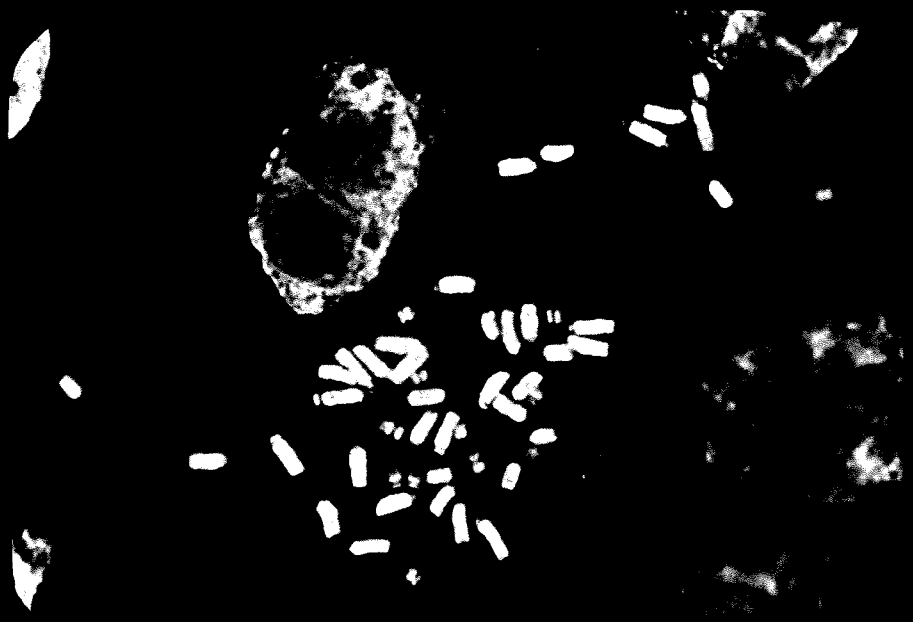
INTERSPECIFIEKE SOMATISCHE HYBRIDISATIE VAN MONOHAPLOIDE SOLANUM TUBEROSUM EN NITRAAT-REDUCTASE DEFICIENTE NICOTIANA PLUMBAGINIFOLIA, EN DE INVLOED VAN PFP, CIPC EN BRDC OP ASYMMETRISCH CHROMOSOOMVERLIES.



ROEL FABER

D 565

D565

INTERSPECIFIEKE SOMATISCHE HYBRIDISATIE VAN MONOHAPLOIDE SOLANUM TUBEROSUM EN NITRAAT-REDUCTASE DEFICIENTE NICOTIANA PLUMBAGINIFOLIA, EN DE INVLOED VAN PFP, CIPC EN BrdC OP ASYMMETRISCH CHROMOSOOMVERLIES.

Doctoraalverslag
van Roel Faber
Begeleiding:
Sytske de Vries
Vakgroep Genetica
Biologisch Centrum
R.U.Groningen
Mei - December 1986

Samenvatting.

In de inleiding worden een aantal methoden besproken om in fusie-experimenten tot chromosoomverlies van de aardappel te kunnen komen. In de experimenten wordt de invloed van een aantal chemicaliën nader onderzocht. Ten eerste zijn de chemicaliën PFP en CIPC getest op scheuten van diploide H7322/2x (2n=2x=24). Vijf dagen incubatie op PFP, in concentraties van 0.55 tot 550 μM, gaf in chromosoompreparaten van H7322/2x geen aanwijsbaar effect te zien. Eenzelfde incubatie op CIPC induceerde vanaf 35 μM verdubbelingen en aneuploidie. In de discussie wordt gesuggereerd om, indien dergelijke experimenten worden herhaald, bij de analyse (flow-)cytofotometrie te gebruiken.

Ten tweede werden in electrofusie-experimenten de bladeren van monoploide H7322 (2n=x=12) voorbehandeld met BrdC. Na fusie met nitraatreductase (NR) deficiente **Nicotiana plumbaginifolia** mutant cnx20 werden de protoplasten bestraald met zichtbaar licht. Geselecteerd werd op groei op nitraat, chloraatresistentie en NR-vivo aktiviteit. Onder de 14 calli die aan chromosoomanalyse werden onderworpen, waren 11 hybride calli waarvan het aantal H7322-chromosomen bij benadering varieerde van ±7 tot ±30. Mede vanwege de gebruikte methode kon chromosoomverlies van H7322, en de invloed van BrdC daarop, niet met zekerheid worden vastgesteld. Er worden een aantal suggesties gedaan om de methode te verbeteren. In vergelijking met eerdere soortgelijke experimenten was het aantal cnx20-chromosomen in de hybriden laag: ±40. Een aantal mogelijke oorzaken hiervoor worden bediscussieerd.

Voorplaat: chromosomen van hybride nr.22 (zie figuur 6, blz.15).

Inhoud.

1.Inleiding 1

1.1.Algemeen 1

1.2.Interspecifieke somatische hybridisatie 1

1.3.Nitraatreductase 1

1.4.Chromosoomverlies 2

1.4.1.Mens-knaagdier systeem 2

1.4.2.Hogere planten 2

1.4.3.Röntgenbestraling 3

1.4.4.BrdC/lichtbestraling 3

1.4.5.Chemische middelen 4

1.5.Doel van dit onderzoek 5

2.Materiaal en methoden. 6

2.1.Plantmateriaal 6

2.1.1.Herkomst 6

2.1.2.Kweek 6

2.2.Chemische inductie van chromosoomverlies 6

2.2.1.Opname van PFP en CIPC door H7322/2x 6

2.2.2.Opname van BrdC door H7322 6

2.3.Protoplasten 7

2.3.1.Protoplastisolatie 7

2.3.2.Electrofusie van protoplasten 7

2.3.3.Regeneratie van protoplasten 7

2.4.Selectie van somatische hybriden 8

2.5.Chromosoomanalyse 8

3.Resultaten. 9

3.1.Invloed van chemische middelen op chromosoomaantal . . . 9

3.1.1.PFP 9

3.1.2.CIPC 9
3.2.Fusie van Cnx20 met H7322/BrdC 9
3.3.Selectie van somatische hybriden 12
3.3.1.Experiment 1. 12
3.3.2.Experiment 2 12
3.4.Chromosoomanalyse 12
3.5.Selectie op chloraat 16
4.Discussie 17
4.1.PFP en CIPC 17
4.2.Chloraatresistentie 17
4.3.BrdC-fusie 18
4.4.Concluderend 19
5.Referentielijst 20
6.Appendix: media 22

1.Inleiding

1.1.Algemeen.

