per week overgeënt. Zowel de calli als de celsuspensies werden in het donker gekweekt bij een temperatuur van 25°C.

Voor het maken van mikroskopische preparaten werden de monsters als volgt behandeld:

- 1 Al dan niet voorbehandelen met mitoseremmers als 8-hydroxychinoline (8Hch) of α -broomnaftaleen (α BN). Mitoseremmers verhinderen de vorming van de spoelfiguur, zodat de chromosomen niet in het equatoriale vlak gaan liggen, maar zich juist verspreiden over de cel. Er vindt tevens ophoping van metafasen plaats. Dergelijke "C-metafasen" zijn noodzakelijk om exakte chromosoomtellingen te verrichten (Pera, 1970; Sunderland, 1977; Davidson et al., 1983).
8Hch; 0,002 M, behandeling ongeveer 2 uur bij kamertemperatuur (KT).
 α BN; verzadigde oplossing, behandeling 4-5 uur, eveneens bij KT.
- 2 Centrifugereren 5 min. 150 g en medium afpipetteren.
Bij het callus werden de eerste en tweede stap overgeslagen.
Die monsters werden direkt gefixeerd (stap 3).
- 3 Wassen met het fixatiemiddel, d.w.z. koude Carnoy (ethanol; ijsazijn = 3:1) toevoegen en de cellen suspenderen. Centrifu-

- geren 5 min. 150 g en Carnoy afpipetteren.
- 4 Fixeren vervolgen in Carnoy (4°C, minimaal 30 min.).
 - 5 Centrifugeren 5 min. 150 g en Carnoy afpipetteren.
 - 6 Wassen in demiwater (als bij 3).
 - 7 Macereren in enzymoplossing (60-120 min., 37°C). De enzymoplossing bestond uit 10% pectinase (v/v) en 1,5% cellulase (w/v) in citraatbuffer. 100 ml. citraatbuffer bestond uit 23 ml. 0,1 M citroenzuur, 27 ml. 0,1 M natriumcitraat en 50 ml. demiwater. De pH van de citraatbuffer was 4,8.
 - 8 Centrifugeren 5 min. 150 g en de enzymoplossing afpipetteren.
 - 9 Twee keer wassen in demiwater of Carnoy (als bij 3).

- Van de gefixeerde en gemacereerde monsters werden vervolgens spreidpreparaten gemaakt:
- I0 Een druppel van het monster op een, met alcohol schoongemaakt, objektglaasje brengen.
 - II Eén tot enkele druppels 60% azijnzuur toevoegen.
 - I2 Het objektglaasje met de cellen kort verwarmen boven een alcoholvlam.
 - I3 Na afkoelen koude Carnoy om de druppel met cellen aanbrengen, dan een beetje Carnoy op de cellen brengen.
 - I4 Cellen een beetje verspreiden en het objektglaasje aan de lucht laten drogen.
- (Pijnacker en Ferwerda, 1984).

Op de aldus verkregen preparaten werden òf een Giemsa-kleuring òf een Feulgenkleuring verricht.

Giemsakleuring:

- 2 x SSC 30 min. 60°C (2 x SSC bevatte per liter 17,55 gram 0,3 M NaCl en 8,82 gram 0,03 M natriumcitraat).
 - Kort spoelen in demiwater.
 - 30 min. 3% Giemsa-oplossing bij KT.
- De Giemsa-oplossing bestond uit: 3 ml. Giemsa (Merck) bij 100 ml. Sørensenbuffer. Sørensenbuffer bestond uit 55 ml. Na₂HPO₄-oplossing (11,876 gr/l.) en 45 ml. KH₂PO₄-oplossing (9,078 gr/l.). pH = 6,9.
- Spoelen in Sørensenbuffer.
 - Spoelen in demiwater.
 - Drogen aan de lucht.
 - Xylol, insluiten met DePeX.

Feulgenkleuring:

- Preparaten naxifexen in mengsel van 85 ml. ethanol 100%, 10 ml. formaldehyde 40% en 5 ml. azijnzuur 100%. 30 min. bij KT.
- Spoelen in demiwater.
- Hydrolyseren in 5 N HCl. 20 min. bij KT.
- Spoelen in demiwater.
- Pararosaniline 2 uur bij 4°C in het donker. De pararosaniline-oplossing bestond uit: 1,0 gram pararosaniline, opgelost in 30 ml. 1 N HCl, en 1,0 gram $K_2S_2O_5$, opgelost in 170 ml. demiwater. 24 Uur na het bijeenvoegen van deze stoffen werd 600 mg. Norit toegevoegd. Na flink schudden (2 min.) werd de kleurstof gefiltreerd.
- Spoelen in stromend leidingwater gedurende 10 min. of in sulfietwater (2 gram $K_2S_2O_5$ in 400 ml. demiwater en 20 ml. 1 N HCl) gedurende 3 x 10 min.
- Drogen aan de lucht.
- Xylol en insluiten met DePeX.

Giemsa-gekleurde preparaten werden gebruikt voor het scoren van chromosoomafwijkingen aan zowel delende als niet-delende cellen; Feulgen-gekleurde preparaten werden gebruikt voor cytofotometrische DNA-bepalingen. De absorptie van de kernen bij 558 nm. werd bepaald met behulp van een Zeiss MPM 01 mikroskoop-fotometer, waarbij een bepaald gebied wordt afgescand met op onderling regelmatige afstanden absorptiemetingen. Er werd gemeten met stappen van $0,5 \mu$ en een lichtbeperkend diafragma (Jacobsen et al., 1983).

TABEL I: Onderzocht materiaal van de dihaploide cellijn 007 van *Solanum tuberosum* ($2n = 24$).

MATERIAAL	LEEFTIJD OP MOMENT VAN MONSTERNAME	KLEURING	DNA-METINGEN
CALLUS I, ontstaan uit stukjes blad, uitgelegd op een agar-voedingsbodem op 16-12-1983.	2 maanden	Giemsa (G)	-
	6 maanden	Giemsa en Feulgen (G + F)	+
CALLUS 2, ontstaan uit stukjes blad, uitgelegd op een agar-voedingsbodem op 20-12-1983.	2 maanden	G	-
	6 maanden	G + F	+
CELSUSPENSIE I, ontstaan uit het 2 maanden oude callus I. <i>(op 20-2-1984)</i>	1,5 week	G	- 2-3
	3 weken	G	- 12-3
	4 weken	G	- 20-3
	5 weken	G + F	+ 24-3
	7 weken	G	- 36-3
	8 weken	G	- 12-4
	11 weken	F	+ 19-4
	12 weken	G	- 9-5
	13 weken (a)	G	- 14-5
CELSUSPENSIE 2, ontstaan uit het 2 maanden oude callus 2.	1,5 week	G	-
	3 weken	G	-
	4 weken	G	-
	5 weken	G + F	+
	7 weken	G	-
	11 weken (a)	F	+
CELSUSPENSIE 3, ontstaan uit het 5 maanden oude callus I.	4 weken (b)	G + F	+
CELSUSPENSIE 4, ontstaan uit het 5 maanden oude callus 2.	4 weken (b)	G + F	+

↓ datums van monstername.
↓ soort prep / kleuring
↓ dagen

4	11
5	21
6	29
7	36
8	39
9	42
10	49
12	57
13	64
14	74

(vervolg TABEL I)

MATERIAAL	LEEFTIJD OP MOMENT VAN MONSTERNAME	KLEURING	DNA-METINGEN
CELSUSPENSIE 5, ontstaan uit het 6 maanden oude callus I.	2,5 week	G + F	+
CELSUSPENSIE 6, ontstaan uit ander callus dan de calli I en 2, maar wel afkomstig van de cellijn 007.	IO maanden II maanden I2 maanden I3,5 maand I4 maanden	G G G G + F G + F	- - - + +

(a) ; Rond de II^e week gingen de celsuspensies I en 2 erg slecht groeien. Omdat er tevens infectie ontstond was verder onderzoek aan deze celsuspensies niet mogelijk.

(b) ; Deze celsuspensies groeiden slecht.

RESULTATEN

I. Karyologische waarnemingen aan Giemsa-gekleurde preparaten.

De resultaten, betreffende de afwijkingen in de celsuspensies zijn weergegeven in frequentietabellen (tabellen 2 en 3) en een grafiek (figuur I). De resultaten van enkele monsters zijn niet in de tabellen opgenomen, omdat de mitotische index zo laag was, dat frequentiebepalingen niet mogelijk waren. Deze monsters zijn: De calli I en 2 (beide monsters), de celsuspensies 3 en 4, de monsters van 5 weken van de celsuspensies I en 2 en het monster van 13,5 maand van celsuspensie 6.

Callus I

De aard van de afwijkingen bestond in beide monsters voornamelijk uit polyploidy en aneuploidy; lagging chromosomen en meerpolige spoelfiguren werden slechts sporadisch aangetroffen. Bruggen in anafase en telofase werden niet waargenomen. Micronuclei werden eveneens sporadisch gevonden, terwijl multinucleaire cellen erg veel voorkwamen (figuur 2).

De chromosoomaantallen varieerden na 2 maanden van ongeveer 20 tot 200. Na 6 maanden waren deze aantallen ongeveer gelijk, maar nu werden ook haploide cellen gezien, alsmede een cel met naar schatting 800 tot 1000 chromosomen.

Na 2 maanden was ongeveer 30% van alle mitosen abnormal, gebaseerd op 98 cellen. Beoordeeld werden alle stadia van de mitose, waarbij ook aantalsveranderingen van chromosomen als abnormal werden beschouwd. Na 6 maanden was het percentage abnormale mitosen 50%, gebaseerd op 43 cellen. Dit impliceert een toename van het aantal abnormaliteiten in het callus in de loop van de tijd.

Callus 2

De aard van de afwijkingen waren in beide monsters dezelfde als bij callus I. Alleen werden bij het 6 maanden oude callus enkele keren bruggen in anafase en telofase gezien. De micronuclei en multinucleaire cellen werden ook in dit callus gevonden.

Ook de chromosoomaantallen varieerden als bij callus I.

De aantallen liepen dus uiteen van ongeveer 20 tot 200 na 2 maanden en van 12 tot 200 na 6 maanden.

Het percentage abnormale mitosen bedroeg zowel na 2 maanden als na 6 maanden 50%, gebaseerd op respectievelijk 104 cellen en 32 cellen. Een verandering in de tijd was aan dit callus dus niet waar te nemen.

Celsuspensie I

In alle monsters waren multinucleaire cellen, vooral 2-kernige cellen, vrij algemeen, evenals haltervormige kernen. Ook micronuclei waren in vrijwel alle monsters aanwezig, maar de frequentie was lager dan 1% (figuur 3); alleen in het eerste monster van 1,5 week werden geen micronuclei gevonden.

De meest gevonden afwijkingen lagen bij de aantalsveranderingen. Zowel een toename in aantal tot meer dan 100 chromosomen (inhoudende polyploide en aneuploide cellen) als een afname in chromosoomaantallen tot het haploide nivo (inhoudende haploide en aneuploide cellen) kwamen voor. Figuur 4 toont het verschil tussen hoog-polyploide en laag-ploide kernen.

Getuige tabel 2 en figuur I nam het percentage "aantalsveranderingen" snel toe binnen een paar weken na het begin van de kweek. Op een leeftijd van 4 weken was het percentage het hoogst; daarna nam het weer iets af tot een min of meer stabiel nivo. Op het moment, dat het stabiele nivo bereikt was (na 7 weken), traden voor het eerst structurele chromosoomafwijkingen op. Het percentage nam heel snel toe tot ongeveer 30%. Het percentage "eliminatiemechanismen" bleef ongeveer konstant. Toch leek dit percentage omgekeerd evenredig te zijn met het percentage "aantalsveranderingen". Vooral bij suspensie I was dat opvallend. Uit tabel 2 bleek verder, dat afname van het chromosoomaantal pas een rol ging spelen na 4 weken. Het was voor een groot deel verantwoordelijk voor de stijging in het percentage "aantalsveranderingen".

Vanaf de 8^e week kwamen cellen met meer dan 100 chromosomen steeds minder vaak voor. Na 12 weken waren aantallen van rond de 60 en 40 het meest voorkomend, met daarnaast vrij veel kernen met ongeveer 24 of 12-15 chromosomen.

