

D563

INVLOED VAN DNA-SYNTHESE-REMERS OP DE  
POLYPLOIDISATIE TIJDENS CALLUSINDUCTIE  
AAN BLADEXPLANTATEN VAN  
SOLANUM TUBEROSUM L.

*Verslag afgegeven van R. Pijnaker (Groningen).*

Gert Baarda

Plantuniversiteit Groningen  
Experimenteel Biologisch Instituut  
Rijksweg 30 — Postbus 14  
9700 AA HAREN

INVLOED VAN DNA-SYNTHESE-REMERS OP DE POLYPLOIDISATIE  
TIJDENS CALLUSINDUCTIE AAN BLADEXPLANTATEN VAN  
SOLANUM TUBEROSUM L.

Gert Baarda  
Vakgroep Genetica  
Werkgroep :  
Cel- en plantengenetica  
Rijks Universiteit  
Groningen  
augustus '87

## Voorwoord

Dit verslag is het resultaat van een onderzoek bij de werkgroep cel- en plantengenetica aan de Rijks Universiteit te Groningen. Het onderzoek stond in het kader van een acht maands doctoraalonderwerp cel- en plantengenetica. De verslaglegging van het onderzoek gebeurt in twee delen : dit verslag en het verslag "Het gedrag van diplochrosomen in beginnend callus van Solanum tuberosum L. tijdens de mitose".

Graag zou ik hier alle personeel en studenten van genoemde werkgroep hartelijk willen bedanken voor geboden hulp in welke vorm dan ook en meer in het bijzonder voor de prettige werksfeer, die het mogelijk maakten dit onderzoek op prettige wijze te bewerken. Meer in het bijzonder zou ik Laas Pijnacker en Margriet Ferwerda willen bedanken voor hun inspirerende begeleiding, zowel wetenschappelijk als niet-wetenschappelijk. Tenslotte zou ik Henk Krijgsheld willen bedanken voor het beschikbaar stellen van plantjes van het genotype 860040.

Augustus '87

Gert Baarda

Inhoudsopgave

Voorwoord	pagina 0
Inleiding	pagina 2
Materiaal en methoden	pagina 5
Resultaten	pagina 8
Conclusies en discussie	pagina 12
Literatuur	pagina 15

## Inleiding.

Bij de hedendaagse plantenveredeling en -genetica wordt, naast de "normale" kruisingen, gebruik gemaakt van daarvan afwijkende bijvoorbeeld biotechnologische methoden. Zo kunnen o.a. haploide ( $2n=x$ ) planten in aanzienlijke hoeveelheden geproduceerd worden. Het voordeel hiervan is, dat in haploid materiaal alle aanwezige genen tot expressie komen en dat zo ook recessieve (geïnduceerde) mutaties ontdekt kunnen worden. Ook wordt gebruik gemaakt van calluskweek, waarbij uit wondweefsel aan plantedelen een ongedifferentieerde celmassa gekweekt wordt. Uit dergelijk callus zijn via regeneratie weer planten te verkrijgen, die mogelijk door mutatie andere erfelijke eigenschappen bezitten dan het uitgangsmateriaal.

Een groot probleem is, dat calluscellen kunnen gaan polyploidiseren (o.a. Bayliss 1980; D'Amato 1985). Doordat niet alle cellen dit in gelijke mate doen, zijn in het callus cellen met verschillende DNA-hoeveelheden te vinden. Polyploidisatie treedt ook op in callus van de aardappel, Solanum tuberosum (Jacobsen et al. 1983; Sree Ramulu et al. 1984; Pijnacker et al. 1986). Het optreden van polyploidisatie wordt toegeschreven aan het gebruik van fytohormonen (D'Amato 1952, 1985; Bayliss 1980)

In gedifferentieerde weefsels van planten zijn voornamelijk twee DNA-niveaus aanwezig. Deze niveaus horen bij cellen, verkerend in de G1-fase ("rustfase" na deling) en cellen in de G2-fase ("rustfase" voor deling). In de G2-fase is twee keer zo veel DNA in de cel aanwezig als in de G1-fase. Daarnaast komt meestal een klein aantal polyploide cellen voor (Levan 1939; Nagl 1978). De frequentie van cellen met verschillende DNA-gehalten verschilt tussen verschillende weefsels van een plant en tussen verschillende genotypen (voor de aardappel : Jacobsen et al. 1983; Sree Ramulu & Dijkhuis 1986). De relatieve frequentie van G1- en G2-cellen en de mate van polyploidisatie kunnen bepaald worden met behulp van cytofotometrie. Het kern-DNA wordt hierbij

gekleurd met een specifieke kleurstof, waarna de extinctie van afzonderlijke kernen bepaald kan worden (Jacobsen et al. 1983, Sree Ramulu & Dijkhuis 1986)

Polyploidisatie wordt toegeschreven aan afwijkingen van de normale celcyclus. Bij callusinductie zou polyploidisatie optreden doordat gedifferentieerde cellen, die geen deling meer vertonen, tot deling worden aangezet. Het idee hierbij is, dat ~~de~~ alle cellen eerst een ronde DNA-synthese doorlopen en pas daarna in deling gaan (Grafl 1939; Pijnacker et al. 1986). *Gezellen polyploidisatie*

Er zijn verschillende methoden bekend om de celcyclus te beïnvloeden, voornamelijk door de cellen tijdelijk in een bepaalde fase van de celcyclus te blokkeren. Gezien de theorie, dat cellen die tot deling worden aangezet eerst een syntheseronde doormaken, lijkt de aangewezen weg om te komen tot callus met uitsluitend hetzelfde ploïdieniveau als het uitgangsmateriaal, het uitgaan van materiaal met alleen G1-cellen. Immers, als alle cellen vanuit de G1 hun DNA zouden repliceren en daarna in deling zouden gaan, zou het "uitgangsploïdieniveau" gehandhaafd blijven. Stoffen, waarvan bekend is dat zij de celcyclus op de overgang van G1- naar synthesefase blokkeren, zijn onder andere hydroxyurea (HU) (o.a. Nagl 1972; Nishinari et al. 1982; Nishinari & Syono 1986), fluorodeoxyuracil (FdU) (o.a. Eriksson 1966), aphidicoline (o.a. Guri et al. 1984; Sala et al. 1983) en 5-amino-uracil (5-AU) (o.a. Navarrete et al. 1983; Cortes et al. 1983).

Slechts Nagl (1972) gebruikte een van deze stoffen, HU, voor het blokkeren van de celcyclus in georganiseerd weefsel, in dit geval in protocormen van Cymbidium. Voor het overige is dit soort syntheseremmers slechts gebruikt voor het vastleggen van cellen in de G1-fase in celsuspensieculturen, een cultuurvorm waarin meestal polyploidisatie optreedt. Over het voorkomen van polyploidisatie door het gebruik van DNA-syntheseremmers kon geen literatuur gevonden worden.

Ook manipulatie met nutriënten kan de celcyclus beïnvloeden. Zo blijkt bijvoorbeeld bij suspensieculturen van Acer

pseudoplatanus nitraatgebrek de cellen vast te leggen in de G1-fase, terwijl ook fosfaat- en suikergebrek de celcyclus blokkeren (G1:G2 in de verhouding 4:1) (Gould et al. 1983).

Een andere methode om de relatieve frequentie van G1-cellen te verhogen is het gebruik van delingsstimulatoren. Een delingsstimulerend effect is onder andere bekend van cytokinine (o.a. Fosket & Short 1973). Bij het gebruik van een delingsstimulator verwacht men dat het aantal G2-cellen afneemt, doordat een verhoogd aantal, via deling, G1-cellen oplevert.

Met behulp van cytofotometrie is in dit onderzoek getracht een antwoord te verkrijgen op de volgende twee vragen:

1. Is het mogelijk om door voorbehandeling met DNA-syntheseremmer(s) en/of delingsstimulator(en) het percentage G1-cellen in explantaten van Solanum tuberosum te verhogen ?

2. Is het mogelijk stabiel(er), d.w.z. minder of geen polyploide cellen bevattend, callus te kweken uit explantaten van Solanum tuberosum, als wordt uitgegaan van explantaten die een hoger aantal of alleen G1-cellen bevatten ?