De aardappel (**Solanum tuberosum** L.) is autotetraploid en in hoge mate heterozygoot. Toekenning van genen aan bepaalde chromosomen is daarom zeer moeilijk. Tot nu toe zijn twee genen van de aardappel gelokaliseerd via trisome analyse: het gen **v** voor chlorophyll deficientie op chromosoom 12 (Hermsen **et al.** 1983) en het gen **ym** voor yellow margin ook op chromosoom 12 (Wagenvoort 1982). Bij de hierbij gebruikte methode is het noodzakelijk enkele sexuele kruisingen te analyseren: allereerst wordt de trisome lijn gekruist met een homozygoot recessieve lijn, waarna de trisome F1 nakomelingen weer teruggekruist worden met dezelfde recessieve lijn (zie eerder genoemde referenties). Het spreekt voor zich dat dit een tijdrovend karwij is. De somatische celgenetica zou daarom een goede bijdrage kunnen leveren aan de genkartering van de aardappel.

1.2.Interspecifieke somatische hybridisatie.

Somatische hybridisatie is het proces waarbij somatische (=asexuele) cellen gefuseerd worden. Fusie van twee protoplasten resulteerd in een heterokaryon. Als daaropvolgend kernversmelting plaatsvindt, ontstaat een synkaryon dat genetisch materiaal van beide ouders bevat. Vindt deze kernversmelting niet plaats, dan kunnen de kernen bij celdeling segregeren in aparte cellen. Cybride cellen zijn dan het resultaat, met het cytoplasma van beide ouders maar met de kern van één van de ouders. De fusie is interspecifiek als de beide oudercellen van verschillende soorten afkomstig zijn. Dit om onderscheid te maken met fusie van cellen afkomstig van dezelfde soort (=intraspecifiek, bv. de Vries **et al.** 1987[a]).

Fusie van somatische plantencellen kan op verschillende manieren geïnduceerd worden: met behulp van poly-ethyleenglycol (PEG) (Imamura **et al.** 1987, Potrykus **et al.** 1984, de Vries **et al.** 1987[c]); een hoog-pH medium met een hoge concentratie calciumionen (Keller & Melchers 1973, Pental **et al.** 1987); een combinatie van deze twee methoden (Chien **et al.** 1982, Gleba **et al.** 1984, Kao 1977); en electrofusie. Electrofusie is een betrekkelijk nieuwe techniek maar wordt met succes toegepast (Tempelaar & Jones 1985[abc], Bates **et al.** 1987, van Everdink 1987, Tempelaar **et al.** 1987, de Vries **et al.** 1987[ab]).

1.3.Nitraatreductase.

De reductie van nitraat tot nitriet wordt gekatalyseerd door het enzym nitraatreductase (NR). Inductie van dit enzym vindt plaats door het substraat (nitraat). Het model dat de structuur en genetische regulatie van NR beschrijft, is ontwikkeld voor de schimmel **Aspergillus nidulans**, maar ook als toepasbaar op hogere planten geaccepteerd (Müller & Grafe 1978). Het enzym NR wordt

geacht uit twee identieke subunits te bestaan (4S haemoflavoproteïnen) die beide cytochroom-c-reductase (CcR) aktiviteit bezitten. Deze subunits worden samen gehouden door een molybdeen (Mo) bevattende cofactor. Deze cofactor komt ook in andere enzymen voor, zoals bijvoorbeeld xanthine dehydrogenase (XDH).
NR kan ook chloraat omzetten in het giftige chloriet. Daarom kunnen NR^-mutanten verkregen worden door cellijnen te selecteren op chloraatresistentie. Op deze manier zijn verschillende NR^- mutante cellijnen geïsoleerd van o.a. Nicotiana plumbaginifolia (Negrutiu et al. 1983). Deze mutanten kunnen in twee fenotypisch verschillende klassen ondergebracht worden: cnx-mutanten, die gestoord zijn in de Mo-cofactor en daarom geen XDH-activiteit meer hebben, en nia-mutanten, die geen functioneel apo-enzym hebben en dus ook geen CcR-activiteit meer bezitten. Van de nia-mutanten wordt slechts één gen verantwoordelijk geacht voor de synthese van het apo-enzym. Dit in tegenstelling tot de cnx-mutanten, waarin vier verschillende complementatiegroepen zijn gevonden: cnxA,waarvan de cofactor (en dus NR) te herstellen is door toevoeging van Mo aan het medium, en cnxB, cnxC en cnxD, waarvan de cofactor niet met Mo te herstellen is (Dirks et al. 1985). Enkele van deze NR^-mutanten van N. plumbaginifolia zijn biochemisch nader gekarakteriseerd (de Vries et al. 1986).

1.4.Chromosoomverlies.

1.4.1.Mens-knaagdier systeem.