Figuur 5 geeft een voorbeeld van een mitotische cel met een meerpolige spoelfiguur.

Celsuspensie 2

Alles wat gevonden werd bij suspensie I gold ook in meer of mindere mate voor suspensie 2. De aantalsveranderingen vormden de belangrijkste afwijkingen. De percentages lagen zelfs nog hoger dan bij suspensie I (tabel 2 en figuur I). En eveneens was het percentage "afname in chromosoomaantallen" verantwoordelijk voor de stijging in aantalsveranderingen. Strukturele chromosoomafwijkingen waren er in het geheel niet en het percentage "eliminatiemechanismen" bleef ongeveer konstant op een iets lager nivo dan bij suspensie I.

De chrososoomaantallen varieerden van ongeveer 12 tot ver boven de 100 (figuren 6 en 7). De indruk ontstond, dat de hoog-polyploide kernen meer voorkwamen bij deze celsuspensie dan bij suspensie I.

Celsuspensie 3

Deze celsuspensie groeide slecht. Mede in verband daarmee was de mitotische index zo laag, dat er niet op afwijkende mitosen gescoord kon worden. Er valt alleen te zeggen, dat er veel polyploidy was. DNA-metingen konden wel verricht worden (pagina 20).

Celsuspensie 4

Ook deze celsuspensie groeide slecht en de mitotische index was dan ook nagenoeg 0%. De enkele mitosen, die toch gevonden werden, waren polyploid. De DNA-gehalten zijn wel bepaald (pagina 20).

Celsuspensie 5

In deze jonge celsuspensie waren de aantalsveranderingen al aanzienlijk (tabel 2 en figuur I). Niet minder dan 61% van de kernen had meer of minder dan 24 chromosomen. Ook het percentage "eliminatiemechanismen" lag hoger dan bij de celsuspensies I en 2. Vooral lagging van chromosomen kwam veel voor (figuur 8). Strukturele chromosoomafwijkingen werden niet gevonden.

Opvallend was de grote variatie in kerndiameter. Haltervormige kernen en multinucleaire cellen waren vrij algemeen

en ook micronuclei werden sporadisch gevonden in een frequentie lager dan 1%. Een enkele keer werden vreemd gevormde interfasekernen waargenomen, die duiden op òf een multipolaire spoelfiguur òf een fusie van kernen (figuur 9).

Celsuspensie 6

In alle monsters was de situatie min of meer gelijk (tabel 3). Het percentage "aantalsveranderingen" was extreem hoog; het varieerde van 83 tot 94%. Dit kwam geheel voor rekening van de toename in chromosoomaantallen. Afname in aantallen kwam zo goed als niet voor. De chromosoomaantallen bleven meestal onder de 100, maar cellen met 150 tot 160 chromosomen kwamen ook voor.

Eliminatiemechanismen en structurele chromosoomafwijkingen waren erg frequent (tabel 3), vooral lagging van chromosomen en brugvorming in anafase en telofase (figuur 10). Verder werden alleen in deze celsuspensie structurele afwijkingen aan de chromosomen zelf waargenomen. Deze afwijkingen betroffen dicentrische chromosomen, deleties, fragmenten en NOR-chromosomen (nucleolus organiser chromosomen) met afwijkingen in het gedeelte tussen het centromeer en de secundaire constrictie (figuren 11 en 12).

Multinucleaire cellen en haltervormige kernen waren talrijk en ook micronuclei werden veel waargenomen.

In alle calli en celsuspensies werden sporadisch vreemd gevormde interfasekernen aangetroffen, waarbij de kern met "knopvorming" het meeste voorkwam (figuur 13). Ook werden in veel preparaten soms erg mooi gespreide metafaseplaten aangetroffen zonder dat er een mitoseremmer was gebruikt. De plaat leek vaak op een C-mitose.

De mitoseremmers 8Hch en α BN hadden onvoldoende werking om exakte chromosoomtellingen te kunnen doen. In alle gevallen had de spoelfiguur zich vaak wel gevormd òf de chromosomen lagen op elkaar, zodat ze niet geteld konden worden.

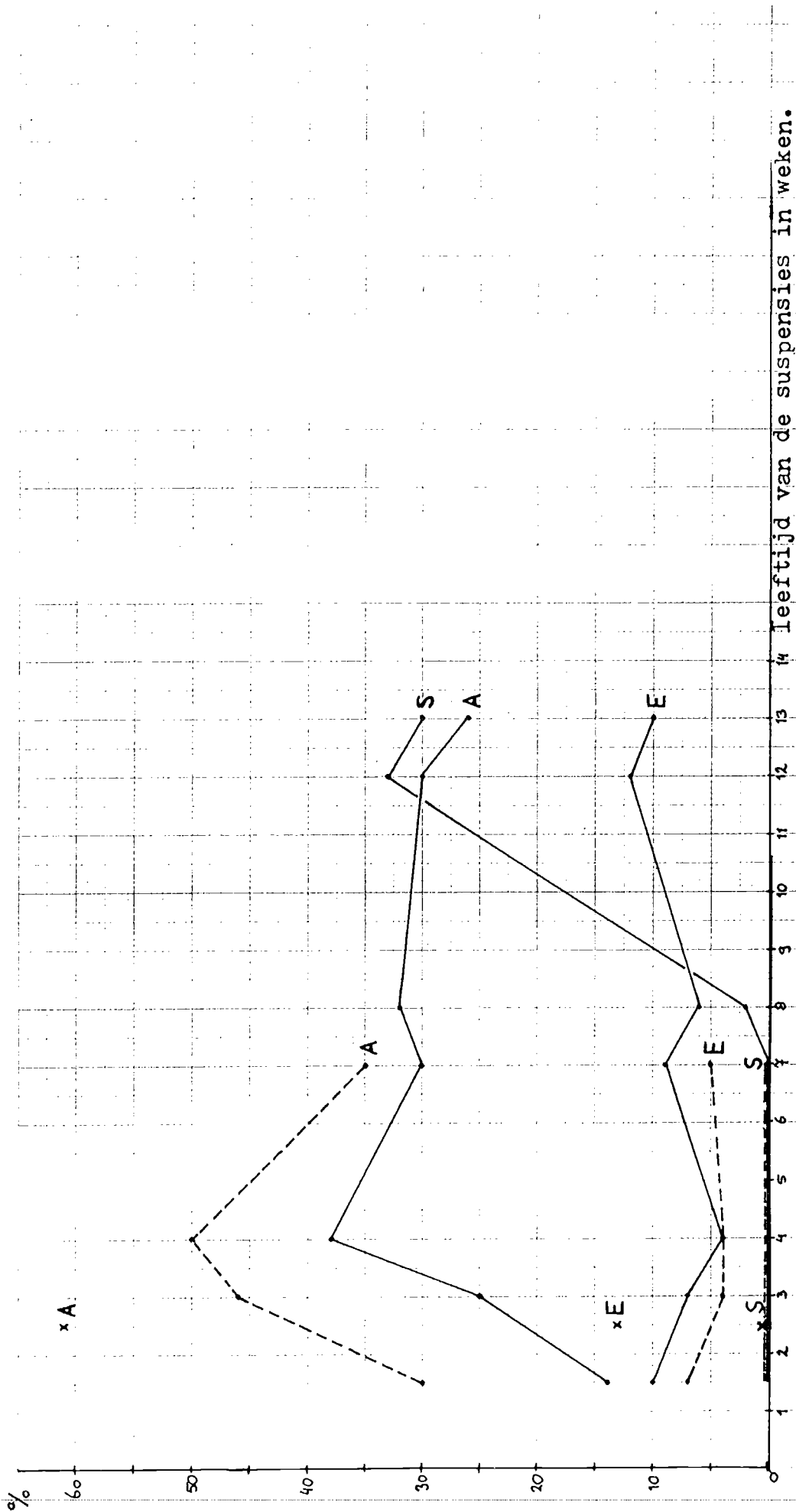
TABEL 2: Percentages afwijkingen in de chromosoomcomplementen in de celsuspensies I, 2 en 5 van de dihaploïde cellijn 007 van Solanum tuberosum. (...) = numerieke aantal kernen.

Suspensienummer en leeftijd	Aantalsveranderingen (in % van het totaal aantal mitosen)			Eliminatiemechanismen (in % van het totaal aantal mitosen)			Strukturele chromosoomafwijkingen	
	>24 chr.	10-24 chr.	Totaal	Lagging chr.	Meer- polige spoelen	Totaal	Strukturele af- wijkingen direkt aan de chromosomen (in % van het totaal aan- tal mitosen)	
							Bruggen in ana- fase/telofase (in % van het totaal aan ana- fasen/telofasen)	waargenomen (in % van het totaal aan- tal mitosen)
I - 1,5 week 3 weken 4 weken 7 weken 8 weken 12 weken 13 weken	11	3	14 (14)	7	3	10 (10)	0	0
	25	0	25 (50)	7	0	7 (15)	0	0
	25	13	38 (59)	4	0	4 (7)	0	0
	17	13	30 (39)	4	5	9 (12)	0	0
	16	16	32 (32)	2	4	6 (6)	0	0
2 - 1,5 week 3 weken 4 weken 7 weken	21	9	30 (28)	7	4	12 (11)	2 (2)	0
	19	7	26 (26)	7	3	10 (10)	33 (9)	0
5 - 2,5 week	30	0	30 (24)	2	5	7 (6)	0	0
	46	0	46 (63)	4	0	4 (5)	0	0
	25	25	50 (21)	0	4	4 (3)	0	0
	25	10	35 (54)	3	2	5 (7)	0	0
	52	9	61 (46)	11	2	13 (12)	0	0

TABEL 3: Percentages afwijkingen in de chroomcomplementen in de celsuspensie 6 van de dihaploïde cellijn 007 van Solanum tuberosum. (...) = numerieke aantal kernen.

Suspensienummer en leeftijd	Aantalsveranderingen (in % van het totaal aantal mitosen)		Eliminatiemechanismen* (in % van het totaal aantal mitosen)		Strukturele chromosoomafwijkingen*		
	>24 chr.	I0-24 chr.	Lagging chr.	Meer- polige spoelen	Totaal	Bruggen in ana- fase/telofase (in % van het totaal aantal anafasen/telo- fasen)	Strukturele af- wijkingen, direkt aan de chromosomen waargenomen (in % van het totaal aan- tal mitosen)
6 - I0 maanden	94	0	I7	3	20 (26)	50 (5)	3 (4)
I1 maanden	92	0	I5	6	21 (15)	50 (6)	8 (6)
I2 maanden	80	3	6	6	I2 (38)	51 (25)	4 (II)
I4 maanden	90	0	II	3	I4 (I4)	58 (II)	0

*; alle kernen met lagging chromosomen, meerpolige spoelfiguren en strukturele chromosoomafwijkingen, inclusief de brugvorming in anafase en telofase, hadden meer dan 24 chromosomen.



FIGUUR I, De veranderingen in de tijd van de percentages "aantalsveranderingen" (A), "eliminatie-mechanismen" (E) en "structurele chromosoomafwijkingen" (S) in de celsuspensies I (getrokken lijn), 2 (onderbroken lijn) en 5 (x, slechts I waarneming) van Solanum tuberosum, cellijn 007.

2. Cytofotometrische waarnemingen aan Feulgen-gekleurde preparaten

De resultaten van de DNA-metingen zijn weergegeven in de figuren I4a ^t/m k.

Het maken van goede Feulgen-gekleurde preparaten van callus viel erg tegen. Vaak lagen celwandresten en andere celresten op of in de nabijheid van de kernen, zodat het erg moeilijk was vrijliggende kernen te vinden. Om voldoende aantal kernen te meten zijn ook kernen gemeten, die een lichte verontreiniging van celresten vertoonden. De resultaten van de calli zijn dan ook minder exakt dan die van de celsuspensies.

De verwachting was, dat in elk callus en elke celsuspensie een aantal absorptiewaarden veel aanwezig waren (de zogenaamde pieken in de histogrammen) met daartussenin enkele kernen, die in de DNA-synthese-fase konden zijn. Wanneer er veel kernen tussen de pieken in lagen werd er vanuit gegaan, dat deze kernen voor een groot deel aneuploid waren. Hoe veel meer kernen er tussen de pieken in lagen, des te groter was het percentage aneuploide kernen.