### Materiaal en methoden.

Om zo gunstig mogelijk (veel G1-cellen bevattend) uitgangsmateriaal te verkrijgen werden verschillende weefsels gebruikt, nl. de stengeltop (meristeem en directe omgeving), een klein ( $\pm 0.5$  cm) nog niet volledig uitgegroeid blaadje, een groot, uitgegroeid, blad en een stengelstukje van tussen het derde en vierde blad. Hiervoor werden plantjes van de monohaploide ( $2n=x=12$ ) Solanum tuberosum, lijn 7322 (Jacobsen 1981) gekweekt in potten met MS 10 (= Murashige en Skoog medium met 10 g/l sucrose). Voor cytofotometrisch onderzoek werd het materiaal gefixeerd in Carnoy (ethanol absoluut : ijsazijn = 3 : 1) bij 4°C voor minstens 24 uur. Hierna werd het weefsel 25 minuten gehydrolyseerd in 5N HCl, gespoeld in demiwater en gedurende 2-3 uur in de koelkast gezet in Schiffs reagens voor specifieke DNA-kleuring (Feulgen-reactie). Na 10 minuten spoelen in leidingwater werden van delen van het gekleurde weefsel squashes gemaakt in 45% azijnzuur. Deze preparaten werden, na een nacht in de diepvries en drogen aan de lucht, permanent gemaakt met DePeX. In deze preparaten werd van  $\pm 100$  kernen de arbitraire DNA-inhoud gemeten met behulp van een cytofotometer, zoals beschreven door Tempelaar (1980). Tevens werd gebruik gemaakt van een snelle meetmethode (stappen van 1  $\mu$  i.p.v. 0.5  $\mu$  en zonder gebruik van lichtbeperkend diafragma) als beschreven door Jacobsen et al. (1983). De C-waarde van de gemeten kernen werd bepaald aan de hand van aanwezige mitoseplaten. Bij preparaten waar geen deling werd aangetroffen, werd deze C-waarde bepaald aan de hand van vergelijkbare preparaten, waarbij deze ijkmethode wel mogelijk was.

Behandeling met syntheseremmers vond op twee manieren plaats. Als eerste methode werden  $\pm 4$  stengeltoppen van 7322 per pot gezet op MS 10 met syntheseremmer. Als syntheseremmers werden hierbij gebruikt hydroxyurea (4 mg/ml medium en 0.4 mg/ml medium) en fluorodeoxyuracil (0.01 mg/ml medium). De syntheseremmers



werden opgelost in 8 ml demiwater en filtersteriel toegevoegd aan 100 ml gestold medium, minstens een dag voor het overbrengen van de stengeltoppen. Van de op deze manier behandelde plantjes werden na zes dagen een aantal kleine blaadjes onderzocht.

De andere behandelingsmethode vond plaats op in stukjes gesneden (recht op de hoofdnerf) kleine blaadjes van de monohaploide ( $2n=x=12$ ) Solanum tuberosum, lijnen 7322 en 860040 (mutant van 7322 met veranderde zetmeelsamenstelling), afkomstig van steriel opgekweekte (als voorbeschreven) plantjes. Deze bladreepjes werden in petrischalen uitgelegd op verschillende vaste media, al of niet met syntheseremmer. Ongeveer 30 bladreepjes werden per schaal, met parafilm afgesloten, in het donker bij 25°C geïncubeerd. De gebruikte media waren :

1. M 308 = MS-medium met 5 mg/l NAA, 0.1 mg/l BAP en 8 g/l agar
2. WA = wateragar = gedestilleerd water met 8 g/l agar
3. WA 10/BAP = wateragar met 10 g/l sucrose, 0.1 mg/l BAP en 8 g/l agar

Per petrischaal met 25 ml gestold medium werden op deze media, via een bacteriefilter, syntheseremmers toegevoegd, telkens opgelost in 2 ml demiwater. Deze toevoeging gebeurde telkens minstens een dag voor uitleggen van de explantaten. De gebruikte syntheseremmers en de concentraties zijn weergegeven in tabel 1.

Van deze explantaten werden na een aantal dagen (M 308 : 2, 5 en 12 dagen, WA : 3, 6 en 10 dagen, WA 10/BAP : 3, 4 en 5 dagen) een aantal uit de schalen gehaald en verwerkt tot Feulgen-squashes. Van deze preparaten werden per behandelingsmethode 2 preparaten cytofotometrisch onderzocht, waarbij per preparaat van  $\pm 50$  kernen de DNA-inhoud gemeten werd.

Aan de hand van de metingen werden de behandelingsmethoden gescheiden in succesvolle en niet succesvolle methoden. Een methode werd succesvol genoemd als het aantal G1-cellen in de onderzochte explantaten relatief groter geworden was.

Van met een succesvolle methode behandelde explantaten werden de resterende explantaten uitgelegd op verse schalen M 308 om

callus te induceren. Deze explantaten werden gefixeerd in Carnoy op het moment dat ze een dusdanig groot callus gevormd hadden, dat het mogelijk was het callus zonder moeite te scheiden van het explantaat (ongeveer speldeknop-grootte). Van de op deze manier verkregen calli werd aselekt een aantal uitgekozen. De uitgekozen calli werden tot Feulgen-squash verwerkt, waarna van  $\pm$  25 kernen per callus de DNA-inhoud gemeten werd. Van elk callus werd het percentage kernen berekend, dat een DNA-hoeveelheid bezat hoger dan het 2C-niveau. Dit zijn de kernen waarvan zeker is, dat ze niet haploid zijn.

Om te kunnen kwantificeren in hoeverre voorbehandeld (voor uitleggen op callusinducerend medium) materiaal "beter", d.w.z. minder polyploide cellen bevattend, callus oplevert, werden bij wijze van controle bladstukjes van kleine blaadjes van 7322 en 860040 uitgelegd op M 308 (zonder voorbehandeling) en verder gelijk behandeld als de voorbehandelde explantaten. De percentages niet haploide kernen van deze calli werden vergeleken met de percentages niet haploide kernen van de calli, afkomstig van voorbehandelde explantaten. Hierbij werden de voorbehandelingsmethoden gescheiden gehouden. De statistische significantie van de verschillen werden getoetst met behulp van de Mann-Whitney toets (Downie & Heath 1974). Op dezelfde manier werden ook voorbehandelingsmethoden onderling vergeleken.

## Resultaten

Het blijkt, dat het hoogste percentage G1-cellen gevonden werd in kleine ( $\pm 0.5$  cm) nog niet uitgegroeide blaadjes (figuur 1). Deze blaadjes bevatten ongeveer 77% G1-cellen en 23% G2-cellen. In de stengel en in een groot, uitgegroeid, blad werden veel meer G2-cellen aangetroffen (resp. 50% en 45%), terwijl in deze weefsels tamelijk veel polyploide cellen aanwezig waren (resp. 11% en 14%). In de onderzochte stengeltoppen (meristeem en directe omgeving) werden 2 (= 2%) polyploide cellen aangetroffen. In dit weefsel is de verhouding tussen G1- en G2-cellen moeilijk te schatten, maar het lijkt niet overdreven te stellen, dat er minstens evenveel G2-cellen in aanwezig zijn als in de onderzochte kleine blaadjes, terwijl er daarnaast een aanzienlijk aantal cellen in synthese is. Om deze redenen is in het vervolg van de proef slechts gebruik gemaakt van kleine, nog niet uitgegroeide blaadjes.

Behandeling van stengeltoppen met MS 10 met syntheseremmer blijkt niet te leiden tot een verhoging van het aantal G1-cellen in dit materiaal (figuur 2). De onderzochte kleine blaadjes van plantjes die zes dagen behandeld waren bezaten allen minder G1-cellen dan het uitgangsmateriaal (49-62%). Van op deze manier behandelde blaadjes is niet uitgelegd op M 308.

Ook behandeling van bladstukjes met M 308 en syntheseremmer blijkt niet succesvol (figuur 3). Het aantal G1-cellen neemt bij deze behandelingsmethoden niet toe. Er werd zelfs een afname van het aantal G1-cellen waargenomen, terwijl er bij de behandelingen met hydroxyurea (zowel 4 als 0.4 mg/ml medium) een toename van het aantal polyploide kernen werd vastgesteld (8-40%). Bij de behandeling met fluorodeoxyuracil werd geen polyploidisatie waargenomen, naarmate de behandeling langer werd voortgezet nam het aantal in synthese- of G2-fase verkerende cellen echter toe. Op deze wijze behandelde explantaten zijn in het vervolg van de proef niet gebruikt.