Het bewerkstelligen van asymmetrisch chromosoomverlies in interspecifieke somatische hybriden van menselijke cellen met auxotrophe muizecellen of Chinese hamstercellen is een veel gebruikte methode om genen aan bepaalde menselijke chromosomen toe te kennen (Kao 1983). Belangrijk bij het kiezen van geschikte fusiepartners zijn de twee karyotypes. Deze moeten duidelijk verschillend zijn, en de individuele chromosomen van de te onderzoeken partner moeten herkenbaar zijn in de fusieprodukten, anders levert de bestudering van chromosoomverlies moeilijkheden op. Aan deze voorwaarden is in het mens-knaagdier systeem voldaan. Het principe wat aan dit systeem ten grondslag ligt, is als volgt. Als cellen van een reeds langer bestaande celculture (oude cellijn) worden gefuseerd met pas geïsoleerde cellen (jonge cellijn), zullen chromosomen van de jonge cellijn worden geëlimineerd. Op deze manier zijn vele hybride cellijnen verkregen (mens-muis of mens-Chinese hamster) waarin slechts één of enkele menselijke chromosomen naast de knaagdierchromosomen voorkomen. Belangrijk hierbij is, dat het ook mogelijk is om genen te lokaliseren in een stel hybriden waarin enkele menselijke chromosomen in verschillende combinaties naast de knaagdierchromosomen voorkomen (Kao 1983).

1.4.2.Hogere planten.

Ook in somatische hybriden van hogere planten kan asymmetrisch chromosoomverlies geïnduceerd worden. Eén methode hiervoor is identiek aan het hiervoor besproken systeem voor dierlijke cellen: indien cellen van een reeds bestaande weefselkweeklijn, in dit geval suspensie- of callusprotoplasten, worden

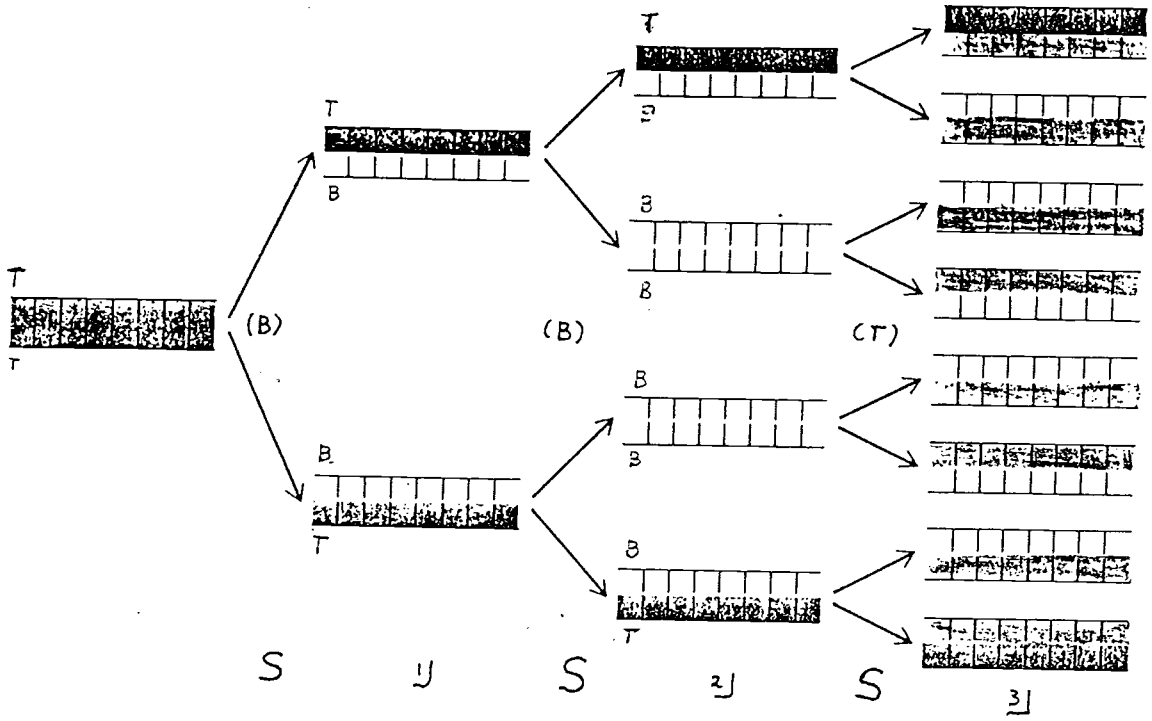
gefuseerd met pas geïsoleerde cellen (i.c. bladprotoplasten), zullen van de laatste chromosomen verloren gaan. Dit is in vele combinaties van suspensie- of callusprotoplasten met bladprotoplasten waargenomen, zoals bijvoorbeeld sojaboon (**Glycine max**) met **Nicotiana glauca** (Kao 1977), sojaboon met tabak (**Nicotiana tabacum** L., Chien **et al.** 1982), tabak met petunia (Pental **et al.** 1986), **Nicotiana chinensis** met de erwt (**Pisum sativum** L.,Gleba & Sytnik 1984). Fusie van monohaploide aardappelbladprotoplasten met **N. plumbaginifolia** callusprotoplasten leidde echter nog niet tot eliminatie van specifieke aardappelchromosomen (de Vries **et al.** 1987[c], van Everdink 1987). Er zijn echter ook andere methoden om asymmetrisch chromosoomverlies te bewerkstelligen. Die worden hierna besproken.

1.4.3.Röntgenbestraling.

Bestraling van een fusiepartner met röntgenstralen is een veel gebruikte methode. Hierbij worden de donorprotoplasten zwaar bestraald, vlak voor fusie met onbestraalde protoplasten van de recipiënt (Bates **et al.** 1987, Hamill **et al.** 1984, Imamura **et al.** 1987, Sidorov **et al.** 1987). De straling veroorzaakt breuken in de donorchromosomen, waarvan na fusie de fragmenten in de eerstvolgende delingscycli van de hybride cellen geëlimineerd zullen worden, of via translokaties in de recipiënte chromosomen worden geïncorporeerd. Dit is uiteraard een belangrijk nadeel als het doel is het lokaliseren van een gen op een donorchromosoom. Het blijkt echter dat soms ook hele chromosomen de auxotrofe eigenschap van de recipiënt complementeren (Dudits **et al.** 1980, Gupta **et al.** 1982 en 1984). Een ander risico is de mutagene eigenschap van deze methode (de eigenschap waarop geselecteerd wordt, zou gecomplementeerd kunnen worden door een gemuteerd gen).