Callus I

In dit callus was de heel grote verdeling van de DNA-gehaltenes opvallend. Geen enkel ploidy-nivo was duidelijker dan een ander aanwezig. Er was dus veel aneuploidy. Omdat geen metafasen gemeten werden, kan ook niet met zekerheid gezegd worden, wat bijvoorbeeld het IC- of 2C-nivo was. Maar volgens Jacobsen et al. (1983), die ook callus van de cellijn 007 van *Solanum tuberosum* hebben doorgemeten, heeft een kern met IC aan genetisch materiaal een absorptie van ongeveer 8. 2C komt dan overeen met ongeveer I6, 4C met 32 etc. Dan blijkt uit figuur I4a, dat de meeste kernen (ongeveer 70%) in het traject van IC tot en met 9C lagen. De grootste kern met een absorptie van 59I heeft dus ongeveer 74C aan DNA bevat.

Callus 2

De verdeling van de DNA-gehaltenes was erg groot, evenals bij callus I. Er was dus veel aneuploidy. De meeste kernen (ongeveer 70%) lagen tussen IC en IOC. Het hoogste DNA-gehalte had een polyploide metafase met een absorptie van 348. Dit komt overeen met 43,5C; in de G_I-fase van de celcyclus is dit ongeveer 22C.

Uit de histogrammen van de celsuspensies (figuren I4c t/m k) werden gemiddelden en hun standaarddeviaties berekend van de pieken en het percentage kernen in die pieken (tabel 4) op het 2C-, 4C- en 8C-nivo. Bij drie celsuspensies lagen de pieken bij afwijkende absorptiewaarden, maar omdat de pieken een mooie geometrische reeks vormden (de gemiddelde absorptiewaarden verdubbelden telkens) werd ervan uitgegaan, dat ook deze pieken het 2C-, 4C- en 8C-nivo vertegenwoordigden. Door technische fouten, zoals minder goede hydrolyse van het DNA tijdens de kleuring, was de absorptie waarschijnlijk verminderd.

Celsuspensie I

Na 5 weken bleek de helft van de kernen 2C of 4C aan genetisch materiaal te bevatten. Verder had meer dan 10% van de kernen een DNA-hoeveelheid van 8C. Dus lag 35% van de kernen buiten een van de pieken; 13% daarvan lag boven het 8C-nivo, voor het grootste deel bij 16C. Van de kernen buiten de pieken zal een aantal in de DNA-synthese-fase geweest zijn, maar een groot deel zal ook aneuploid geweest zijn (pagina 18). Er waren enkele erg grote kernen, waarvan de grootste een absorptie had van 326, wat overeenkomt met ongeveer 40C.

Na 11 weken lag 78% van de kernen in één van de 2C-, 4C- of 8C-pieken. Dus was 22% aneuploid of was in de DNA-synthesefase of lag bij het 16C-nivo. Vooral de lagere ploidy-waarden werden talrijker; slechts 7% van de kernen had DNA-hoeveelheden van meer dan 8C.

Kernen op het haploïde nivo of daaronder waren, hoewel niet talrijk, in beide monsters aanwezig.

Celsuspensie 2

In deze celsuspensie was het ploidy-nivo gemiddeld hoger dan in celsuspensie I. Op een leeftijd van 5 weken bleken in suspensie 2 relatief meer kernen een DNA-hoeveelheid van 8C te hebben. Bovendien had 24% van de kernen meer dan 8C aan DNA, wat bijna het dubbele was van suspensie I. Verder werden ook extreem grote kernen gevonden met absorptiewaarden van 395, 409 en 509. Dit komt overeen met ongeveer 44C, 45C en 57C respectievelijk.

Toen de suspensie II weken oud was, waren de extreem grote kernen verdwenen. De grootste gemeten kern had een absorptie van 238, wat overeenkomt met ongeveer 26C. Bovendien lag nu slechts 4% van de kernen boven het 8C-nivo en 5% op het 8C-nivo. Bij de 5 weken oude suspensie was dit nog 19%. Ook het aantal kernen met DNA-hoeveelheden van 2C en 4C was veel groter dan bij de 6 weken jongere suspensie en de aneuploidy was afgenomen. Dus opnieuw bleek, dat kernen met hoge ploidy-nivo's evolueerden naar kernen met lagere ploidy-nivo's of werden uitgeselekteerd, zodat alleen kernen met lage ploidy-nivo's overbleven.

Celsuspensie 3

In deze celsuspensie waren de 4C- en 8C-nivo's het meest aanwezig; 2C-kernen waren er relatief weinig, evenals extreem grote kernen. De meeste kernen boven het 8C-nivo lagen bij het 16C-nivo. Ook aneuploidy was er niet veel (pagina 18).

Celsuspensie 4

Deze celsuspensie was veel heterogener dan de vorige, hoewel de gemiddelde DNA-hoeveelheden niet verschilden. Er waren nauwelijks pieken. Meer dan de helft van de kernen lag buiten de 2C-, 4C- en 8C-nivo's! Een opvallend feit was, dat er nog minder 2C-kernen waren dan in suspensie 3.

Celsuspensie 5

Deze, slechts 2,5 week oude, celsuspensie gaf absorptiepieken in een mooie geometrische reeks te zien van 2C naar 4C, 8C en 16C. Ongeveer 10% van de kernen had iets meer dan 4C of iets minder dan 8C aan genetisch materiaal, wat duidt op aneuploidy. Verder kwam aneuploidy weinig voor (pagina 18). 12% van de kernen had DNA-hoeveelheden van meer dan 8C. Het grootste deel daarvan lag bij 16C en slechts enkele kernen lagen daar nog boven.

Celsuspensie 6

Door waarschijnlijk technische fouten was de absorptie van de kernen in het monster van 13,5 maand minder dan in het monster van 14 maanden. Wanneer de pieken van het eerste histogram

iets naar rechts worden verschoven tot ze op dezelfde nivo's liggen als de pieken van het tweede histogram, dan blijken er nauwelijks verschillen te zijn tussen de twee monsters. In beide monsters kwamen kernen op het 2C-nivo niet of nauwelijks voor. Een micronucleus met een absorptie van 4 werd in beide monsters een keer gevonden. Meer dan de helft van de kernen lag op het 8C-nivo; de rest van de kernen lag bij 4C (ongeveer 25%) en 16C (ongeveer 5%). Veel aneuploidy was er niet (pagina 18) en kernen boven het 16C-nivo waren geheel afwezig, met uitzondering van twee kernen bij ongeveer 32C in het monster na 14 maanden.

3. Samenvatting resultaten

Uit zowel lichtmikroskopische als cytofotometrische waarnemingen is gebleken, dat de calli aanzienlijke afwijkingen in chromosoomaantallen hadden, die toenamen in de loop van de tijd. Deze afwijkingen werden ook gevonden in de celsuspensies, die van de calli werden gemaakt. Maar de frequenties van de aantalsafwijkingen in de heel jonge celsuspensies waren minder hoog dan in de calli. In de celsuspensies werden deze frequenties snel hoger tot een bepaald maximum na ongeveer 4 weken en namen dan weer af tot een enigszins stabiel nivo bereikt was. Op dat moment ontstonden voor het eerst structurele chromosoomafwijkingen, die in korte tijd zeer frequent werden. Eliminatiemechanismen als lagging chromosomen en meerpelige spoelfiguren waren continu in ongeveer even hoge frequenties aanwezig. Toch leek het percentage omgekeerd evenredig te zijn met het percentage "aantalsveranderingen".

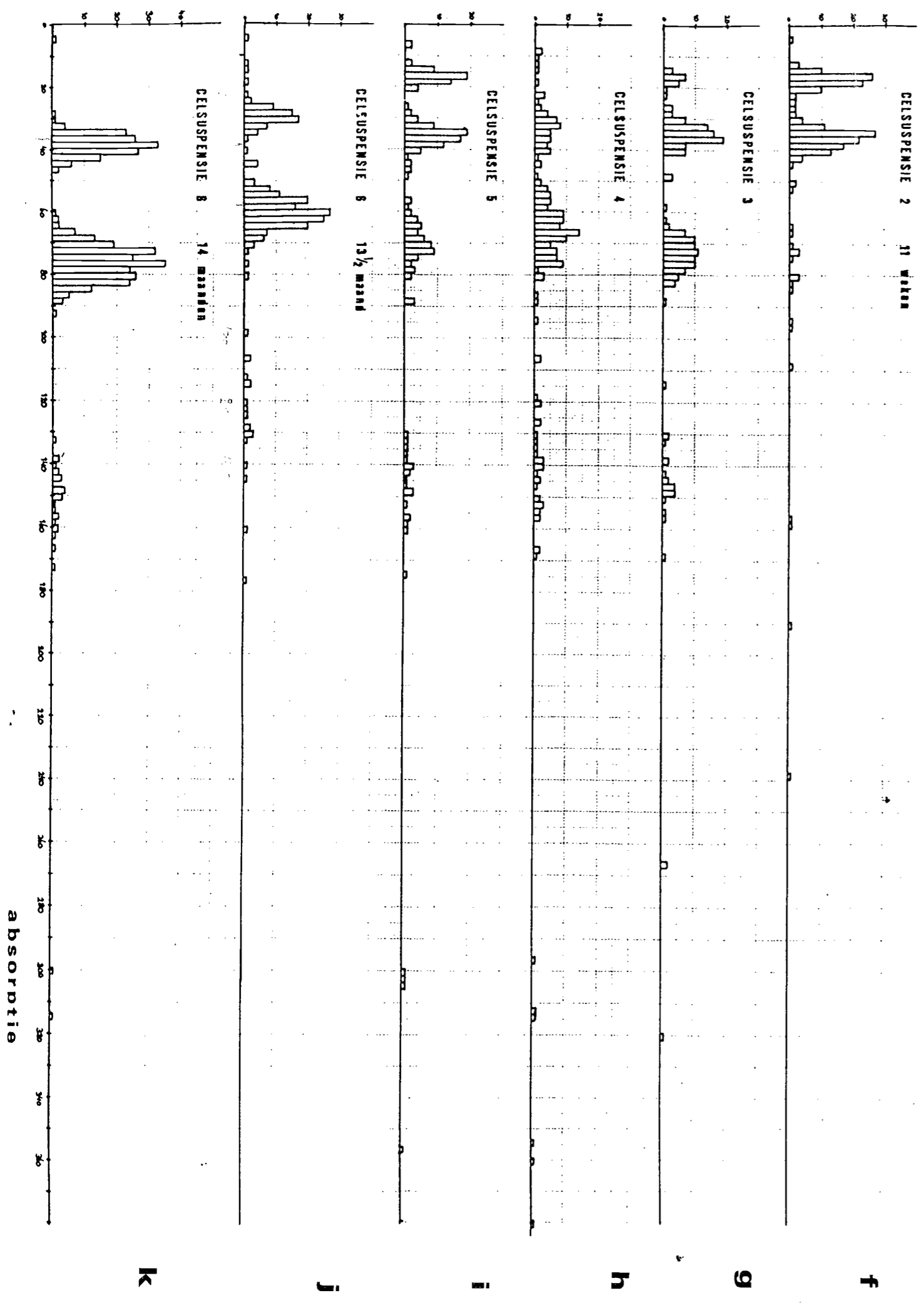
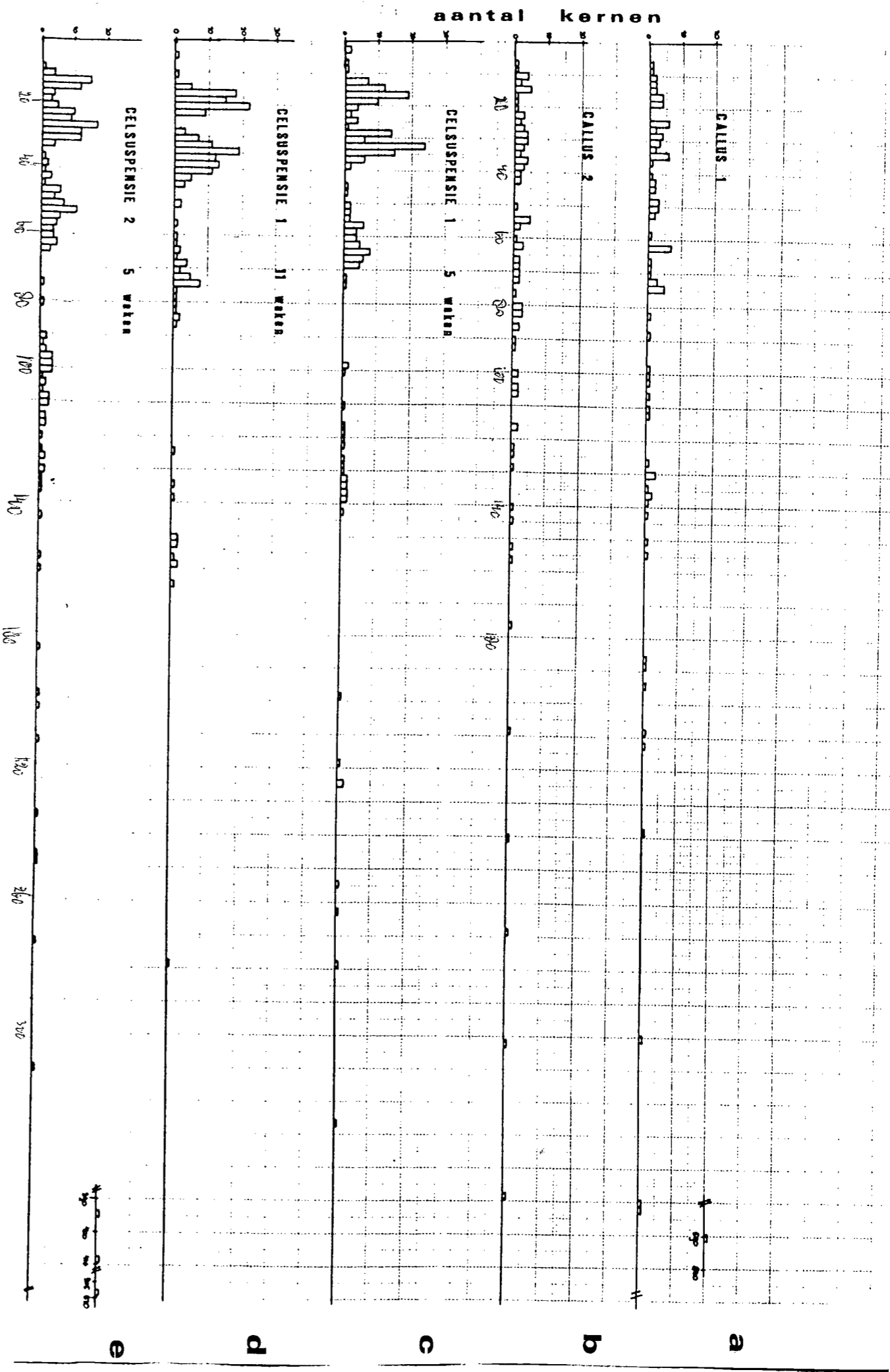
Celsuspensies van oudere calli vertoonden veel meer aantalsveranderingen dan celsuspensies van jongere calli. Vooral hogere ploidy-nivo's, zoals 8C, waren frequenter.