De resultaten van de behandelingsmethoden met wateragar met of zonder syntheseremmer zijn weergegeven in figuur 4. Bij gebruik van de laagste concentratie HU (0.4 mg/ml medium) blijkt na drie dagen het aantal G2-cellen te zijn toegenomen terwijl er enige (6%) polyploide cellen aantoonbaar zijn. Naarmate de explantaten langer op deze manier worden behandeld, worden meer G1-cellen aangetroffen, terwijl na 10 dagen geen polyploide cellen meer aantoonbaar zijn. In deze explantaten werden na 10 dagen meer G1-cellen aangetroffen dan in het uitgangsmateriaal (behandeld : 86%, uitgangsmateriaal : 77%). Bij gebruik van de hogere concentratie HU (4 mg/ml) blijkt het materiaal bij voortdurende behandeling steeds meer G1-cellen te bevatten (na 3, 6 en 10 dagen resp. 85%, 94% en 97%). Ditzelfde effect treedt in iets mindere mate op in het contrôlemateriaal, uitgelegd op wateragar zonder toevoegingen (na 3, 6 en 10 dagen resp. 74%, 86% en 84% G1-cellen). Het materiaal, dat behandeld werd met wateragar en FdU geeft over het algemeen het volgende beeld : Na 3 dagen is de verhouding G1-G2-cellen grofweg hetzelfde als in het uitgangsmateriaal. Na 6 en 10 dagen verandert de verhouding door een toename van het aantal G2-cellen. Deze verschuiving lijkt eerder op te treden en groter te zijn naarmate de gebruikte concentratie FdU lager is.

Van de met wateragar met of zonder syntheseremmer behandelde explantaten werd een aantal na 10 dagen behandeling overgelegd op M 308 voor callusinductie. Dit gebeurde met explantaten van alle behandelingsmethoden, behalve die met de laagste concentratie HU (0.4 mg/ml) en die met de laagste concentratie FdU (0.01 mg/ml). Omdat aan de uitgelegde explantaten geen callus groeide (tot ± 40 dagen na uitleggen op M 308), kunnen over dergelijke calli geen resultaten gepresenteerd worden.

Alle drie behandelingsmethoden die uitgaan van WA 10/BAP (geen toevoeging; met HU 2 mg/ml; met FdU 0.20 mg/ml) geven onderling ongeveer hetzelfde beeld te zien (figuur 5) : een snelle toename van het aantal G1-cellen binnen 5 dagen na uitleggen van de blaadjes. Het percentage G1-cellen loopt hierbij

op tot 93% (geen toevoeging), 97% (HU 2mg/ml) en 96% (FdU 0.20 mg/ml). Op alle dagen dat van deze explantaten materiaal gefixeerd is, is ook een aantal explantaten overgelegd op M 308, voor callusinductie.

Van de op WA 10/BAP met of zonder syntheseremmer voorbehandelde explantaten vormden de explantaten, die met FdU (0.20 mg/ml) voorbehandeld waren, geen callus. Dit materiaal is zes weken aangehouden op M 308. Na 4 weken was blaasjesvorming zichtbaar, hetgeen vaak een voorloper van callusvorming is. Aangezien na 6 weken nog geen goed callus zichtbaar was, is deze methode als te langdurig bestempeld en gestopt. Het op WA 10/BAP met HU (2 mg/ml) en het op WA 10/BAP zonder toevoeging voorbehandelde materiaal leverde in  $\pm$  2 weken 1-5 calli per explantaat op. Dit is vergelijkbaar met niet voorbehandeld materiaal.

In figuur 6 zijn de resultaten weergegeven van het contrôlemateriaal (calli van niet voorbehandelde explantaten van 7322 en 860040). Hierbij is per callus het aantal cellen berekend, dat een arbitraire DNA-waarde boven het 2C-niveau bevatte. Dit is het aantal cellen dat aantoonbaar polyploid is. Het gemiddelde gehalte aan dit soort cellen is voor de 7322-calli (van speldeknoop-grootte) 57.7% en voor de 860040-calli 57.3%. De aanname dat deze genotypen zich ongeveer gelijkwaardig gedragen in dit soort kweek lijkt dus niet ongerechtvaardigd.

Het percentage aantoonbaar polyploide cellen werd in de calli van voorbehandelde explantaten lager gevonden dan in calli van niet voorbehandelde explantaten (figuren 7 en 8, tabellen 2 en 3). Dit geldt voor alle voorbehandelingsmethoden waarbij callus gekweekt werd. De gemiddelde percentages aantoonbaar polyploide cellen lopen uiteen van 27-36% bij voorbehandeling op WA 10/BAP met HU (2mg/ml) en van 32-37% bij voorbehandeling op WA 10/BAP zonder syntheseremmer. Als men de voorbehandelingsmethoden (met en zonder HU) onderling vergelijkt (telkens even lange voorbehandeling vergelijken), blijkt dat na 3 en na 5 dagen voorbehandeling met HU "beter" callus verkregen wordt dan na een

even lange periode voorbehandeling zonder HU (tabel 4). Na 4 dagen voorbehandeling is het percentage aantoonbaar polyploide cellen gemiddeld lager in calli van zonder HU voorbehandeld materiaal, dit verschil is echter niet significant.

### Conclusies en discussie

Het blijkt mogelijk te zijn meer G1-cellen te verkrijgen in bladexplantaten door het materiaal voor te behandelen. De verkregen hoeveelheid G1-cellen blijkt zowel af te hangen van de gebruikte syntheseremmer als van het medium, waarop de explantaten worden voorbehandeld. Ook het aantal dagen dat de behandeling wordt uitgevoerd is van invloed op het resultaat. Helaas is vergelijking met bestaande literatuur niet mogelijk omdat dit soort literatuur niet gevonden kon worden. Hierdoor is het niet goed mogelijk de "waarde" van de verkregen resultaten aan te geven.

De behandelingsmethode die uitgaat van het voorbehandelen van stengeltoppen op MS 10 met syntheseremmer leverde niet het gewenste resultaat op. Het aantal G1-cellen bleek in kleine blaadjes van aldus behandelde stengeltoppen kleiner te zijn dan in soortgelijke blaadjes van niet behandelde toppen.

Van de in dit onderzoek voor voorbehandeling van bladexplantaten gebruikte media lijkt M 308 zeer slecht te gebruiken voor voorbehandeling met syntheseremmers. Alle op dit medium met syntheseremmer uitgelegde explantaten bezaten na de behandeling een groter aantal G2-cellen dan voor de behandeling, terwijl de met hydroxyurea behandelde explantaten daarnaast nog een aantal polyploide cellen bevatten.

Wateragar lijkt voor de behandeling met syntheseremmers goed te gebruiken. Alleen de behandelingsmethoden met fluorodeoxyuracil waren hier niet succesvol. Dat het materiaal ook op wateragar zonder syntheseremmer meer G1-cellen krijgt is tamelijk onverwacht, omdat op wateragar met FdU geen gunstig resultaat verkregen werd. Voor calluskweek bleek in dit onderzoek de voorbehandeling op wateragar met of zonder syntheseremmer onbruikbaar : op deze manier voorbehandelde explantaten vormden geen callus.

De voorbehandelingsmethoden op wateragar met daaraan

toegevoegd 10 g/l sucrose (energiebron) en 0.1 mg/l BAP (delingsstimulator) lijkt alleszins het meest succesvol van de gebruikte voorbehandelingsmethoden. Relatief snel werd het aantal G1-cellen verhoogd, terwijl na overleggen op M 308 de explantaten normaal callus vormden. Slechts de met FdU voorbehandelde explantaten vormden geen callus, mogelijk door een te hoge concentratie FdU.

Calli, die gevormd werden aan voorbehandelde explantaten (voorbehandeling op WA 10/BAP, al of niet met HU) bleken minder aantoonbaar polyploide cellen te bevatten dan calli, gevormd aan niet voorbehandelde explantaten. Hoewel de resultaten niet eenduidig zijn lijkt het erop dat met HU voorbehandeld materiaal beter (minder polyploid) callus vormt dan zonder HU voorbehandeld materiaal.

Als belangrijkste conclusies van dit onderzoek komen twee dingen naar voren. Ten eerste blijkt het mogelijk te zijn door voorbehandeling beter, d.w.z. minder polyploid, callus te kweken. Ten tweede blijkt, dat callus met geen of zeer weinig polyploide cellen op deze manier niet bereikt wordt. Omdat het uitgangsmateriaal in dit onderzoek sterk verbeterd was (tot 97% G1-cellen), ligt het voor de hand te concluderen, dat het uitgangsmateriaal niet de enige factor is die de stabiliteit van het gekweekte callus bepaald. De meest logische stap om te komen tot een nog meer verbeterd callus lijkt dan ook te liggen in het variëren van het callusinducerende medium. Daarnaast kan gebruik gemaakt worden van voorbehandelingsmethoden als in dit onderzoek beschreven. Vooral de methoden met als basis WA 10/BAP lijken hiervoor bruikbaar. Interessant zou hierbij zijn om op dit medium voor te behandelen met FdU in een lagere concentratie dan hier gebruikt. Bij gebruik van FdU in dit onderzoek viel weliswaar op, dat het de synthese niet geheel stil kon leggen, maar bij voorbehandeling met FdU werd nooit polyploidisatie waargenomen. Ook het gebruik van aphidicoline en/of 5-AU (zie inleiding) zou te proberen zijn. Een andere mogelijkheid om te komen tot nog beter uitgangsmateriaal zou het gebruik van een hogere



concentratie BAP in het voorbehandelingsmedium kunnen zijn. Op deze manier zou, door nog meer deling, een nog hoger aantal G1-cellen verkregen kunnen worden. Tenslotte zou het gebruik van andere genotypen mogelijk kunnen helpen om te komen tot meer haploid callus.