1.4.4.BrdC/lichtbestraling.

Differentiële kleuring van chromosomen via het labelen met BrdC (5-Bromo-deoxy-Cytidine), een Thymidine-analoog, wordt o.a. gebruikt om stadia van chromosoomverdubbeling te volgen (Pijnacker **et al.** 1986). Nu zijn chromosomen waarin BrdC is geïncorporeerd vanwege de broom-ionen gevoelig voor zichtbaar en UV-licht (analoog aan BUdR-labeling, Puck & Kao 1967, Pontecorvo 1971). De chromosomen ondergaan bij belichting een vergelijkbaar proces als bij röntgenbestraling: in de chromosomen zullen breuken worden geïnduceerd (fotolyse). De BrdC-methode heeft echter enkele voordelen . Ten eerste is het mogelijk om slechts een <u>deel</u> van de chromosomen gevoelig te maken voor de bestraling, afhankelijk van de mate van BrdC-inbouw (zie fig.1). Ten tweede biedt het de mogelijkheid om de fotolyse uit te stellen tot <u>na</u> de fusie, waardoor mogelijke neveneffecten op het fusieproces zelf vermeden worden. Ten opzichte van BUdR heeft BrdC het voordeel dat het minder toxisch is (Pijnacker & Ferwerda 1982).



Figuur 1: Schematische weergave van de inbouw van BrdC in het DNA. Normaal wordt tijdens elke S-fase van de cel (S) Thymidine (T) in het DNA ingebouwd (donker gearceerd). Wordt nu BrdC (B) aangeboden dan zal BrdC in plaats van Thymidine in het DNA worden geincorporeerd (lichte DNA-streng). Een periode van twee van deze celcycli is aangegeven. 1) Na de eerste S-fase zijn vanwege de semi-conservatieve aard van de DNA-replicatie alle TT-helixen veranderd in TB-helixen. Blootstelling aan (UV-)licht zal in dit stadium leiden tot fotolyse van één DNA-streng. 2) Na de tweede S-fase met BrdC-inbouw, is het mogelijk in de helft van de helixen dubbelstrengs breuken te induceren. 3) Vindt een derde S-fase in afwezigheid van BrdC plaats, dan kan dubbelstrengs afbraak van de helix niet meer plaatsvinden. Wel kunnen in 3 van de vier chromosomen enkelstrengs DNA-breuken geinduceerd worden.

1.4.5. Chemische middelen.

Er zijn verschillende chemische middelen die de vorming van de spoelfiguur beïnvloeden of anderszins invloed hebben op de celdeling en de segregatie van chromosomen daarbij. De gevolgen zijn ruwweg onder te delen in twee categorieën: polyploidisatie (bij het overslaan van de celdeling na kerndeling) en aneuploidie (na de vormimg van multipolaire spoelfiguren gevolgd door asymmetrische celdeling). In het kader van de bestudering van chromosoomverlies moet polyploidisatie uiteraard vermeden worden, maar aneuploidie is zeker interessant. Hieronder worden enkele chemische middelen besproken, die aneuploidie zouden kunnen induceren.

CIPC (Isopropyl-N(3-chlorophenyl)carbamaat), een herbicide, zou de vorming van microtubuli beïnvloeden. Chromosoomverlies na incubatie op CIPC is o.a. gevonden in diploide cellijnen van de

sojaboon (Roth et al. 1982, Roth & Lark 1984) en de ui (**Allium** cepa, Clayton & Lloyd 1984).

PFP (Para-fluorophenylalanine) is een analoog van het aminozuur phenylalanine, en heeft ook invloed op de microtubuli. Niizeki & Fukui (1983) vonden chromosoomverlies in de (oktoploide) aardbei (**Fragaria x ananassi** Duch.) na incubatie van antheren op PFP. Dat PFP in een celculture ook haploide cellijnen zou bevoordelen ten opzichte van diploide cellijnen (Gupta & Carlson 1972) werd niet bevestigd in mengsels van mono- en dihaploide cellijnen van **Datura innoxia** (Evans & Gamborg 1979). De werking van PFP is wat dat betreft dus omstreden.

Volledigheidshalve moet ook Griseofulvine (GF) genoemd worden. GF is een fungicide, geproduceerd door verschillende **Penicillium** soorten. Het induceerde multinuclеariteit in dierlijke cellen die **in vitro** gekweekt werden (Larizza et al. 1974), en multipolaire spoelfiguren in de ui (Clayton & Lloyd 1984). Het is daarom potentieel ook een middel om segregatie van chromosomen te induceren. Chromosoomverlies werd echter niet gevonden, wel polyploidie (Larizza et al. 1974). Vandaar dat in dit verslag op het gebruik van GF verder niet ingegaan wordt.

1.5.Doel van dit onderzoek.

Het is mogelijk individuele chromosomen in monohaploide aardappelcellen te identificeren (Pijnacker & Ferwerda 1984). Ook in somatische hybriden van deze monohaploide aardappel met NR^- mutante **N. plumbaginifolia** is dit mogelijk (de Vries et al. 1987^c). Echter, hoewel in eerdere experimenten deze partners werden gefuseerd analoog aan het mens-knaagdier systeem, werd geen chromosoomverlies van de aardappel waargenomen (de Vries et al. 1987^c, van Everdink 1987), zodat een gen voor NR nog niet gelokaliseerd kon worden. In dit verslag worden enkele methoden onderzocht die in aanvulling op het mens-knaagdier systeem chromosoomverlies zouden kunnen induceren.

Ten eerste wordt de invloed van BrdC op chromosoomverlies bestudeerd. Voornoemde experimenten zullen worden herhaald, waarbij nu de protoplasten van de monohaploide aardappel voorafgaand aan electrofusie BrdC kunnen opnemen. Na fusie met callusprotoplasten van NR^-mutante **N. plumbaginifolia** zullen de protoplasten aan zichtbaar licht worden blootgesteld.