De suspensie van een jaar oud had zich gestabiliseerd. De aantalsveranderingen waren extreem; bijna alle kernen hadden DNA-hoeveelheden van 4C of 8C. Daarnaast was er nog een klein percentage kernen met 16C aan DNA, maar kernen met andere DNA-hoeveelheden kwamen niet of nauwelijks voor. Structurele chromosoomafwijkingen waren in deze celsuspensie zeer talrijk en bestonden

uit; dicentrische chromosomen, deleties, fragmenten en NOR-chromosomen (nucleolus organiser chromosomen) met afwijkingen in het gedeelte tussen het centromeer en de secundaire constrictie.

(pagina 23)

FIGUUR 14; DNA-absorptiewaarden van kernen in calli en celsuspensies van de dihaploide cellijn 007 van *Solanum tuberosum*. a ; callus 1, b ; callus 2, c ; celsuspensie 1 (5 weken oud), d ; celsuspensie 1 (II weken oud), e ; celsuspensie 2 (5 weken oud), f ; celsuspensie 2 (II weken oud), g ; celsuspensie 3, h ; celsuspensie 4, i ; celsuspensie 5, j ; celsuspensie 6 (I3,5 maand oud), k ; celsuspensie 6 (I4 maanden oud). De intervallen, ter grootte van 2, lopen van 1,5 tot 3,5 , van 3,5 tot 5,5 etc.



TABEL 4: Het aantal (n) en het percentage (%) kernen in de 2C-, 4C- en 8C-pieken van de histogrammen van figuur I4 en de gemiddelden (x.) en de standaarddeviaties (s) van deze pieken. De absorptie van de 2C-piek lag tussen de waarden I3,5 en 2I,5, de absorptie van de 4C-piek lag tussen de waarden 29,5 en 4I,5 en de absorptie van de 8C-piek lag tussen 65,5 en 83,5.*

Materiaal	Totaal aantal gemeten kernen	2C			4C			8C				
		n	%	x.	n	%	x.	n	%	x.		
Celsuspensie I, 5 weken	2I8	48	22	I5,8	67	3I	32,5	2,7	26	I2	66	3,0
Celsuspensie II weken	20I	60	30	I8,3	73	36	35,8	3,1	24	I2	73,3	3,9
Celsuspensie 2, 5 weken	236	35	I5	I3,4	64	27	27,1	3,0	45	I9	56,1	4,5
Celsuspensie II weken	200	69	35	I7,5	94	47	36,1	2,7	I0	5	75,3	5,2
Celsuspensie 3	200	I6	8	I7	7I	36	35,3	2,9	74	37	73,6	4,6
Celsuspensie 4	200	2	I	I6,5	34	I7	34,9	3,5	56	28	7I,5	4,3
Celsuspensie 5	205	46	22	I7,1	66	32	35,7	2,5	38	I9	72,1	3,9
Celsuspensie 6, I3,5 maand	232	-	-	-	54	23	29,6	2,5	I35	58	60,9	4,1
Celsuspensie 6, I4 maanden	398	-	-	-	I14	29	37	2,4	205	52	75,7	4,5

* : Drie histogrammen hadden afwijkende absorptiewaarden voor de genoemde pieken. Celsuspensie I, 5 weken, had voor de 2C-piek absorptiewaarden tussen II,5 en I9,5 , voor de 4C-piek tussen 27,5 en 39,5 en voor de 8C-piek tussen 6I,5 en 79,5. Voor celsuspensie 2, 5 weken, waren deze waarden: voor de 2C-piek 9,5-I7,5 , voor de 4C-piek 2I,5-33,5 en voor de 8C-piek 49,5-67,5. Voor celsuspensie 6, I3,5 maand, lag de 4C-piek tussen 23,5 en 35,5 en de 8C-piek tussen 53,5 en 7I,5

DISKUSSIE

I. Eigen resultaten

Uit de resultaten is gebleken, dat reeds vroeg (na 2 maanden) aantalsveranderingen van chromosomen optraden in de calli. Ook waren verschillen in afwijkingen tussen calli van dezelfde cellijn al na 2 maanden zichtbaar. Immers, callus I had op het bewuste tijdstip minder karyotypische afwijkingen dan callus 2. Dit wijst erop, dat genoomafwijkingen al bij de inductie van het callus ontstaan. Milieu-omstandigheden kunnen daarbij een belangrijke faktor zijn. Met name groeihormonen kunnen het ploidy-nivo van prolifererende cellen beïnvloeden (Yeoman et al., 1980; Ogura, 1982). Zo is bijvoorbeeld bekend, dat auxinen aanleiding kunnen zijn voor chromosomale instabiliteit gedurende de kweek. 2,4-Dichloor-fenoxy-azijnzuur (2,4-D) is hiervan het bekendste voorbeeld. In het medium, dat gebruikt werd voor dit onderzoek was ook een auxine aanwezig, namelijk α -naftaleenazijnzuur (NAA). Hoewel NAA in hoge concentraties in intacte planten abnormaliteiten van de spoelfiguur kan induceren, is het effect op de chromosomale stabiliteit van cellen in vitro klein (Yeoman et al., 1980). Een belangrijke oorzaak voor de ontstane afwijkingen zal NAA dan ook niet geweest zijn. Verder schijnen cytokininen de deling te stimuleren van endgedupliceerde cellen (Bayliss, 1980). In het hier gebruikte medium werd 6-benzylaminopurine (BAP) als cytokinine toegevoegd. Dit zou wel een effect gehad kunnen hebben op de aantalsveranderingen van de chromosomen.

Zeer waarschijnlijk is ook het uitgangsmateriaal van groot belang voor de ernst van de afwijkingen in het callus. Weefselfragmenten met morfologisch verschillende typen cellen geven eerder aanleiding tot cellen met verschillende karyotypen in het callus dan homogene weefselstukjes. Immers, al die verschillende typen cellen zullen verschillend reageren op externe stimuli (Yeoman et al., 1980). De calli van dit onderzoek werden geïnduceerd door het uitleggen van stukjes blad op een agar-voedingsbodem. Blad bestaat uit meerdere typen cellen, zodat dat een oorzaak kan zijn geweest voor de chromosomale afwijkingen in de calli I en 2.

Een derde oorzaak zou gelegen kunnen zijn in het feit, dat het blad geknipt werd. Op de wondranden hebben zich de calli gevormd. Nu is bekend, dat beschadigde plantecellen een vreemd "hormoon" afscheiden, dat samen met een ander "plantehormoon" als 2,4-D deling van cellen kan induceren (Aitchison et al., 1977). In de intakte plant zou dit "hormoon" zelden aanleiding zijn voor abnormaliteiten. Maar samen met de voor plantecellen ongetwijfeld abnormale milieu-omstandigheden zou dit wel kunnen leiden tot abnormaliteiten. Interessant zou zijn na te gaan in hoeverre het scheuren van blad aanleiding geeft tot karyotypische afwijkingen. Scheuren gebeurt immers meestal op de meest zwakke plek, dus tussen twee celwanden door. Veel minder cellen zullen op die manier echt beschadigd raken en het voor de intakte plant vreemde "hormoon" zou veel minder vrij komen.

Ook een belangrijke faktor kan zijn het feit, dat de gedifferentieerde plantecellen moeten dedifferentieren om callus te vormen (Aitchison et al., 1977). Hoe dit precies in zijn werk gaat is onbekend, maar dat bij dat proces afwijkingen kunnen ontstaan lijkt niet vreemd.

Celsuspensies, die van callus met chromosomale afwijkingen gemaakt werden, vertoonden direkt al afwijkingen. Die abnormale cellen zullen hoogstwaarschijnlijk voortgekomen zijn uit het callus. Omdat het percentage afwijkende cellen in de heel jonge celsuspensies (1,5 week) lager was dan in het callus, trad er blijkbaar enige selectie op bij de eerste ontwikkeling van de suspensie ten gunste van de normale cellen.

In de celsuspensies ontstonden in korte tijd erg veel cellen met afwijkende chromosoomaantallen. Dit was in de periode, dat het callus moest uiteenvallen tot kleine celklompjes en losse cellen om de celsuspensie te gaan vormen. Nu duikt de vraag op, in hoeverre onderling contact tussen cellen van belang is voor een normaal verloop van de mitose. In de literatuur is hierover niets bekend. Toch zou dit een reële mogelijkheid kunnen zijn. Immers, plantecellen staan met elkaar in contact onder andere door middel van plasmodesmata. Plasmodesmata brengen stoffen en signalen van cel tot cel over, waarschijnlijk

om de groei en functie van de cellen te coördineren. Het is bijvoorbeeld bekend, dat in multicellulaire systemen eiwitten met een laag moleculair gewicht kunnen worden uitgewisseld tussen twee cellen. Dit proces is Ca^{2+} afhankelijk (Duspiva, 1977). Eiwitten zijn noodzakelijk voor de vorming van de spoelfiguur (McIntosh, 1979). Verlies van contact tussen cellen zou dus kunnen leiden tot verlies van noodzakelijke eiwitten, waardoor een normale vorming van de spoelfiguur onmogelijk wordt. Dit kan onder andere leiden tot restitutie, wat een toename van het aantal chromosomen per cel tot gevolg heeft. En die toename in chromosoomaantallen vindt inderdaad plaats tijdens de eerste delingen van de cellen in de schudcultuur.