Literatuur.

- Bayliss MW (1980) Chromosomal variation in plant tissues in culture. In : Vasil IK : Perspectives in plant cell and tissue culture. Int Rev Cytol Suppl IIA: 113-144
- Cortés F, Escalza P, Sosa MD, López-Campos JL (1983) Cytological demonstration of DNA synthesis inhibition at late S by 5-Amino-aracil. Exp Cell Res 148: 503-507
- D'Amato F (1952) New evidence on endopolyploidy in differentiated plant tissues. Caryologia 4: 121-147
- D'Amato F (1985) Cytogenetics of plant cell and tissue cultures and their regenerants. CRS Crit Rev Plant Sci 3: 73-112
- Downie NM, Heath RW (1974) Basic statistical methods (fourth edition). Harper & Row, New York Evanston San Francisco London
- Eriksson T (1966) Partial synchronisation of cell division in suspension cultures of Haplopappus gracilis. Physiol Plant 19: 900-910
- Fosket DE, Short KC (1973) The role of cytokinin in the regulation of growth, DNA synthesis and cell proliferation in cultured soybean tissue (Glycine max var. Biloxi). Physiol Plant 28: 14-23
- Gould AR, Everett NP, Wang TL, Street HE (1981) Studies on the control of the cell cycle in cultured plant cells I: Effects of nutrient limitation and nutrient starvation. Protoplasma 106: 1-13
- Grafl L (1939) Kernwachstum durch Chromosomenvermehrung als regelmässiger Vorgang bei Gewebedifferenzierung. Chromosoma 1: 265-275
- Guri A, Zelcer A, Izhar S (1984) Induction of high mitotic index in Petunia suspension cultures by sequential treatment with aphidicolin and colchicine. Plant Cell Reports 3: 219-221
- Jacobsen E (1981) Polyploidisation in leaf callus and in regenerated plants of dihaploid potato. Plant Cell Tissue Organ Cult 1: 77-84

- Jacobsen E, Tempelaar MJ, Bijmolt EW (1983) Ploidy levels in leaf callus and regenerated plants of Solanum tuberosum determined by cytofotometric measurements of protoplasts. *Theor Appl Genet* 65: 113-118
- Levan A (1939) Cytological phenomena connected with the root swelling caused by growthsubstances. *Hereditas* XXV: 87-96
- Nagl W (1972) Evidence of DNA amplification in the orchid Cymbidium *in vitro*. *Cytobios* 5: 145-154
- Nagl W (1978) Endopolyploidy and polyteny in differentiation and evolution. North-Holland, Amsterdam New York Oxford
- Navarrete MH, Cuadrado A, Canovas JL (1983) Partial elimination of G1 and G2 periods in higher plant cells by increasing the S period. *Exp Cell Res* 148: 273-280
- Nishinari N, Ogawa M, Syono K (1982) Synchronous culture and changes in endogenous cytokinin levels during the cell cycle in tobacco cells. In : *Plant Tissue Culture 1982*. Japanese Association for Plant Tissue Culture, Tokyo 1982. Edited by A. Fujiwara. pp. 205-206
- Nishinari N, Syono K (1986) Induction of cell division synchrony and variation in cytokinin contents through the cell cycle in tobacco cultured cells. *Plant Cell Physiol* 27(1): 147-153
- Pijnacker LP, Walch K, Ferwerda MA (1986) Behaviour of chromosomes in potato leaf tissue cultured *in vitro* as studied by BrdC-Giemsa labelling. *Theor Appl Genet* 72: 833-839
- Sala F, Galli MG, Nielsen E, Magnien E, Devreux M, Pedrali-Noy G, Spadari S (1983) Synchronisation of nuclear DNA synthesis in cultured Daucus carota L. cells by aphidicolin. *FEBS Lett* 153: 204-208
- Sree Ramulu K, Dijkhuis P, Roest S, Bokelman GS, de Groot B (1984) Early occurrence of genetic instability in protoplast cultures of potato. *Pl Sci Lett* 36: 79-86
- Sree Ramulu K, Dijkhuis P (1986) Flow cytometric analysis of polysomaty and *in vitro* genetic instability in potato. *Plant Cell Reports* 3: 234-237

Tempelaar MJ (1980) DNA-content in isolated nuclei of post-embryonic stages of progeny from normal and irradiated males of Tetranychus urticae Koch (Acari, Tetranychidae). Chromosoma 77: 359-371

F I G U R E N

E N

T A B E L L E N

Tabel 1 : Gebruikte methoden van behandeling van bladexplantaten ter verkrijging van meer G1-cellen bevattend materiaal.

	media		
	M 308	WA	WA 10/Bap
syntheseremmers (mg/ml medium)			
HU : 0.4	+	+	-
2.0	-	-	+
4.0	+	+	-
FdU : 0.01	+	+	-
0.05	-	+	-
0.10	-	+	-
0.20	-	+	+
0.00 (contrôle)	-	+	+

+ = Deze combinatie van medium en syntheseremmer werd voor behandeling gebruikt.

- = Deze combinatie werd niet gebruikt.

Tabel 2 : Vergelijking van de percentages aantoonbaar polyploide cellen in calli, ontstaan uit 3-5 dagen met WA 10/BAP voorbehandelde explantaten van de monohaploide ( $2n=x=12$ ) aardappel, lijn 860040 met de percentages in calli, ontstaan uit niet (= 0 dagen) voorbehandelde explantaten van hetzelfde genotype.

Aantal dagen voorbehandeling:			
0	3	4	5
Percentages aantoonbaar polyploide cellen in afzonderlijke calli			
29	19	12	15
34	24	15	16
35	24	16	20
38	24	17	20
39	27	20	24
39	32	24	27
41	32	28	28
42	35	28	28
43	36	32	28
46	36	32	28
47	40	32	32
49	44	32	32
50	44	36	35
50	44	36	36
53	48	44	36
54	56	48	36
54	56	48	40
54		48	44
59		64	44
60			44
63			48
64			52
64			55
74			56
74			60
87			68
89			
93			
95			
100			
Mann-Whitney toets (kolom 0 vergeleken met elke andere)	U= 90.5 Z= -3.6 p< 0.01	U= 74 Z= -4.3 p<0.01	U= 150 Z= -3.9 p< 0.01