Ten tweede is de invloed van de chemicaliën PFP en CIPC op het chromosoomaantal van de aardappel onderzocht. Omdat in monohaploide cellen chromosoomverlies waarschijnlijk lethaal is, is het korte-termijn effect van de chemicaliën op een dihaploide kloon onderzocht. De achterliggende gedachte is, dat als chromosoomverlies wordt waargenomen, dit ook geïnduceerd kan worden in monohaploide cellen maar dat deze dan "gered" kunnen worden door ze te fuseren met NR^-mutante **N. plumbaginifolia**.

2.Materiaal en methoden.

2.1.Plantmateriaal.

2.1.1.Herkomst.

In de experimenten werden monohaploide en dihaploide Solanum tuberosum planten gebruikt. De monohaploide kloon, gecodeerd Mn 797322 en afgekort met H7322 (2n=x=12), is uitgebreid beschreven door Ross & Jacobsen (1975). Een dihaploide S. tuberosum kloon (2n=2x=24) werd verkregen door van H7322 adventiefscheuten op te kweken. Deze kloon, H7322/2x, werd ter beschikking gesteld door Ans Hovenkamp (R.U.Groningen).
Van Nicotiana plumbaginifolia werd de NR^-mutante lijn Cnx20 gebruikt. Deze lijn is beschreven door Negrutiu et al. (1983) en de Vries et al. (1986). Onder de NR^-mutanten behoort Cnx20 tot de complementatiegroep cnxA : gestoord in de Molybdeen-cofactor hetgeen te herstellen is door toevoeging van Molybdeen aan het medium. Tijdens weefselkweek is in de callusculture van Cnx20 het chromosoomaantal verdubbeld (2n=4x=40).

2.1.2.Kweek.

Scheutcultures van H7322 en H7322/2x werden in vitro gekweekt op MS10 resp. MS30 medium (MS medium (Murashige & Skoog 1962) aangevuld met 10 resp. 30 g/l sucrose). De planten werden in een kweekkast gekweekt bij 24°C met 14 uur licht (±3000 lux) per dag. Cnx20 werd als callusculture in donker bij 25°C gekweekt op MSC medium (ammoniumsuccinaat als stikstofbron, Dirks et al. 1985) aangevuld met 5 mg/l thiamine, en elke drie weken overgeënt op vers medium. Aan de media werd 8 mg/l agar toegevoegd, waarna de media werden geautoclaveerd.

2.2.Chemische inductie van chromosoomverlies.

2.2.1.Opname van PFP en CIPC door H7322/2x.

Uit een filtersteriele stockoplossing (500 mg/ml in aqua dest pH 5.9) werd PFP toegevoegd aan geautoclaveerd MS10 medium in eindconcentraties van 0 tot 550 μM. CIPC, uit een stockoplossing van 50 mM in DMSO (DiMethylSulfOxide) werd aan MS10 toegevoegd tot eindconcentraties van 0 tot 350 μM en meegeautoclaveerd. De DMSO-concentratie in MS10 was maximaal 0.7 %(v/v). Onbewortelde scheuten van H7322/2x werden op deze media overgeënt en geïncubeerd zoals hiervoor beschreven voor scheutcultures (§ 2.1.2). Na 5 dagen werden scheuttopjes 5½ uur bij 4°C in α-Broomnaphtaleen voorbehandeld en daarna gefixeerd in Carnoy voor chromosoomtellingen (zie § 2.5).

2.2.2.Opname van BrdC door H7322.

Van een filtersteriele stockoplossing van BrdC in aqua dest (270 μg/ml) werd 2 ml op 25 ml agarplaten gebracht, en overnacht in donker weggezet. Eindconcentratie van de BrdC in het agar-

medium was 20 µg/ml. Van scheutcultures van H7322 werden de bladeren afgesneden waarbij de grotere bladeren een of twee keer doormidden gesneden werden. Met de onderkant naar beneden werden de bladstukjes op de BrdC-platen gelegd, waarbij ervoor gezorgd werd dat de snijvlakken de plaat wel raakten. Na 5 dagen incubatie in donker bij 25°C werden de bladstukjes verder fijngesneden en overnacht in enzymoplossing gelegd voor protoplastisolatie (in donker).

2.3.Protoplasten.

2.3.1.Protoplastisolatie.

Voor de isolatie van mesophyll-protoplasten van H7322 en van callus-protoplasten van Cnx20 werd de procedure gevolgd zoals beschreven door Bokelmann & Roest (1983), echter wel op enkele punten gemodificeerd. Er werd een enzymoplossing gebruikt met 0.6 % cellulase (Onazuka R10) en met 0.12 % macerozyme (beide van Yakult Biochem.,Japan), opgelost in spoelmedium. Als spoelmedium werd gebruikt 0.5 M mannitol aangevuld met zouten: KNO_3 1.85 mM; $CaCl_2$ 0.30 mM; $MgSO_4$ 0.15 mM en KH_2PO_4 0.125 mM. Incubatie in enzymoplossing vond plaats overnacht in donker bij 25°C. Na verzameling van de protoplasten op 0.57 M sucrose (10 min. centr. bij 1000 rpm) werden de protoplasten 10x verdund met spoelmedium, en na centrifugatie als pellet of als een groene band op ±3 cm vanaf de bodem van de buis zichtbaar. Deze band of de pellet werden verzameld en opnieuw gewassen met spoelmedium.

2.3.2.Electrofusie van protoplasten.

Fusie van mesophyll-protoplasten van H7322 met callusprotoplasten van Cnx20 werd uitgevoerd zoals beschreven door Tempelaar & Jones (1985[a,b]) en De Vries et al. (1987[a]). De condities van de twee geslaagde experimenten worden hieronder schematisch weergegeven.