Een tweede faktor, die van belang kan zijn bij het ontstaan van cellen met karyotypische afwijkingen, is het feit, dat in celsuspensies bijna alle cellen in direct contact staan met het medium. Het medium zou een toxisch bestanddeel kunnen bevatten of een stof, afgescheiden door de cellen zelf, zou toxisch kunnen werken. Ook in de discussie volgend op een voordracht van Duspiva (1977) wordt iets dergelijks opgemerkt. Er wordt beweerd, dat endomitose het gevolg kan zijn van externe factoren, zoals hoge zoutconcentraties in het medium.

Beide factoren, onderling contact tussen cellen en een toxische stof in het medium, al of niet afkomstig van de cellen zelf, zullen hun uitwerking vooral gehad hebben op de vorming en de functie van de spoelfiguren. Ook de aanhechtingsplaats van de spoeldraden op de chromosomen, het centromeer, kan erbij betrokken zijn. Er werden in de jongere celsuspensies (0 t/m 7 weken oud) immers alleen veranderingen in chromosoomaantallen gevonden; de structurele chromosoomafwijkingen traden pas later op.

Op het moment, dat de celsuspensies zich, wat chromosoomaantallen betreft, enigszins gestabiliseerd hadden, ontstonden structurele chromosoomafwijkingen. De redenen daarvoor zijn onbekend. Wel noemt King (1980) een aantal mogelijke oorzaken; chelaten, zoals EDTA, minerale deficienties en sommige zware metaalionen zouden chromosoombreuken kunnen induceren. Of deze factoren bij dit onderzoek een rol hebben gespeeld is niet

duidelijk. Wel zijn EDTA en zware metalen in het medium aanwezig. Bij het ontstaan van de structurele afwijkingen gingen de celsuspensies slecht groeien en na een paar weken was er van groei geen sprake meer. Misschien zijn de vele structurele chromosoomafwijkingen de oorzaak van de slechte groei geweest.

Het percentage "eliminatiemechanismen" schéén omgekeerd evenredig te zijn met het percentage "aantalsveranderingen". Dit lijkt erg vreemd, omdat eliminatiemechanismen ook tot veranderingen in chromosoomaantallen leiden. Misschien onderdrukten de processen, die leidden tot polyploidy, de eliminatiemechanismen als lagging van chromosomen, non-disjunction van chromatiden en multipolaire spoelfiguren. Hoe dit in z'n werk zou moeten gaan is niet duidelijk.

Het feit, dat celsuspensies van oudere calli veel meer aantalsveranderingen van chromosomen hadden dan celsuspensies van jongere calli, is niet zo vreemd, omdat oudere calli ook meer afwijkingen vertoonden dan jongere. Waarom juist kernen met 8C aan genetisch materiaal zo talrijk werden is onduidelijk, maar hetzelfde vertoonde de celsuspensie van ongeveer een jaar oud, hoewel het daar nog veel extremer was. In deze laatste celsuspensie waren bijna geen 2C-kernen meer aanwezig. Bijna alle kernen hadden 4C of 8C aan DNA en enkele kernen 16C. Overigens kunnen de 16C-kernen voor een groot deel in de G₂-fase van de celcyclus geweest zijn, zodat ze eigenlijk bij de 8C-piek thuis horen. Veel aneuploidy was er niet, ondanks dat er veel structurele chromosoomafwijkingen en DNA-eliminatiemechanismen werden gevonden. De structurele afwijkingen leidden blijkbaar niet tot verlies of winst van veel DNA en de aneuploide cellen werden waarschijnlijk snel uitgeselekteerd.

Multinucleaire cellen, vooral 2-kernige cellen, waren erg talrijk in de calli en alle celsuspensies. De enige mogelijke oorzaak is het uitblijven van de cytokinese, nadat de karyokinese voltooid was. Celfusies zijn immers onwaarschijnlijk, omdat plantecellen celwanden bevatten (Pera, 1970; Nagl, 1978). Cytokinese vindt bij planten plaats door de vorming van de

celplaat. Een verzameling vesikels groepeerd zich rond de microtubuli in het midden van de spoelfiguur, nadat de chromosomen daar weggetrokken zijn. Deze vesikels fuseren en vormen een ronde plaat. Deze plaat groeit door fusie van steeds meer vesikels uit tot de celmembraan is bereikt. Dan fuseert de plaat met de celmembraan en de celwandvorming gaat beginnen (Dyson, 1978). De cytokinese lijkt dus afhankelijk te zijn van de spoelfiguur. Zoals al eerder gezegd werd, is de vorming en de functie van de spoelfiguren nogal eens verstoord. Naast fouten tijdens de karyokinese zou dit misschien ook kunnen leiden tot het uitblijven van de cytokinese.

De aanwezigheid van haltervormige kernen duidt op restitutie, waarvan de oorzaak gelegen is in een abnormaal functioneren van de spoelfiguur of in onderlinge verkleving van de chromosomen (Pijnacker, 1984/1985). Omdat al eerder bleek, dat de functie van de spoelfiguur wel eens te wensen overliet en verkleving van chromosomen slechts hoogst zelden gevonden werd, is de eerste verklaring de meest waarschijnlijke. Het is echter niet zeker, dat alle haltervormige kernen restitutie-kernen zijn. Amitotische kernen zien er namelijk precies zo uit. Of amitose voorkomt bij celsuspensies van planten is echter onbekend (Pijnacker, 1984/1985). In callus komt het wel voor. Bij de inductie van callus kunnen kernen met verschillende hoeveelheden DNA ontstaan als gevolg van amitose (D'Amato et al., 1980; Caffaro et al., 1982).

Vreemd gevormde interfasekernen, die het gevolg lijken te zijn van kernfusies of meerpolige spoelfiguren, kunnen in principe ook amitotische kernen zijn. Dit is echter niet erg waarschijnlijk, omdat bij amitose altijd deling van de kern in twee min of meer gelijke helften plaats vindt. Ook de interfasekernen, die een gedeelte lijken af te snoeren in de vorm van een knop, kunnen om dezelfde reden geen amitotische kernen zijn. De oorzaak hiervoor zou kunnen liggen in een voorafgaande anafase, waarbij een of meerdere chromosomen pas heel laat naar de polen migreren en bij de vorming van de kernmembraan nog net in de kern worden ingesloten. Een kern met zo'n "knop" zal zich later afronden. Een andere verklaring wordt gegeven door Harris (1964).

Interfasekernen met een "knop" in in vitro cellen van een varkensnier zouden het gevolg zijn van een extra lang chromosoom, dat door z'n lengte niet samen met de andere chromosomen een afgeronde kern kan vormen. Mij is echter niet duidelijk, waarom een extra lang chromosoom niet met de andere chromosomen een normale ronde kern kan vormen. Alleen in het geval van megachromosomen zou deze reden wel juist kunnen zijn. Maar megachromosomen werden bij dit onderzoek niet gezien.

Micronuclei, die ook veel werden gevonden kunnen het gevolg zijn van lagging van chromosomen of chromosoomfragmenten, die niet in de dochterkernen worden ingesloten en dan, na despiralisatie, zelf een kernmembraan vormen (Pera, 1970; Hese-mann et al., 1982). De aanwezigheid van micronuclei geeft dus aan, dat er eliminatie van chromosomen of chromosoomfragmenten heeft plaats gevonden.

2. Bespreking literatuur

In tabel 5 is een samenvatting gegeven van een aantal publikaties over onderzoek naar karyotypische afwijkingen in calli of celsuspensies van verschillende planten. Hieruit blijkt, dat in de cultures bijna altijd polyploidy en aneuploidy aanwezig waren. De mate, waarin deze afwijkingen voorkwamen, verschilt echter aanzienlijk van publikatie tot publikatie. Ook structurele chromosoomafwijkingen werden regelmatig gevonden. Meerpolige spoelfiguren en lagging chromosomen werden slechts enkele keren gevonden en dan nog meestal in lage frequenties. Vaak echter werd ook niet gekeken naar de eliminatiemechanismen. Hetzelfde geldt voor de structurele chromosoomafwijkingen; over micronuclei en stickiness van chromosomen wordt zelfs maar één keer gesproken, namelijk in het artikel van Roy (1980). Slechts in twee gevallen werden helemaal geen afwijkingen gevonden; in celsuspensies van *Haplopappus gracilis* (Kao et al., 1970) en van de haploïde plant *Nicotiana tabacum* (Evans et al., 1982).

De conclusie uit deze publikaties is, dat ieder callus en iedere celsuspensie zich op een eigen manier gedraagt; de afwijkingen in de ene kweek verschillen sterk van de afwijkingen in een andere vergelijkbare kweek en voorspellingen over de

afwijkingen, die zullen ontstaan in een nieuw op te zetten cultuur zijn niet te doen.

Verklaringen van de gevonden abnormaliteiten worden vaak niet gegeven. (Torrey, 1967; Sacristán et al., 1969; Kibler et al., 1980; Browers et al., 1982; Evans et al., 1982; Inomata, 1982; McCoy et al., 1982 en Jacobsen et al., 1983). De verklaringen, die in de overige publikaties gegeven worden, lopen sterk uiteen. De kweekomstandigheden worden als oorzaak aange-merkt door Kao et al. (1970), Orton (1980), Novák et al. (1982) en Dutta Gupta et al. (1983b). Toch zijn ook deze auteurs het niet allemaal met elkaar eens. Kao et al. (1970) geven nog een tweede oorzaak voor de abnormaliteiten, namelijk het uitgangsmateriaal. Orton (1980) daarentegen beweert met nadruk, dat de herkomst van het materiaal geen enkele rol speelt. Roy (1980) en Ruiz et al. (1982) sluiten zich bij Kao et al. (1970) aan. Dan zijn er nog enkele op zichzelf staande verklaringen. Sacristán (1971) noemt als oorzaak processen, vergelijkbaar met "genetic drift". Bayliss (1973), die naast polyploidy en structurele chromosoomafwijkingen ook meerpolige spoelfiguren en lagging chromosomen vond, zocht de oorzaak in abnormaliteiten van de spoelfiguur. Caffaro et al. (1982) zeggen, dat de inductie van callus gebeurt door middel van amitose, wat nucleaire heterogeniteit tot gevolg zou hebben. Murata et al. (1982) gaven chromosoomfusie als verklaring voor de gevonden translocaties en duplikaties. Dutta Gupta et al. (1983a) tenslotte geven een geheel nieuw fenomeen als verklaring voor de aneuploidy: migratie van kernmateriaal van één cel naar de andere. Dit zou in sommige gevallen ook kunnen leiden tot de vorming van micronuclei.

Hieruit blijkt, dat de verklaringen voor de gevonden afwijkingen al even variabel zijn als de abnormaliteiten zelf. Iedere kweek moet dus telkens opnieuw onderzocht worden op karyotypische afwijkingen en het lijkt een kwestie van ervaring en geluk om een kweek met weinig abnormaliteiten te verkrijgen.

TABEL 5: Samenvatting van een aantal publikaties over karyotypische afwijkingen in weefsel- en celkweken van verschillende planten.