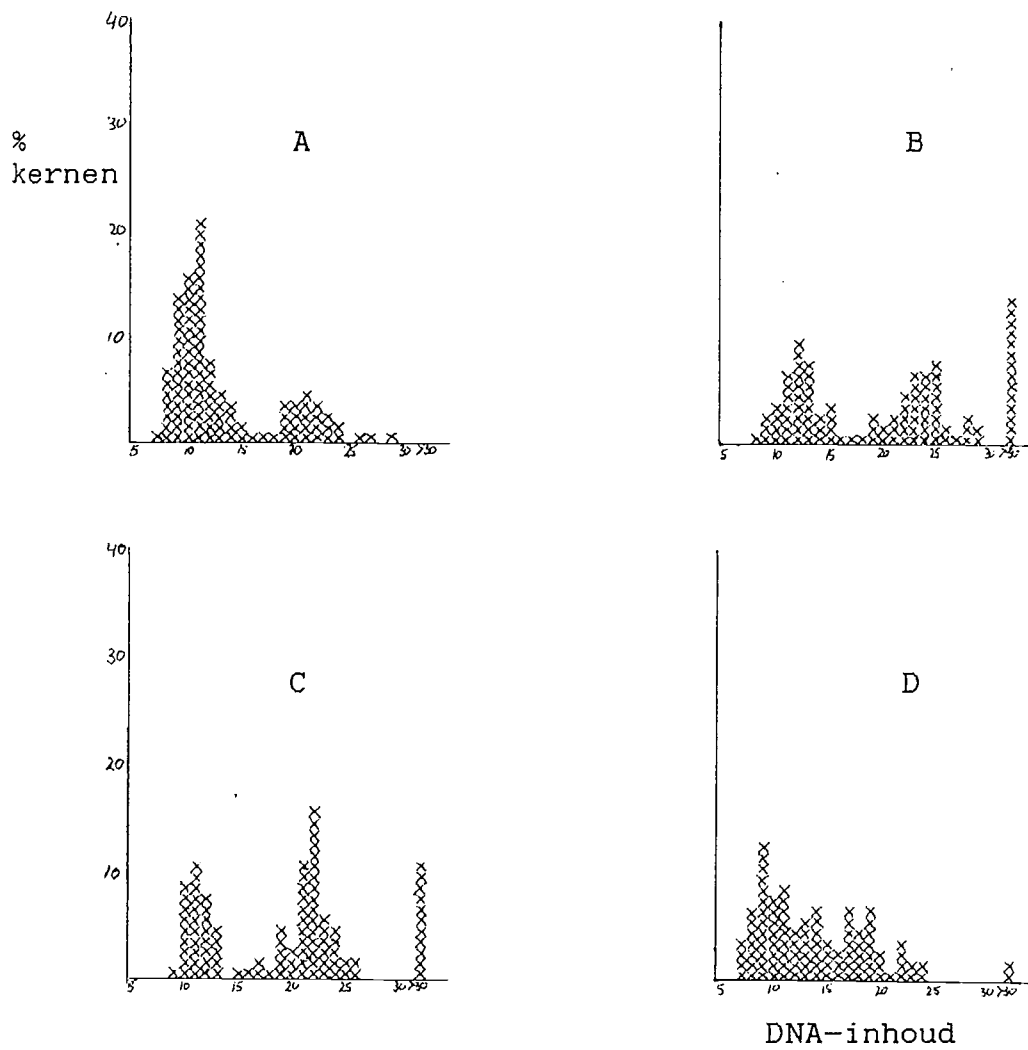
Tabel 3 : Vergelijking van de percentages aantoonbaar polyploide cellen in calli, ontstaan uit 3-5dagen met WA 10/BAP met HU (2 mg/ml) voorbehandelde explantaten van de monohaploide ( $2n=x=12$ ) aardappel, lijn 860040 met de percentages in calli, ontstaan uit niet (= 0 dagen) voorbehandelde explantaten van hetzelfde genotype.

Aantal dagen voorbehandeling:			
0	3	4	5
Percentages aantoonbaar polyploide cellen in afzonderlijke calli			
29	12	8	16
34	16	12	16
35	20	24	16
38	20	24	20
39	20	28	20
39	24	32	24
41	24	32	24
42	24	35	24
43	24	36	24
46	24	43	24
47	25	44	28
49	28	48	28
50	28	52	28
50	32	60	32
53	33	64	32
54	36		32
54	36		33
54	36		36
59	61		40
60			48
63			
64			
64			
74			
74			
87			
89			
93			
95			
100			
Mann-Whitney toets (kolom 0 vergeleken met elke andere)	U= 31 Z= -5.2 p< 0.01	U= 91.5 Z= -3.2 p<0.01	U= 24 Z= -5.5 p< 0.01

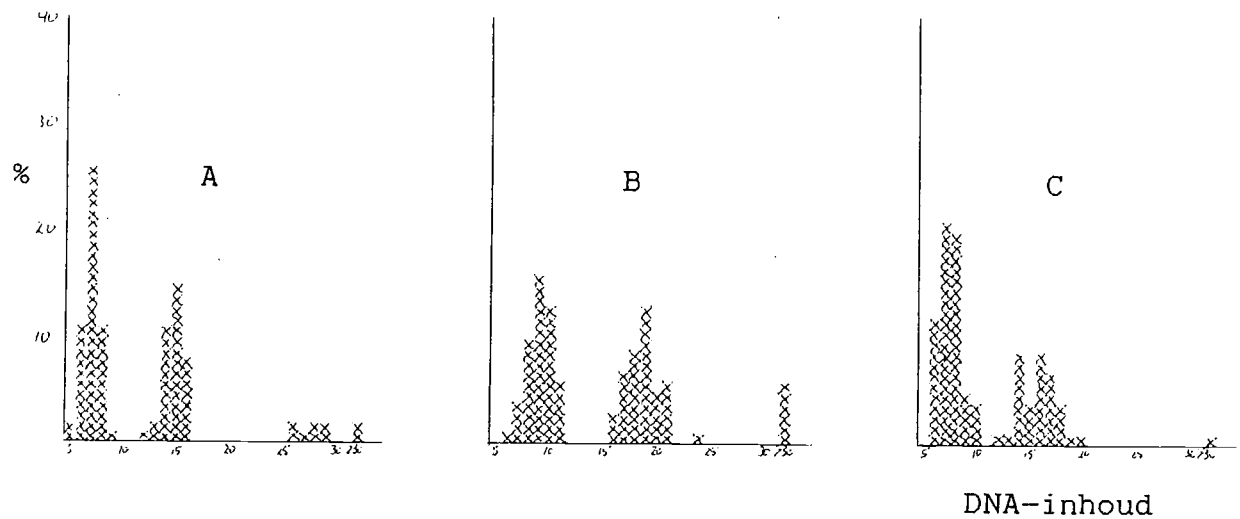


Tabel 4 : Vergelijking van de percentages aantoonbaar polyploide cellen in calli, ontstaan uit 3-5dagen met WA 10/BAP met HU (2 mg/ml) voorbehandelde explantaten van de monohaploide (2n=x=12) aardappel, lijn 860040 met de percentages in calli, ontstaan uit 3-5 dagen met WA 10/BAP zonder HU voorbehandelde explantaten van het zelfde genotype.

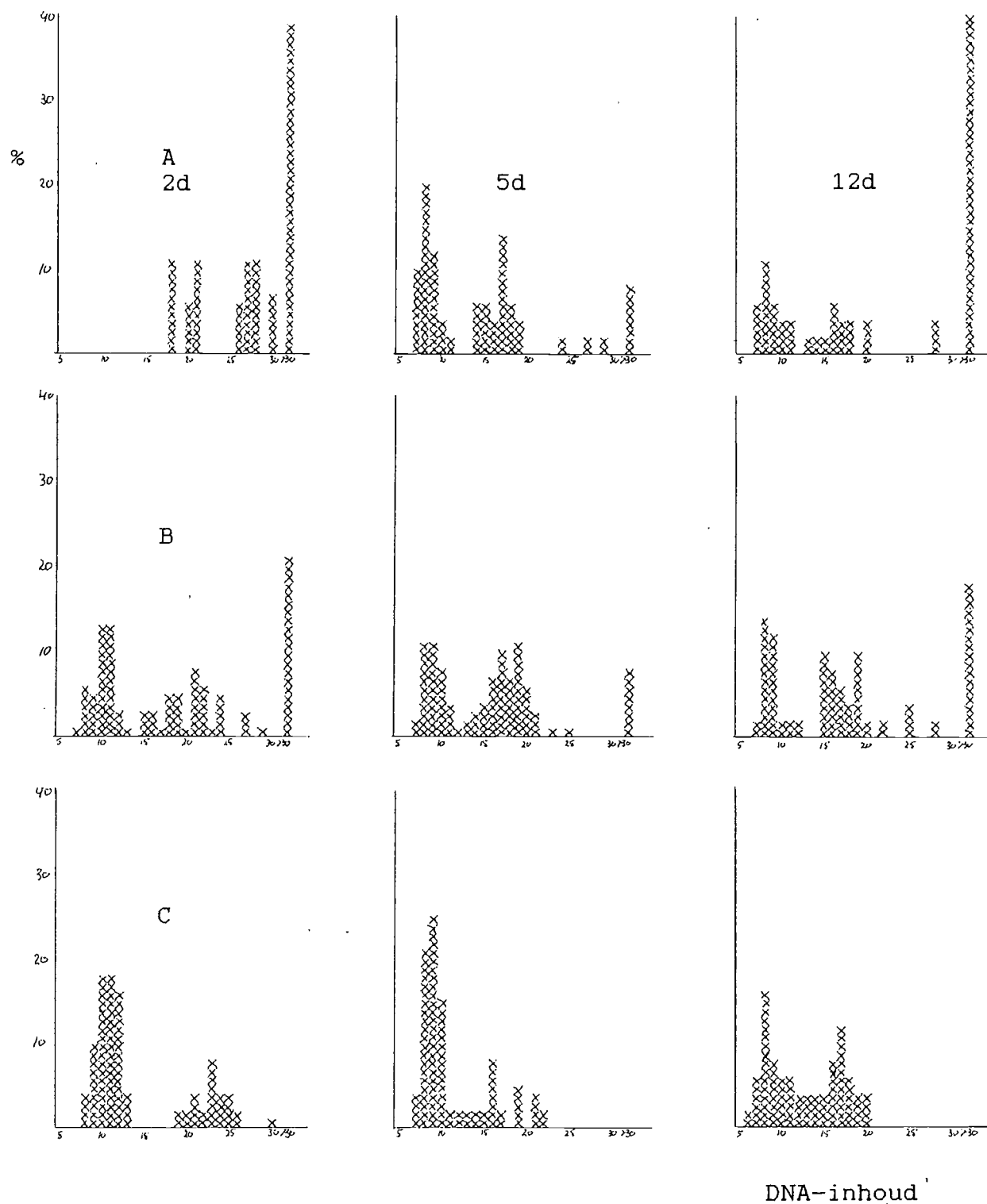
Percentages aantoonbaar polyploide cellen in afzonderlijke calli					
3 dagen		4 dagen		5 dagen	
+ HU	- HU	+ HU	- HU	+ HU	- HU
12	19	8	12	16	15
16	24	12	15	16	16
20	24	24	16	16	20
20	24	24	17	20	20
20	27	28	20	20	24
24	32	32	24	24	27
24	32	32	28	24	28
24	35	35	28	24	28
24	36	36	32	24	28
24	36	43	32	24	28
25	40	44	32	28	32
28	44	48	32	28	32
28	44	52	36	32	35
32	44	60	36	32	36
33	48	64	44	32	36
36	56		48	33	36
36	56		48	36	40
36			48	40	44
61			64	48	44
					44
					48
					52
					55
					56
					60
					68
Mann-Whitney toets :		Mann-Whitney toets :		Mann-Whitney toets :	
U= 86.5		U= 122		U= 101.5	
p< 0.05		n.s.		Z= -2.33	
				p< 0.01	