	Exp.1	Exp.2	
	(alleen BrdC)	(BrdC)	(controle)
Pulshoogte (V/cm)	1500	1500	1500
Pulslengte (µs)	2*50	2*20	2*20
Aantal Cnx20 prpl.	$0.4*10^5$	$0.5*10^5$	$0.2*10^5$
Aantal H7322 prpl.	$2.1*10^5$	$2.3*10^5$	$0.6*10^5$
Cnx20 : H7322	1 : 5	1 : 4.5	1 : 3
Totaal prpl.conc.(/ml)	$1.25*10^6$	$0.7*10^6$	$0.4*10^6$

Als fusiemedium werd spoelmedium gebruikt. Er werd slechts kort opgelijnd (± 10 s) waarna de wisselspanning tot de helft werd teruggedraaid en de fusiepuls werd gegeven. Daarop werd de wisselspanning verder verlaagd (tot ± 15 %) en 45 tot 60 s aangehouden voordat de electrode geleegd werd.

2.3.3.Regeneratie van protoplasten.

De protoplasten werden gedurende de eerste 54 dagen aselectief gekweekt in filtersteriel GS-medium. Dit medium is afgeleid van medium KA_1AO (Negrutiu 1981, Installé et al. 1985), waarbij

ter voorkoming van neerslag de concentratie $NaH_2PO_4.2H_2O$ omlaaggebracht werd van 1.5 mg/l naar 0.25 mg/l. KNO_3 en NH_4NO_3 werden weggelaten en vervangen door 5 mM ammoniumsuccinaat. De phytohormoon-concentratie was voor NAA 3 mg/l en voor BAp 1 mg/l.
De initiële kweekdichtheid in GS medium was 1 tot $1.5x10^5$ protoplasten per ml. Verdunning en overzetten in grotere petrischalen ging volgens de methode zoals beschreven door Installé et al. (1985), waarbij steeds weer GS medium werd gebruikt. Alleen in exp. 2 werd na 6 weken een laag-hormoon medium gebruikt (GS/60). Acht weken na fusie werden de microcalli uitgeplaat op MSC medium, om na 4 weken te worden overgeënt op selectieve media.

2.4.Selectie van somatische hybriden.

De NR^--mutant Cnx20 kan niet groeien op medium A (Muller & Grafe 1978), waarin alleen nitraat als stikstofbron voorkomt. Protoplasten van H7322 of homologe fusies daarvan kunnen in de gebruikte omstandigheden niet tot callus of plant regenereren, zodat op medium A alleen de interspecifieke somatische hybriden kunnen groeien. De laatstgenoemde zullen, vanwege de gecomplementeerde NR-activiteit, ook chloraat omzetten in het giftige chloriet, zodat een medium, waaraan 50 mM $KClO_4$ is toegevoegd, voor deze hybriden toxisch is. De vergelijking van groei op A, AA (een aselectief medium met aminozuren als stikstofbron) en op AA+$KClO_4$ vormde de eerste selectie. Deze werd nog een tweede keer herhaald, waarna de niet op A groeiende calli werden weggelaten. De tweede selectie, een qualitatieve test op NR-activiteit in vivo, werd uitgevoerd zoals beschreven door Jaworski (1971) en De Vries et al. (1987[b,c]) en zo mogelijk een of twee keer herhaald.

2.5.Chromosoomanalyse.

Kleine stukjes callus werden overgeënt op medium A, en na twee of drie dagen groei in donker bij 25°C, voorbehandeld in een verzadigde oplossing van α-Broom-naphtaleen in leidingwater voor 5½ uur bij 4°C. Hierna werden de calli gefixeerd in Carnoy (3:1 v/v absoluutalcohol:ijsazijnzuur), minimaal 2 uur bij 4°C.
Squashpreparaten werden gemaakt na 30 minuten incubatie in enzymoplossing bij 37°C, en na kleuring in een verzadigde oplossing van aceto-orceïne in 45 % azijnzuur (Pijnacker & Ferwerda 1984).
De met PFP of CIPC behandelde scheuttopjes van H7322/2x werden, na voorbehandeling en fixatie, voor 60 minuten bij 37°C in de enzymoplossing geïncubeerd, waarna luchtgedroogde spreidpreparaten werden gemaakt (Pijnacker et al. 1986).

3.Resultaten.

3.1.Invloed van chemische middelen op chromosoomaantal.

3.1.1.PFP.