Materiaal	Aantal chr. in het uitgangsmateriaal.	Callus (C) of celsuspensie (S)	Gevonden		afwijkingen			Referenties
			Aantal polyploidy	aneuploidy	Eliminatie meerpolaire spoelfiguren	afwijkingen lagging chr.	Strukturele chr.-afwijkingen	
<i>Allium cepa</i>	2n = 16	C	+					Roy, 1980
<i>Allium sativum</i>	2n = 16	C	+	+				Novák et al., 1982
<i>Allium tuberosum</i>	2n = 16	C	+		+			Roy, 1980
<i>Apium graveolens</i>	2n = 22	S	+		+			Browers et al., 1982
<i>Apium graveolens</i>	2n = 22	S	+		+			Murata et al., 1982
<i>Cichorium intybus</i>	2n = 18	C	+		+			Caffaro et al., 1982
<i>Crepis capillaris</i>	2n = 6	C	+		+			Sacristán, 1971
<i>Datura innoxia</i>	2n = 24	C	+		+			Kibler et al., 1980
<i>Datura innoxia</i>	2n = 24	S	+		+			Kibler et al., 1980
<i>Daucus carota</i>	2n = 18	S	+		+			Bayliss, 1973
<i>Glycine max</i>	2n = 40	S	+		+			Kao et al., 1970
<i>Haploappus gracilis</i>	2n = 4	S	+		+			Kao et al., 1970
<i>Hordeum jubatum</i>	2n = 4x = 28	C	+		+			Orton, 1980
<i>Hordeum jubatum</i>	2n = 4x = 28	S	+		+			Orton, 1980
<i>Hordeum vulgare</i>	2n = 14	C	+		+			Orton, 1980
<i>Hordeum vulgare</i>	2n = 14	S	+		+			Orton, 1980
<i>Hordeum vulgare</i>	2n = 14	C	+		+			Orton, 1980
<i>Luzula elegans</i>	2n = 6	C	+		+			Ruiz et al., 1982
<i>Melilotus alba</i>	2n = 16	S	+		+			Inomata, 1982
<i>Nicotiana glauca</i>	2n = 24	S	+		+			Kao et al., 1970
<i>Nicotiana tabacum</i>	2n = 48	S	+		+			Evans et al., 1982
<i>Nicotiana tabacum</i>	2n = 48	S	+		+			Evans et al., 1982
<i>Nicotiana tabacum</i>	2n = 48	S	+		+			Evans et al., 1982
<i>Nicotiana tabacum</i>	2n = 48	C	+		+			Sacristán et al., 1969
<i>Pisum sativum</i>	2n = 14	C	+		+			Torrey, 1967
<i>Solanum tuberosum</i>	2n = 24	C	+		+			Jacobsen et al., 1983
<i>Triticum aestivum</i>	2n = 42	C	+		+			Dutta Gupta et al., 1983b
<i>Triticum aestivum</i>	2n = 42	S	+		+			Kao et al., 1970
<i>Triticum dicoccum</i>	2n = 28	C	+		+			Dutta Gupta et al., 1983a
<i>Triticum monococcum</i>	2n = 14	S	+		+			Kao et al., 1970
<i>Zea mays</i>	2n = 20	S	+		+			McCoy et al., 1982

3. Vergelijking tussen eigen resultaten en de literatuur

De eigen resultaten vergelijken met die uit de literatuur is bijna onmogelijk, omdat iedere celsuspensie en ieder callus andere afwijkingen vertoont. Bovendien is er slechts één publikatie over karyotypische afwijkingen in calli van *Solanum tuberosum* (Jacobsen et al., 1983). Over abnormaliteiten in celsuspensies van *S. tuberosum* is niets bekend.

Jacobsen et al. (1983) zeggen, dat in de dihaploide en monohaploide calli wel polyploidy, maar geen aneuploidy werd gevonden. De aanwezigheid van structurele chromosoomafwijkingen en eliminatiemechanismen werd niet onderzocht. De resultaten van dit onderzoek duiden wél op de aanwezigheid van aneuploidy. Een oorzaak voor dit verschil zou de leeftijd van de calli kunnen zijn. Het dihaploide callus van Jacobsen et al. (1983) was ongeveer een jaar oud; dus veel ouder dan de calli van dit onderzoek. Mogelijk worden veel ploidy-nivo's uitgelekt. Dit zagen we ook bij de celsuspensies; vergelijk bijvoorbeeld de suspensies I en 2 met 6. Ook de tijd van het jaar, waarin de calli werden geïnduceerd, kan een faktor van betekenis zijn (Yeoman et al., 1980).

Andere vergelijkingen zijn niet te maken. De literatuur biedt dus nauwelijks mogelijkheden om verklaringen voor de gevonden afwijkingen te vinden.

4. Suggesties voor verder onderzoek

Om een beter inzicht te krijgen in de processen, die leiden tot karyotypische veranderingen in celsuspensies, is het aan te bevelen op regelmatige tijden het medium te verversen, bijvoorbeeld om de 3,5 dag. Langere tijdsintervallen tussen het overenten zou de heterogeniteit van de karyotypen in de suspensies vermeederen (Döbel, 1983). De kweekomstandigheden moeten ook zo konstant mogelijk gehouden worden. Daarbij zijn vooral de temperatuur, luchtvochtigheid en CO₂-gehalte in de lucht belangrijk.

De celsuspensie vanaf het allereerste begin volgen is noodzakelijk, maar beter nog zou het zijn het callus, vanaf het moment van inductie, en het uitgangsmateriaal te onderzoeken op afwijkingen. Ook zou het interessant zijn na te gaan of de protoplasten, die van de celsuspensie worden gemaakt voor

fusiedoeleinden, dezelfde abnormaliteiten vertonen als de cellen in de suspensie.

Met specifieke kleuringen van de spoelfiguur, zoals een haematoxyline-kleuring op paraffinecoupes, is misschien te achterhalen of de vorming van de spoelfiguur normaal verloopt.

Een mogelijkheid om het precieze tijdstip van het ontstaan van abnormaliteiten in een enkele cel te ontdekken en zo beter te kunnen achterhalen, welke factoren van invloed zijn op de kernstabiliteit, is het kweken van een enkele cel in een microcultuurkamertje op een objektglaasje. De cel kan dan op ieder gewenst moment onder de mikroskoop beken worden, zonder hem te doden. Helaas is dit technisch nogal moeilijk, vooral omdat lang niet elke cel zich in zo'n microcultuurkamertje wil delen. Bovendien spelen de mogelijke oorzaken van de afwijkingen in de celsuspensies, te weten het verlies van onderling contact tussen cellen en het direkt contact met het medium, waarin misschien een toxische stof zit, ook hier een rol.

Ook de milieu-omstandigheden zouden aan een nader onderzoek onderworpen kunnen worden. Alle factoren, die van invloed kunnen zijn op de genoomstabiliteit van cellen in een celsuspensie of in callus, zouden moeten worden verzameld en in clusters worden ingedeeld. Enkele mogelijke clusters zijn: de cluster "mineralen in het medium", "gassen, waarmee de cellen in aanraking komen", "groeihormonen" etc. Door het variëren van één cluster, terwijl de rest konstant wordt gehouden, kan misschien achterhaald worden welke afwijkingen in chromosoom-aantal en -structuur bij welke cluster hoort. Door in die cluster elke faktor afzonderlijk te gaan variëren, kan mogelijk meer informatie verkregen worden over de invloed van bepaalde stoffen in het milieu op de genoomstabiliteit.

Vooraf de hoeveelheid Ca^{2+} -ionen in het medium kon wel eens belangrijk zijn. De spoeldraden zijn opgebouwd uit microtubuli. Ca^{2+} -ionen kunnen in bepaalde concentraties de polymerisatie van microtubuli en daarmee de vorming van de spoelfiguur in vitro verhinderen. Zeer waarschijnlijk heeft calcium in vivo ook een dergelijke fysiologische betekenis bij de mitose. In welke concentraties is echter absoluut niet duidelijk.

Dit hangt uiteraard af van de Ca^{2+} -pomp in de celmembraan en van het feit of Ca^{2+} -ionen wel of niet doordringen in de kern. Omdat de manier van contraheren van de spoelfiguur wel eens vergeleken wordt met het contractiemechanisme van skeletspieren in dierlijke organismen worden de vesikels in spoelfiguren wel analoog gedacht aan het sarcoplasmatisch reticulum. De vesikels zouden de vorming en activiteit van de microtubuli reguleren. Als deze analogie juist is, moeten Ca^{2+} -ionen van groot belang zijn bij de controle over de polymerisatie en depolymerisatie van microtubuli. Om dit te bewijzen is het nodig, dat Ca^{2+} -ionen in de vesikels in de spoelfiguren worden aangetoond. Tot op heden is dit nog niet gelukt (Sanger, 1977; Ludueña, 1979).

Hoe het ontstaan van abnormaliteiten voorkomen kan worden is volledig onbekend. Misschien is het zelfs onmogelijk. In ieder geval is het voor fusie-experimenten aanbevelingswaardig celsuspensies van jong callus te maken en die celsuspensies zo snel mogelijk te gaan gebruiken.

LITERATUUR

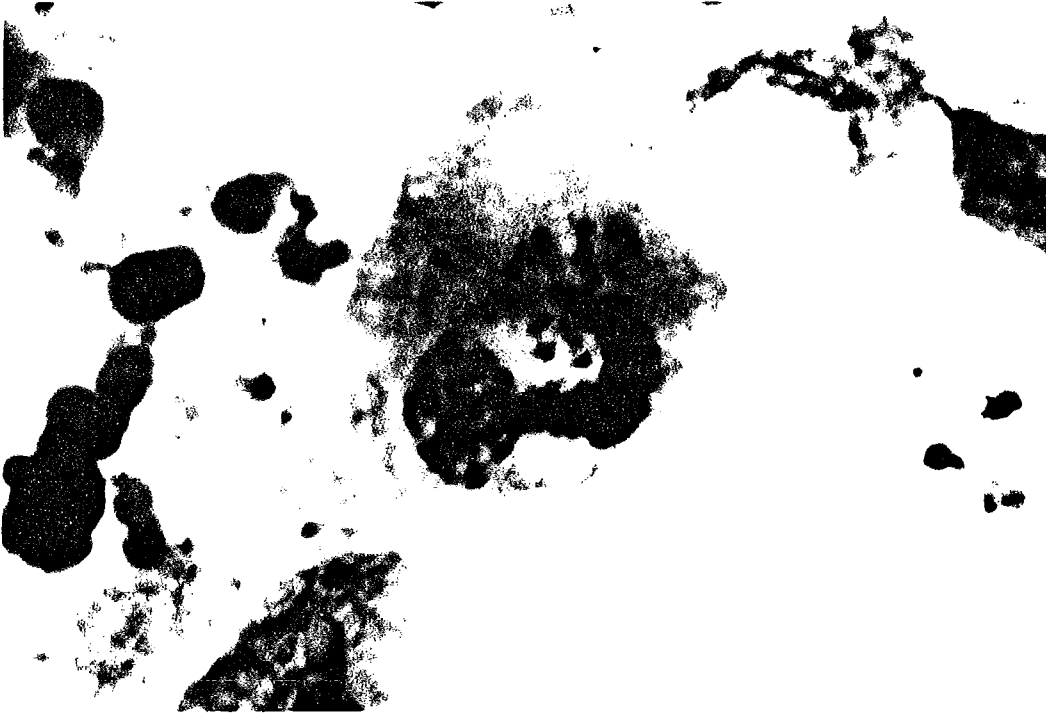
- Adachi, T., Hoffman, F. en Yokoh, H. (1982): Abnormality of chromosomal behavior and restriction of cell division in intergeneric and interspecific protoplast fusion products. In: Fujiwara, A.: Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture. Jap. Assoc. Plant Tissue Culture, Maruzen Press, Tokyo: 441-442.
- Aitchison, P.A., MacLeod, A.J. en Yeoman, M.M. (1977): Growth patterns in tissue (callus cultures. In: Street, H.E.: Plant tissue and cell culture. Botanical Monographs, Volume II, Blackwell Scientific Publications, Oxford: 267-306.
- Bajaj, Y.P.S. (1974): Potentials of protoplast culture work in agriculture. Euphytica 23: 633-649.
- Bayliss, M.W. (1973): Origin of chromosome number variation in cultured plant cells. Nature 246: 529-530.
- Bayliss, M.W. (1980): Chromosomal variation in plant tissues in culture. In: Vasil, I.K.: Perspectives in plant cell and tissue culture. Int. Rev. Cytol. Suppl. IIA, Academic Press, New York: 113-144.
- Browsers, B.A. en Orton, T.J. (1982): Transmission of gross chromosomal variability from suspension cultures into regenerated celery plants. J. Heredity 73: 159-162.
- Caffaro, L., Dameri, R.M., Profumo, P. en Bennici, A. (1982): Callus induction and plantlet regeneration in *Cichorium intybus* L.: I. A cytological study. Protoplasma III: 107-112.
- D'Amato, F., Bennici, A., Cionini, P.G., Baroncelli, S. en Lupi, M.C. (1980): Nuclear fragmentation followed by mitosis as mechanism for wide chromosome number variation in tissue cultures: Its implications for plant regeneration. In: Sala, F., Parisi, B., Cella, R. en Ciferri, O.: Plant cell cultures: results and perspectives. Developments in Plant Biology, Vol. 5, Elsevier/ North-Holland Biomedical Press, Amsterdam: 67-72.
- Davidson, D., Pertens, E. en Zhao, J.-P. (1983): Chromosome distribution between two restitution nuclei in a cell following colchicine treatment. Can. J. Genet. Cytol. 25: 437-445.