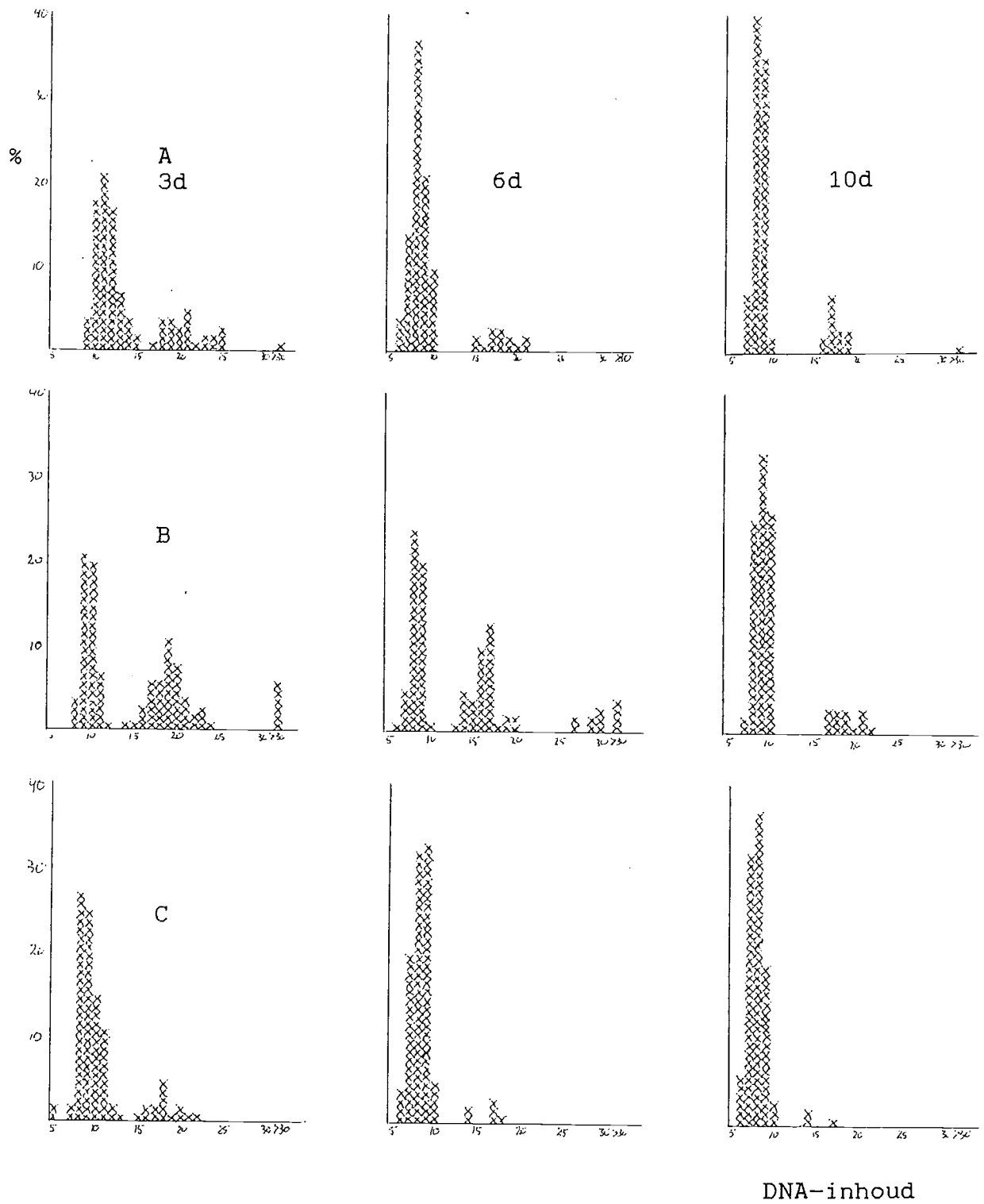
Figuur 1 : Frequentieverdeling van de arbitraire DNA-inhoud van kernen in verschillende weefsels van de monohaploide aardappellijn 7322. A= klein blad, B= groot blad, C= stengelstukje, D= stengeltop.



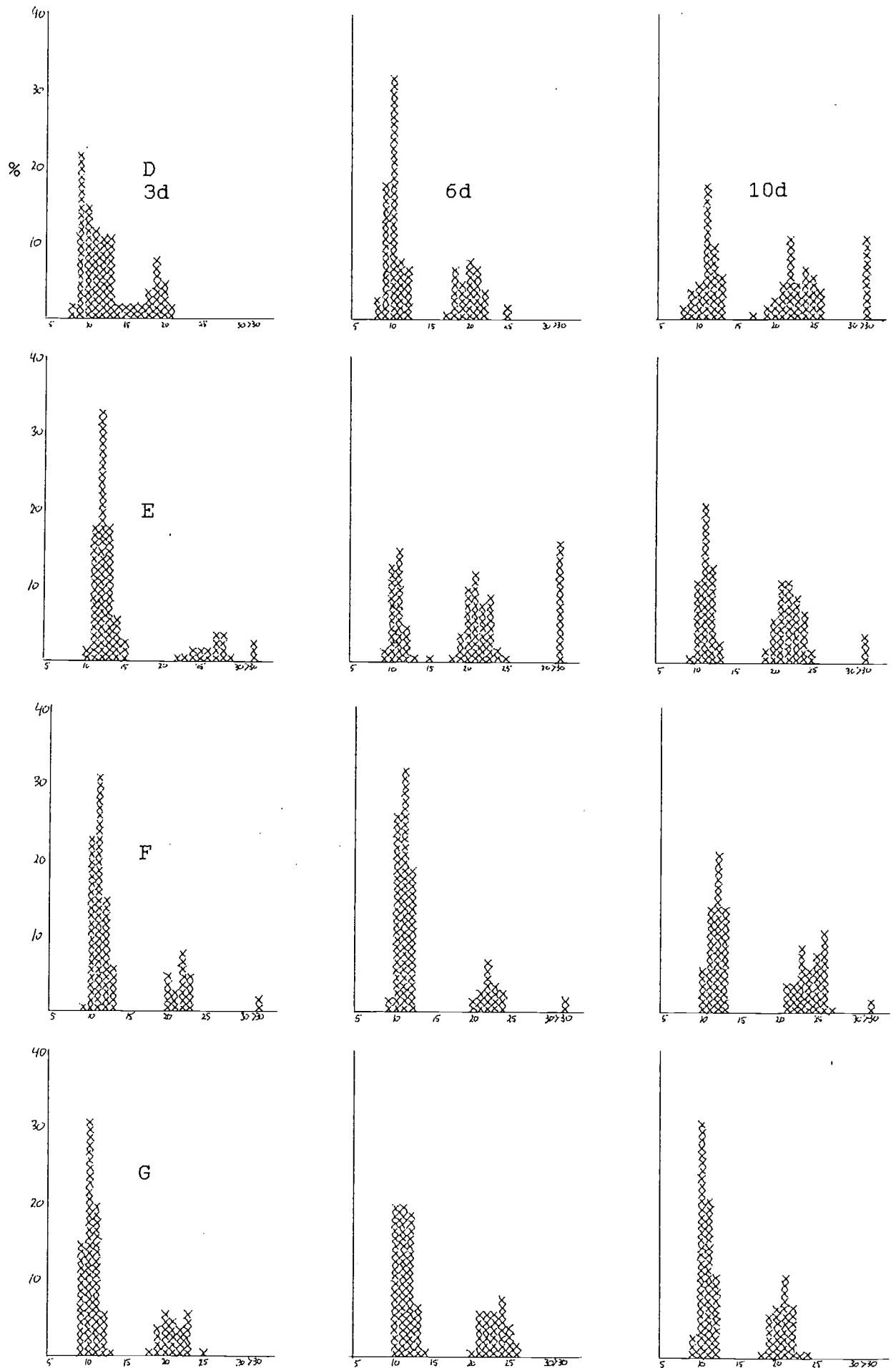
Figuur 2 : Frequentieverdeling van de arbitraire DNA-inhoud van kernen in kleine blaadjes van 6 dagen op MS 10 met syntheseremmer behandelde stengeltoppen. A= behandeld met HU 0.4 mg/ml, B= met HU 4 mg/ml, C= met FdU 0.01 mg/ml.