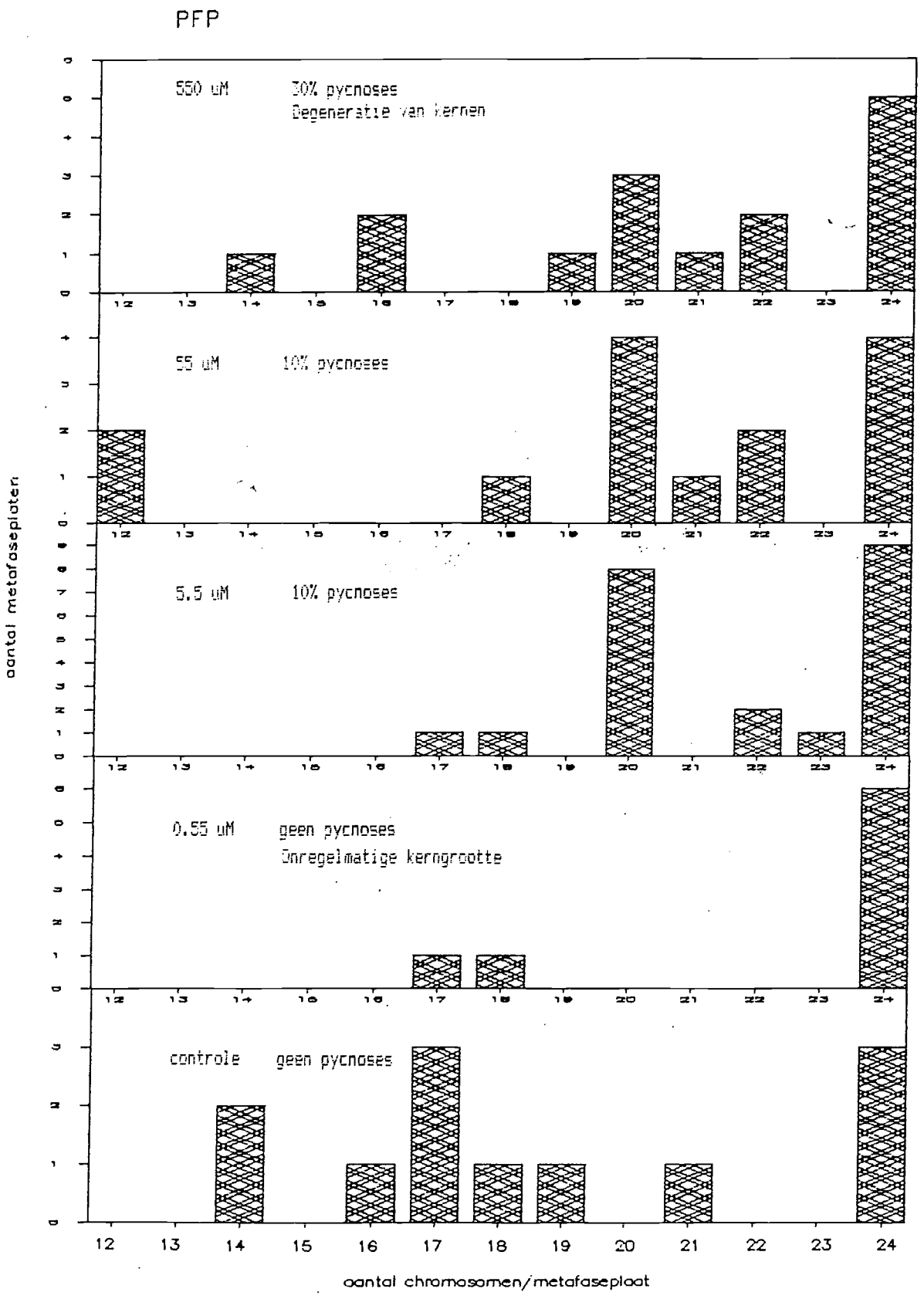
Incubatie op PFP heeft na 5 dagen, in concentraties tot 550 µM, weinig effect op de scheuten zelf en heeft in de chromosoom-preparaten geen chromosoomverlies te zien gegeven, zie fig.2. De controle, op MS10 zonder PFP, gaf al incomplete sets chromosomen te zien, een gevolg van incomplete metafaseplaten die ontstaan in niet perfecte preparaten. Daarom al valt over de lagere chromosoomaantallen in H7322/2x op PFP eigenlijk alleen te zeggen dat de chromosomen niet verdubbeld zijn. Bij alle PFP-concentraties zijn onregelmatige kerngroottes waargenomen, zodat misschien toch een asymmetrische verdeling van de chromosomen optreedt bij mitose. Wel zijn bij PFP-concentraties groter dan 5,5 µM pycnoses gezien in de preparaten (10 % van de kernen). Dit effect was het grootst bij 550 µM PFP (30 % van de kernen). Dit duidt op degeneratie van kernen, en is in elk geval een teken dat PFP de scheuttopjes beïnvloedt en uit het medium wordt opgenomen. Op langere duur zou PFP dan ook invloed kunnen hebben op de vitaliteit van de plant.

3.1.2.CIPC.