- Döbel, P. (1983): Verringerung des Ploidiegrades und der Restitutionskernbildung in einer gegen hohe 2,4-D-Konzentrationen resistenten Suspensionskultur von *Nigella damascena*. Biol. Zbl. 102: 431-444.
- Duspiva, F. (1977): Mitosis in differentiation, morphogenesis and cancer. In: Little, M., Paweletz, N., Petzelt, C., Pongstingl, H., Schroeter, D. en Zimmermann, H.-P.; Mitosis. Facts and questions. Springer-Verlag, Berlin; 121-149.
- Dutta Gupta, S. en Ghosh, P.D. (1983a): Migration of nuclear material in callus cultures of *Triticum dicoccum* Schulb. Current Science 52 (8): 369-370.
- Dutta Gupta, S. en Ghosh, P.D. (1983b): Chromosome analysis in callus culture of *Triticum aestivum*. The Nucleus 26: 16-18.
- Dyson, R.D. (1978): Cell biology. 2^e editie, Allyn and Bacon, Inc., Boston: 534.
- Evans, D.A. en Gamborg, O.L. (1982): Chromosome stability of cell suspension cultures of *Nicotiana* spp. Plant Cell Reports 1: 104-107.
- Harris, M. (1964): Cell culture and somatic variation. Holt, Rinehart en Winston, New York: 210-212.
- Hesemann, C.U. en Fayed, A.H. (1982): Micronuclei in *Vicia faba*. I. The occurrence and origin. Egypt. J. Genet. Cytol. II: 235-243.
- Inomata, I. (1982): Chromosome variation in callus cells of *Luzula elegans* Lowe with nonlocalized kinetochores. Jpn. J. Genet. 57: 59-64.
- Jacobsen, E., Tempelaar, M.J. en Bijmolt, E.W. (1983): Ploidy levels in leaf callus and regenerated plants of *Solanum tuberosum* determined by cytophotometric measurements of protoplasts. Theor. Appl. Genet. 65: 113-118.
- Kao, K.N., Miller, R.A., Gamborg, O.L. en Harvey, B.L. (1970): Variations in chromosome number and structure in plant cells grown in suspension cultures. Can. J. Genet. Cytol. 12: 297-301.
- Kibler, R. en Neumann, K.-H. (1980): On cytogenetic stability of cultured tissue and cell suspensions of haploid and

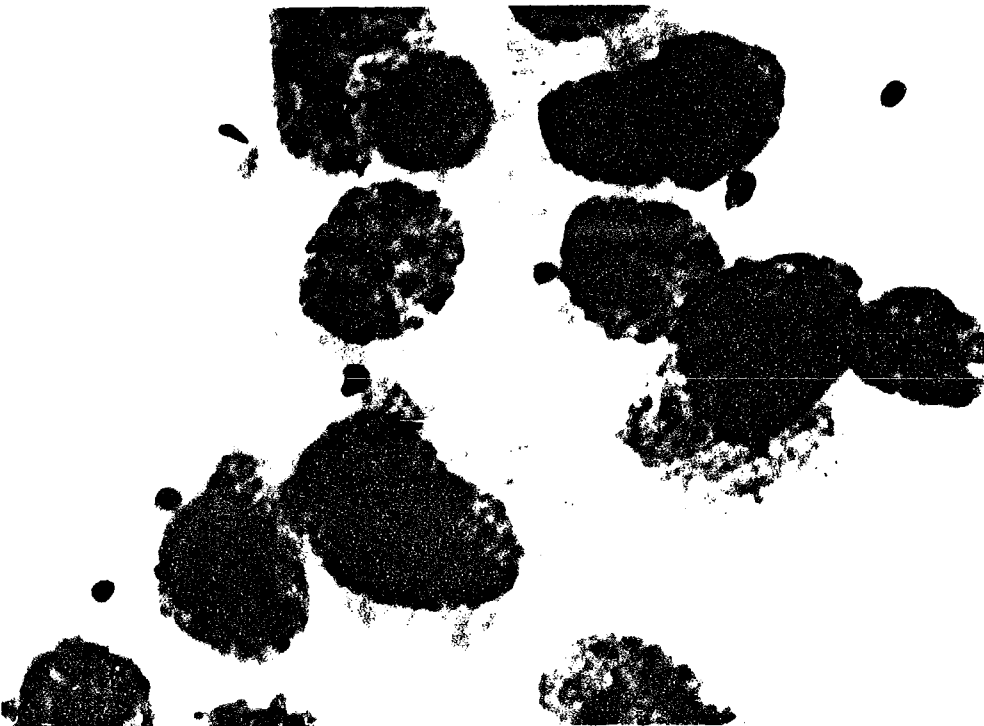
- diploid origin. In: Sala, F., Parisi, B., Cella, R. en Ciferri, O.; Plant cell cultures; results and perspectives. Developments in plant biology, Vol. 5, Elsevier/ North-Holland Biomedic Press, Amsterdam; 59-65.
- King, P.J. (1980); Cell proliferation and growth in suspension cultures. In: Vasil, I.K.; Perspectives in plant cell and tissue culture. Int. Rev. Cytol. Suppl. IIA, Academ Press, New York; 25-54.
- Linskens, H.F. (1977); Somatische hybridisatie bij planten I. Vakbl. Biol. 8,57; 120-125.
- Ludueña, R.F. (1979); Biochemistry of tubulin. In: Roberts, K. en Hyams, J.S.; Microtubules. Academic Press, London; II2-II4.
- McCoy, T.J. en Phillips, R.L. (1982); Chromosome stability in maize (*Zea mays*) tissue cultures and sectoring in some regenerated plants. Can. J. Genet. Cytol. 24; 559-565.
- McIntosh, J.R. (1979); Cell division. In: Roberts, K. en Hyams, J.S.; Microtubules. Academic Press, London; 414-415.
- Murata, M. en Orton, T.J. (1982); Analysis of karyotypic changes in suspension cultures of celery. In: Fujiwara, A.; Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture. Jap. Assoc. Plant Tissue Culture, Maruzen Press, Tokyo; 435-436.
- Nagl, W. (1978); Endopolyploidy and polyteny in differentiation and evolution. North-Holland Publishing Company, Amsterdam; II4.
- Novák, F.J., Havel, L. en Doležel, J. (1982); In vitro breeding system of *Allium*. In: Fujiwara, A.; Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture. Jap. Assoc. Plant Tissue Culture, Maruzen Press, Tokyo; 767-768.
- Ogura, H. (1982); Studies on the genetic instability of cultured tissues and the regenerated plants - effects of auxins and cytokinins on mitosis of *Vicia faba* cells. In: Fujiwara, A.; Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture. Jap. Assoc. Plant Tissue Culture, Maruzen Press, Tokyo; 433-434.
- Opatrny, Z., Schumann, U., Rakouský, S. en Koblitz, H. (1980); The role of some exogenous and endogenous factors in

- the isolation of protoplasts from potato cell cultures and their recovery in cell clones. *Biol. Plantarum* 22(2); 107-116.
- Orton, T.J. (1980); Chromosomal variability in tissue cultures and regenerated plants of *Hordeum*. *Theor. Appl. Genet.* 56; 101-112.
- Pera, F. (1970); Mechanismen der Polyploidisierung und der somatischen Reduktion. *Ergebnisse der Anatomie und Entwicklungsgeschichte*, Band 43, Heft 5, Springer-Verlag, Berlin.
- Pijnacker, L.P. (1984/1985); Somatische kernen en chromosomen. Manuscript, in druk.
- Pijnacker, L.P. en Ferwerda, M.A. (1984); C-banding of potato-chromosomes. *Can. J. Genet. Cytol.* 26; in druk.
- Rieger, R., Michaelis, A. en Green, M.M. (1976); Glossary of genetics and cytogenetics. 4^e herziene editie, Springer-Verlag, Berlin.
- Roy, S.Ch. (1980); Chromosomal variations in the callus tissues of *Allium tuberosum* and *A. cepa*. *Protoplasma* 102; 171-176.
- Ruiz, M.L. en Vásquez, A.M. (1982); Chromosome number evolution in stem derived calluses of *Hordeum vulgare* L. cultured in vitro. *Protoplasma* III; 83-86.
- Sacristán, M.D. (1971); Karyotypic changes in callus cultures from haploid and diploid plants of *Crepis capillaris* (L.) Wallr. *Chromosoma* 33; 273-283.
- Sacristán, M.D. en Melchers, G. (1969); The caryological analysis of plants regenerated from tumorous and other callus cultures of tobacco. *Molec. Gen. Genetics* 105; 317-333.
- Sanger, J.W. (1977); Nontubulin molecules in the spindle. In: Little, M., Paweletz, N., Petzelt, C., Ponstingl, H., Schroeter, D. en Zimmermann, H.-P.; *Mitosis. Facts and questions*. Springer-Verlag, Berlin; 98-113.
- Schieder, O. en Vasil, I.K. (1980); Protoplast fusion and somatic hybridization. In: Vasil, I.K.; *Perspectives in plant cell and tissue culture*. *Int. Rev. Cytol. Suppl.* IIB, Academic Press, New York; 21-46.
- Schilperoort, R.A. (1977); Somatische hybridisatie bij planten 2. *Vakbl. Biol.* 8,57; 126-132.

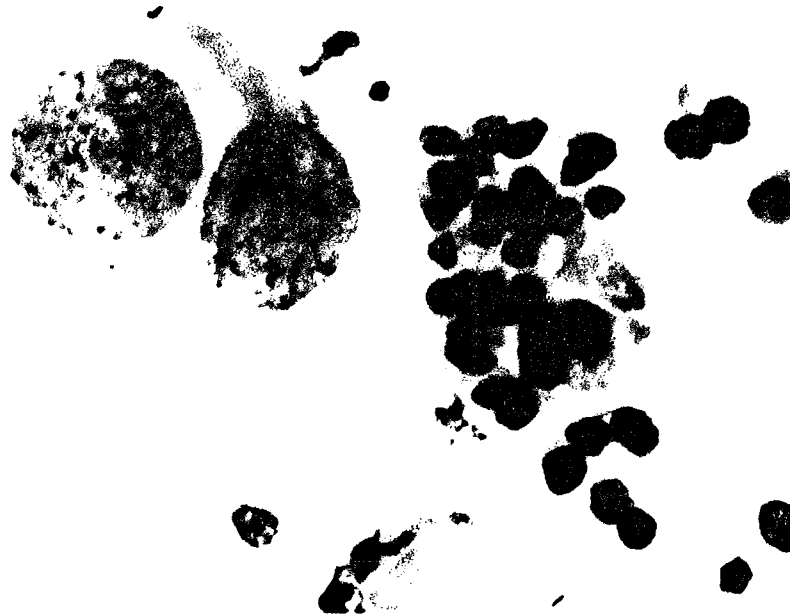
- Schulz-Schaeffer, J. (1980); Cytogenetics. Springer-Verlag, New York.
- Skirvin, R.M. (1978); Natural and induced variation in tissue culture. *Euphytica* 27: 241-266.
- Street, H.E. (1977); Old problems and new perspectives. In: Street, H.E.; Plant tissue and cell culture. Botanical Monographs, Vol. II, Blackwell Scientific Publications, Oxford: 50I-5II.
- Sunderland, N. (1977); Nuclear cytology. In: Street, H.E.; Plant tissue and cell culture. Botanical Monographs, Vol. II, Blackwell Scientific Publications, Oxford: 177-205.
- Torrey, J.G. (1967); Morphogenesis in relation to chromosomal constitution in long-term plant tissue cultures. *Physiol. Plant.* 20: 265-275.
- Vries, S.E. de (1983a); Het isoleren, cultiveren en fuseren van protoplasten uit celsuspensies van *Solanum tuberosum*. Niet gepubliceerd doktoraalverslag. Wageningen, Stichting ITAL.
- Vries, S.E. de (1983b); Streptomycine resistentie in een dihaploide cellijn van *Solanum tuberosum*. Niet gepubliceerd doktoraalverslag, Haren, Laboratorium voor cel- en plantengenetica.
- Yeoman, M.M. en Forche, E. (1980); Cell proliferation and growth in callus cultures. In: Vasil, I.K.; Perspectives in plant cell and tissue culture. *Int. Rev. Cytol. Suppl. IIA*, Academic Press, New York: I-24.