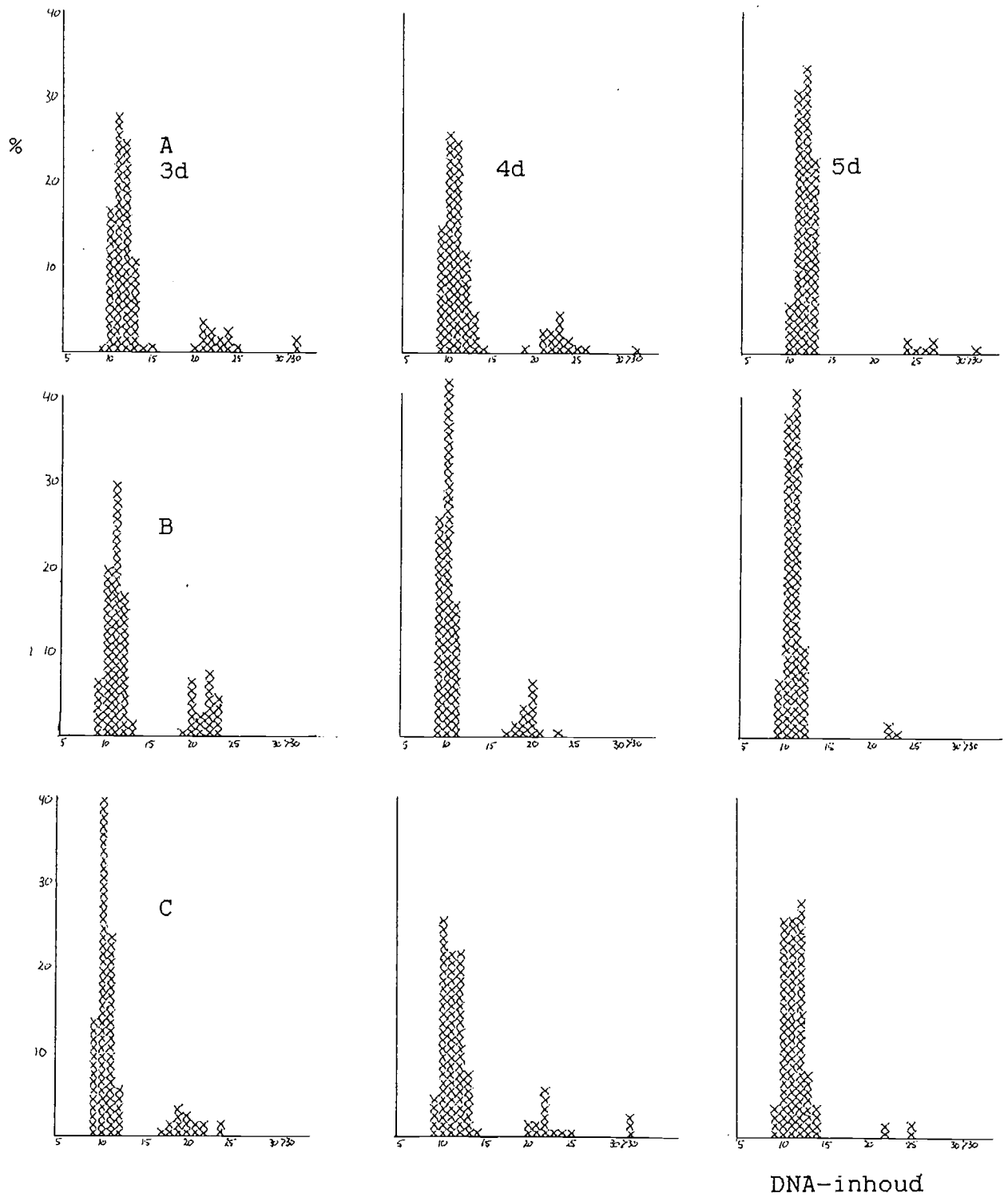
Figuur 3 : Frequentieverdeling van de arbitraire DNA-inhoud van kernen van 2-12 dagen op M 308 met syntheseremmer behandelde bladexplantaten. A= met HU 0.4 mg/ml, B= met HU 4 mg/ml, C= met FdU 0.01 mg/ml.



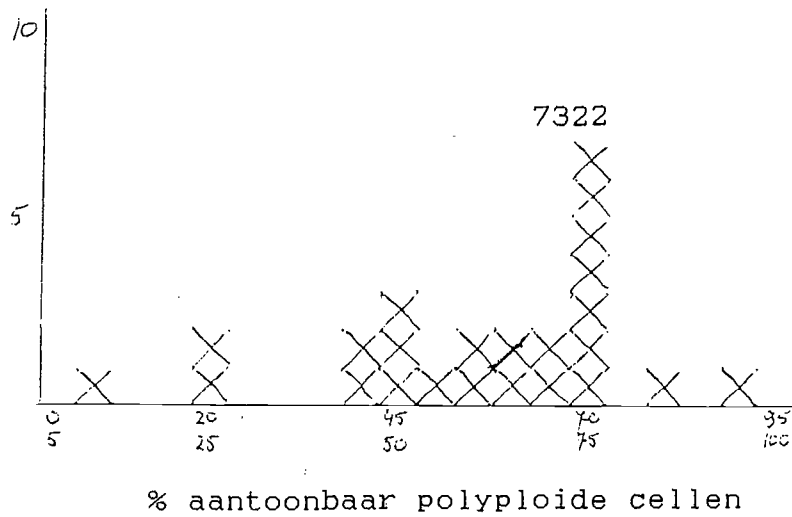
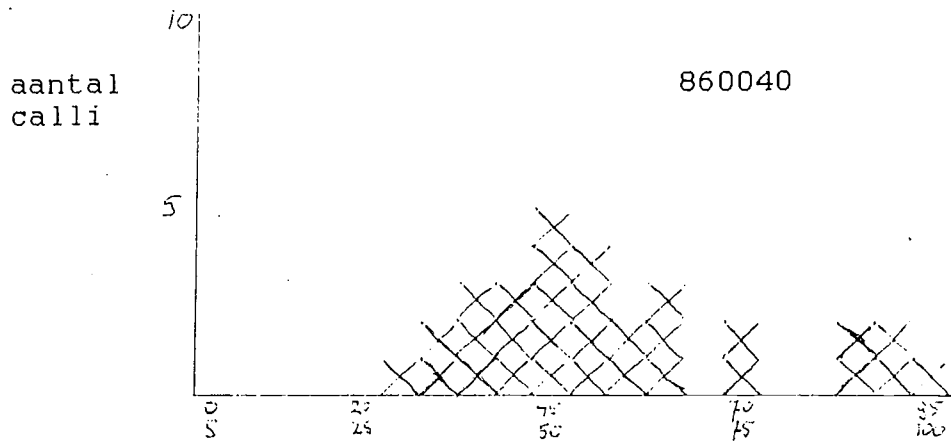
Figuur 4 : Frequentieverdeling van de arbitraire DNA-inhoud van kernen van 3-10 dagen op Wateragar met syntheseremmer behandelde bladexplantaten. A= zonder syntheseremmer, B= met HU 0.4 mg/ml, C= met HU 4 mg/ml, D= met FdU 0.01 mg/ml, E= met FdU 0.05 mg/ml, F= met FdU 0.10 mg/ml, G= met FdU 0.20 mg/ml