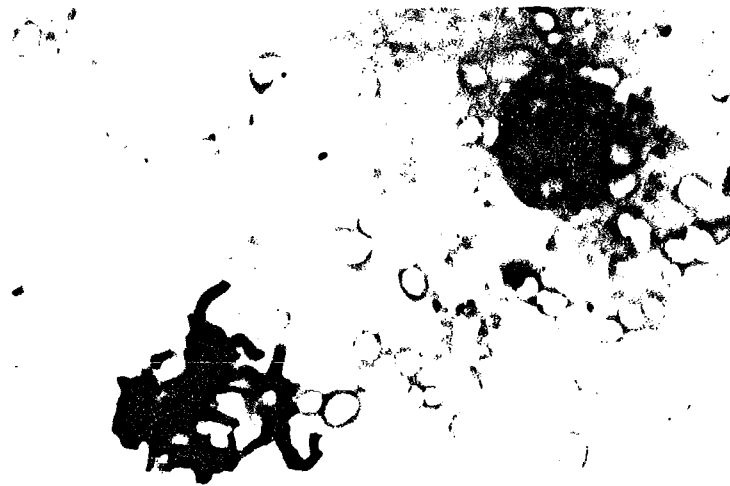
FIGUUR 2: Een 2-kernige cel in mitose. De kernen delen zich niet geheel in fase. Callus I van *Solanum tuberosum*, cellijn 007, 2 maanden na inductie. Giemsa, vergr. 2000x.



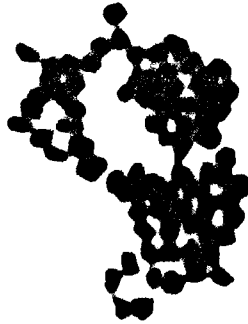
FIGUUR 3: Kernen met vele micronuclei in de drie weken oude celsuspensie I van *S. tuberosum*, cellijn 007. Giemsa, vergr. 2000x.



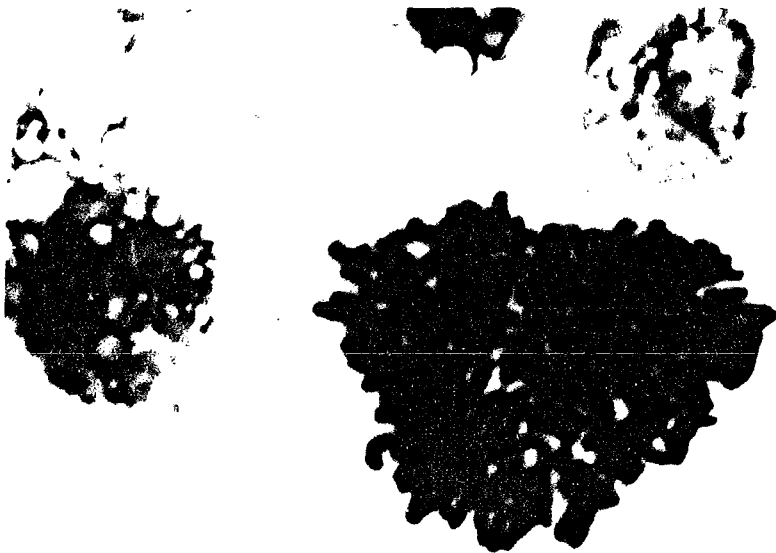
FIGUUR 4; Hoog-polyploide kernen naast laag-ploide kernen in één celsuspensie. Celsuspensie I, 4 weken oud, van *S. tuberosum*, cellijn 007. Giemsa, vergr. 800x.



FIGUUR 5; Mitotische cel met een meerpelige spoelfiguur. De 7 weken oude celsuspensie I van *S. tuberosum*, cellijn 007. Giemsa, vergr. 2000x.



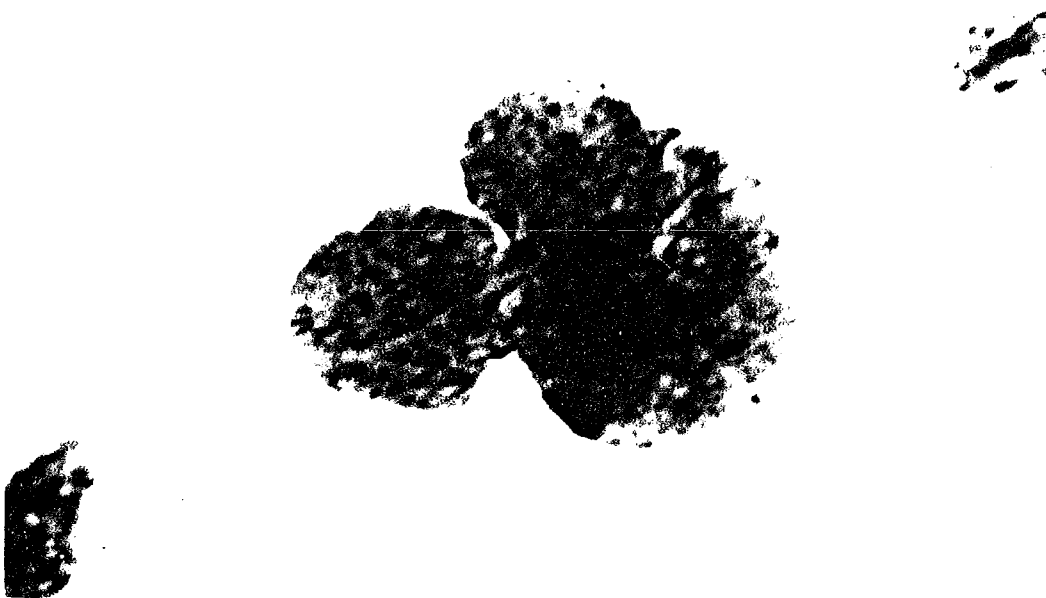
FIGUUR 6: Metafase met 75 chromosomen in de 4 weken oude celsuspensie 2 van *S. tuberosum*, cellijn 007. Voor fixatie waren de cellen 4,5 uur behandeld met BN. Giemsa, vergr. 2000x.



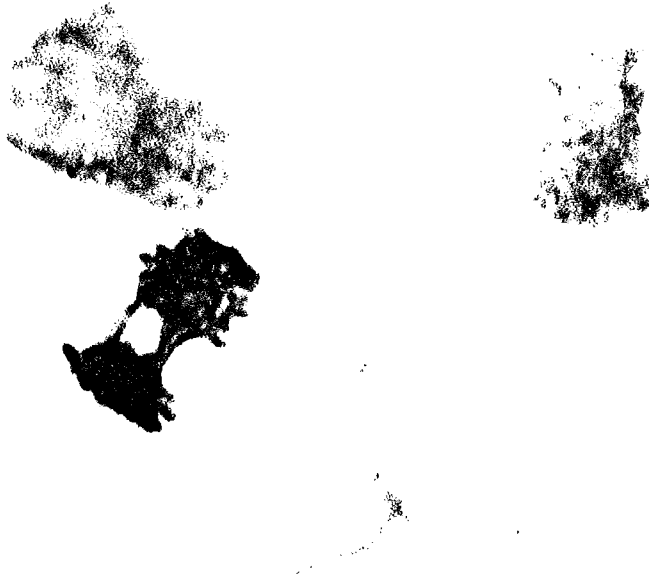
FIGUUR 7: Metafase met 150-200 chromosomen in de 4 weken oude celsuspensie 2 van *S. Tuberosum*, cellijn 007. Giemsa, vergr. 2000x.



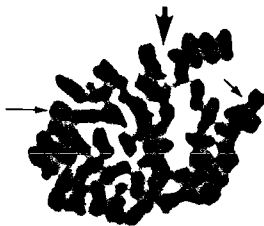
FIGUUR 8; Polyploide telofase met lagging chromosomen.
De 2,5 week oude celsuspensie 5 van *S. tuberosum*,
cellijn 007. Giemsa, vergr. 2000x.



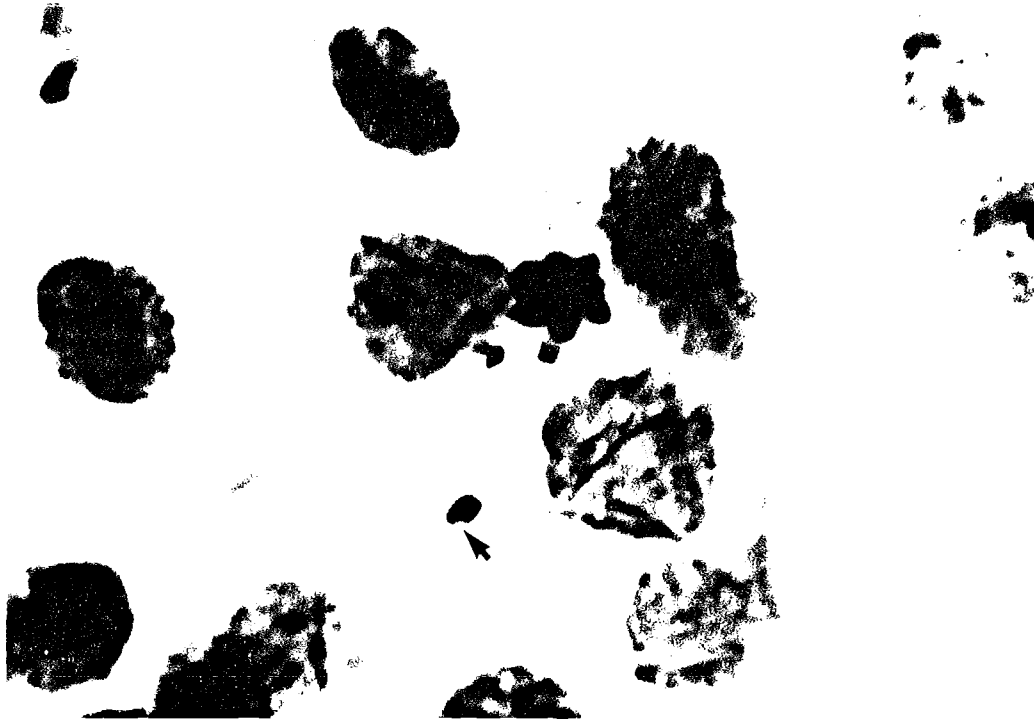
FIGUUR 9; Vreemd gevormde kern; resultaat van multipolaire
spoelfiguur of fusie van kernen? Celsuspensie 5,
2,5 week oud, van *S. tuberosum*, cellijn 007. Giemsa,
vergr. 2000x.



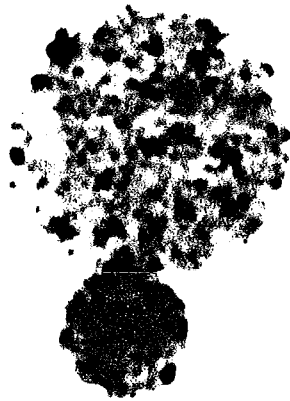
FIGUUR IO; Telofase met meerdere bruggen in de IO maanden oude celsuspensie 6 van *S. tuberosum*, cellijn 007. Giemsa, vergr. 2000x.



FIGUUR II; Metafase (\pm 45 chromosomen) met structurele afwijkingen. In deze metafaseplaat zijn als afwijkingen aanwezig: Een dicentrisch chromosoom (grote pijl), een chromosoom met een deletie (kleine pijl), NOR-chromosomen, waarvan het gedeelte tussen de twee constricties te groot is (dikke pijl) en 2 fragmenten. Celsuspensie 6, II maanden oud, van *S. tuberosum*, cellijn 007. Giemsa, vergr. 2000x.



FIGUUR 12: Metafase met afzijdig liggend chromosoom, dat een deletie bevat (pijl). Celsuspensie 6, II maanden oud, van *S. tuberosum*, cellijn 007. Giemsa, vergr. 2000x.



FIGUUR 13: Kern met "knop". Callus 2, 2 maanden oud, van *S. tuberosum*, cellijn 007. Giemsa, vergr. 2000x.