Figuur 4 -vervolg-

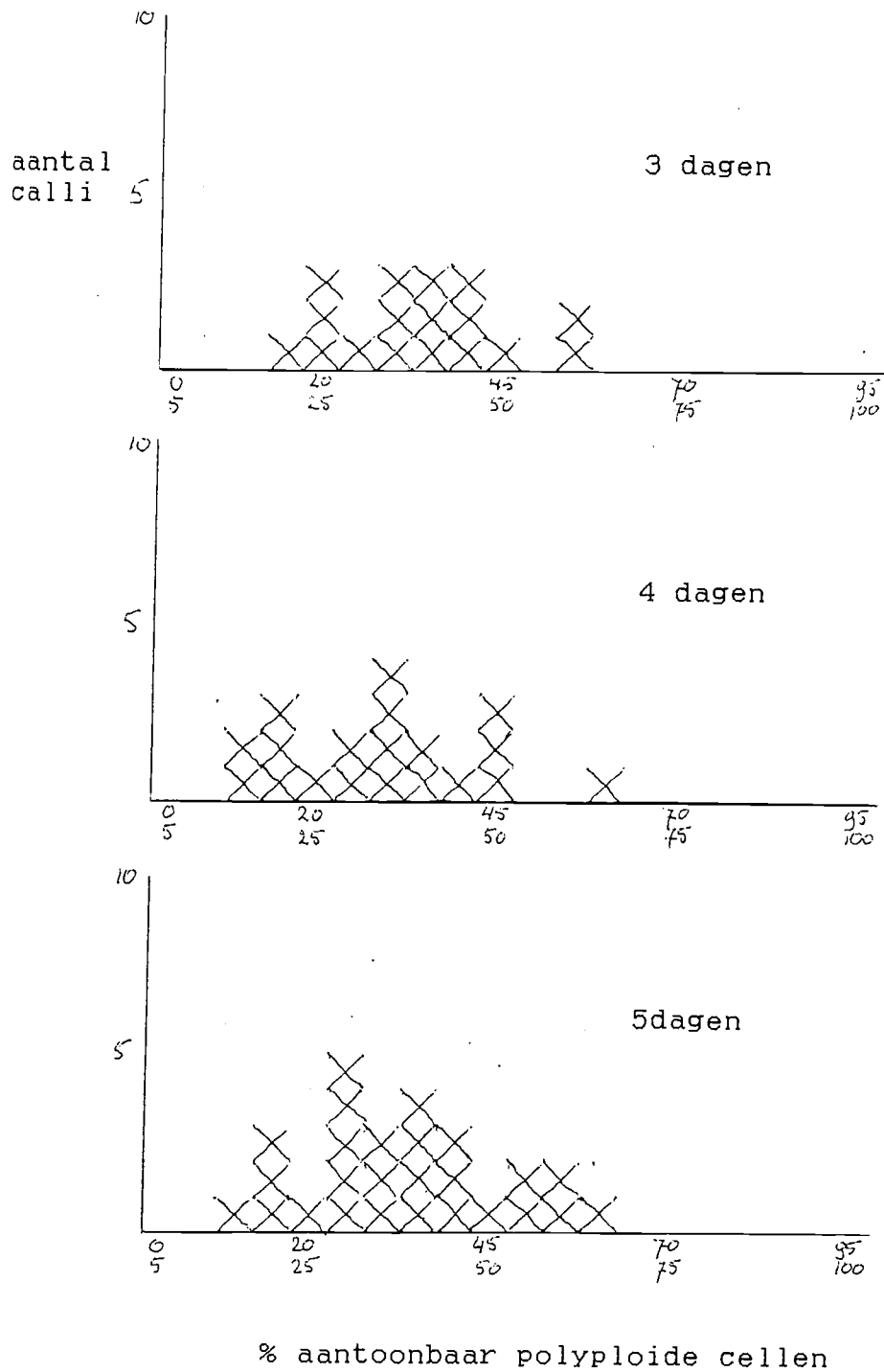


Figuur 5 : Frequentieverdeling van de arbitraire DNA-inhoud van kernen van 3-5 dagen op WA 10/BAP met of zonder syntheseremmer behandelde bladexplantaten. A= zonder syntheseremmer, B= met HU 2mg/ml, C= met FdU 0.20 mg/ml.

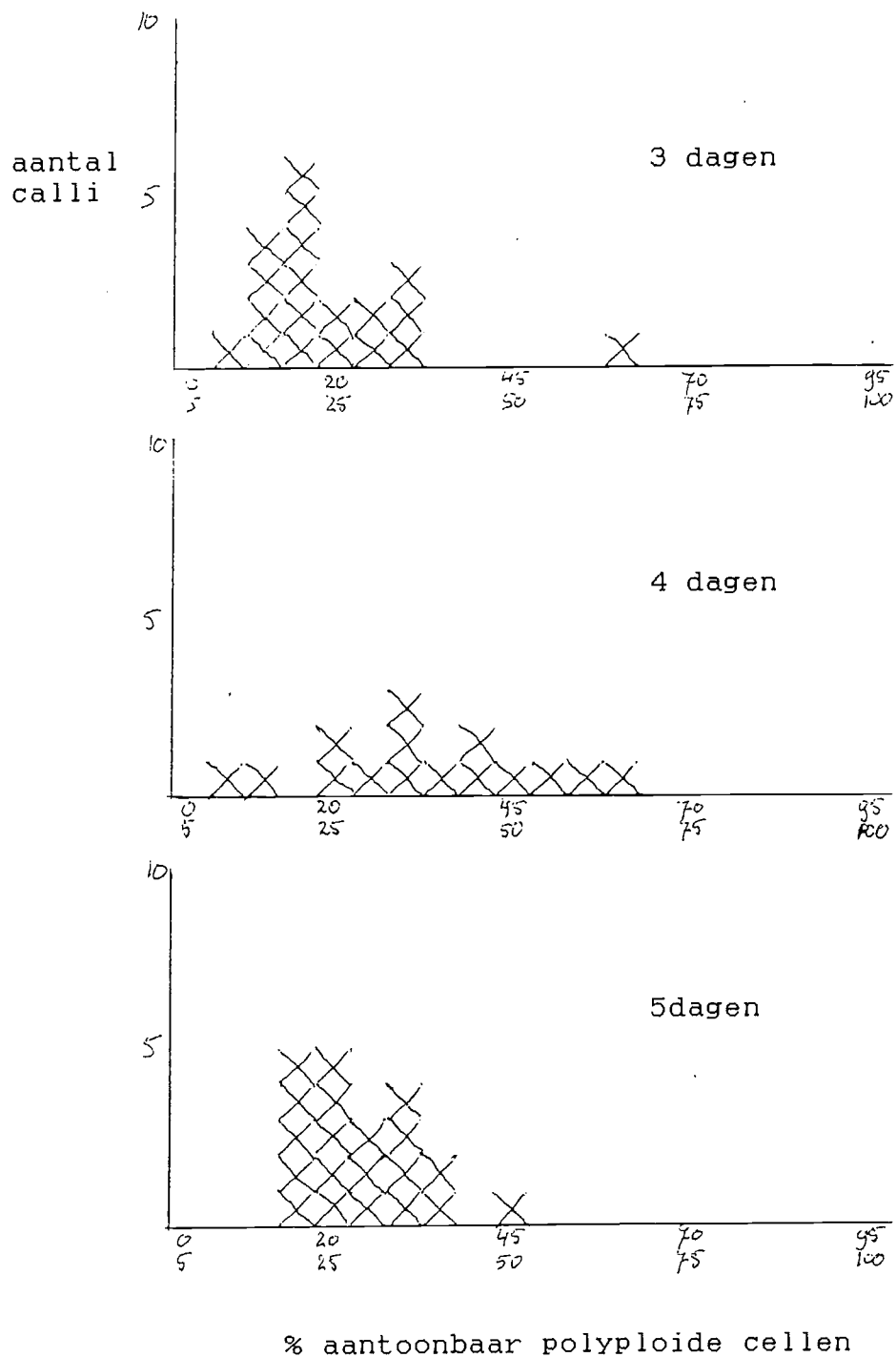


Figuur 6 : Percentages aantoonbaar polyploide cellen in individuele calli, gegroeid aan niet voorbehandelde bladexplantaten van de monohaploide aardappellijnen 860040 en 7322.





Figuur 7 : Percentages aantoonbaar polyploide cellen in individuele calli, gegroeid aan 3-5 dagen met WA 10/BAP zonder syntheseremmer voorbehandelde bladexplantaten van de monohaploide aardappellijn 860040.



Figuur 8 : Percentages aantoonbaar polyploide cellen in individuele calli, gegroeid aan 3-5 dagen met WA 10/BAP met HU 2mg/ml voorbehandelde bladexplantaten van de monohaploide aardappellijn 860040.