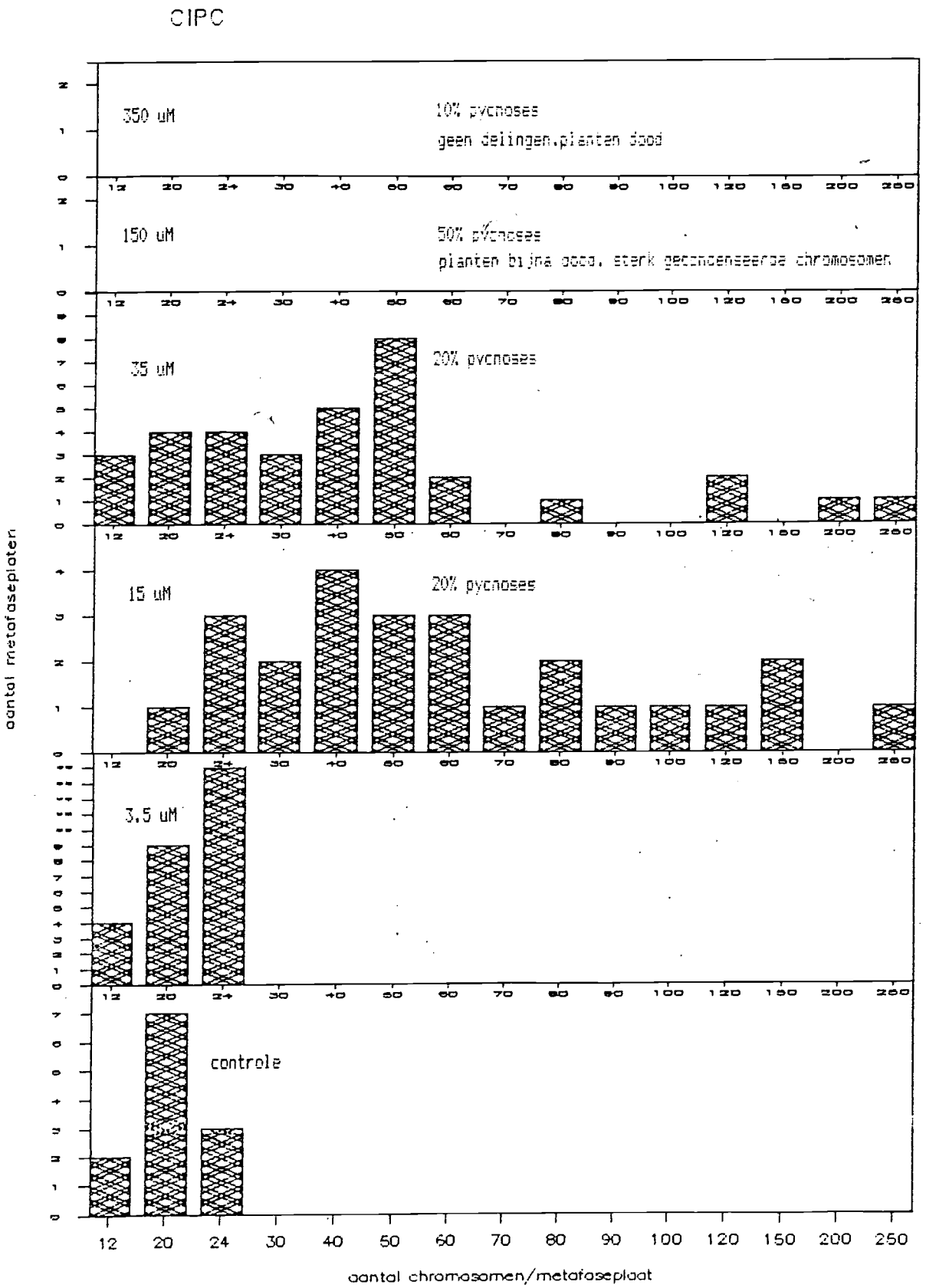
Bij hogere concentraties (150 en 350 µM) bleek CIPC al snel lethaal te zijn voor de planten. Voor de controle geldt hier hetzelfde als bij het PFP-experiment: vaak incomplete metafases als artefact (zie fig. 3). Op 3,5 µM CIPC bleef de chromosoomverdeling ongeveer gelijk aan de controle. Echter, bij 15 µM CIPC is een duidelijk omslagpunt te zien: CIPC veroorzaakt chromosoomverdubbelingen in het genoom, gepaard gaande met aneuploidie. Dat asymmetrische celdelingen plaatsvinden, lijkt aangetoond door de waarneming van microkernen in de cellen bij 35 µM CIPC. Deze microkernen kunnen een gereduceerd aantal chromosomen bevatten (Clayton & Lloyd 1984). Er werden echter weinig metafaseplaten met minder dan 24 chromosomen waargenomen, en deze waren vanwege de sterk gecondenseerde chromosomen slecht te tellen. Er kan nog niet geconcludeerd worden dat er geen chromosoomverlies is opgetreden, wel is zeker dat CIPC in concentraties van 15 µM en hoger verdubbelingen en aneuploidie veroorzaakt in dihaploide S. tuberosum scheutcultures.

3.2.Fusie van Cnx20 met H7322/BrdC.

Eén dag na fusie waren de fusieprodukten te herkennen aan de grootte van Cnx20-protoplasten met de chloroplasten van H7322. Na 4 dagen werden de eerste celdelingen waargenomen. Na 5 dagen was het percentage delende cellen in experiment 1 4%. In de BrdC-behandelde fusies van experiment 2 was dit 0.6% en in de controle 2.3%. In experiment 1 werden al veel 2* gedeelde cellen waargenomen. Na 12 dagen waren in experiment 1 al veel micro-colonies 4* tot 10* gedeeld, in experiment 2 was dit pas na 18 dagen bereikt. In experiment 1 werden na 25 dagen bij sommige calli onregelmatige celdelingen te zien, altijd gepaard gaande met de aanwezigheid van lange puntige cellen. Dit is nooit waargenomen



Figuur 2: Chromosoomaantallen in spreidpreparaten van scheuttopjes van H7322/2x (2n=2x=24) na 5 dagen incubatie op medium MS10 met verschillende concentraties PFP (0 tot 550 µM). Op de Y-as is uitgezet het aantal keren dat een bepaald aantal chromosomen in een metafaseplaat is waargenomen.
Elke X-as hoort bij een bepaalde PFP-concentratie. Duidelijk is te zien dat in de controle (onderste X-as) al een spreiding in het aantal chromosomen wordt waargenomen (als artefact in de preparaten), waardoor over de invloed van PFP op chromosoomaantal weinig te zeggen is, behalve dat er geen polyploidisatie heeft plaatsgevonden (meer dan 24 chromosomen per metafaseplaat werden niet waargenomen).



Figuur 3: Als figuur 2, incubatie van H7322/2x op CIPC (0 tot 350 µM). Let op de schaal van de X-as. In vergelijking met figuur 2 is duidelijk een heel andere invloed te zien: veel polyploidisaties en aneuploidie bij incubatie op 15 en 35 µM CIPC.

in de controles (Cnx20) en zou dus op fusieprodukten kunnen duiden. Ook na 48 dagen werd dit nog waargenomen, zie fig.4 en fig.5. Van experiment 2 is dit niet bekend. Verdunning met een laag-hormoon medium (GS/60) in exp. 2 stimuleerde de coloniegroei behoorlijk. Na uitplaten op vaste platen met MSC-medium is in beide experimenten het aantal groeiende calli geteld. De resultaten daarvan zijn hieronder schematisch weergegeven. De absolute plating efficiency (a.p.e.) is het aantal groeiende calli gerelateerd aan het aantal cnx20 protoplasten aan het begin van het experiment. De relatieve plating efficientie (r.p.e.) is het aantal groeiende calli gerelateerd aan het aantal delende cellen 5 dagen na fusie.

	experiment 1	experiment 2	
	(alleen BrdC)	BrdC	Controle
Aantal calli	900	250	250
A.p.e.	2.3 %	0.5 %	0.4 %
R.p.e.	60 %	83 %	18 %

3.3.Selectie van somatische hybriden.

3.3.1.Experiment 1.

Na de eerste selectie op A-medium (groei met nitraat als enige stikstofbron) bleven van de 900 calli nog 209 calli over. De groei op medium AA+chloraat was, met uitzondering van de controle (Cnx20), nogal vaak niet in overeenstemming met groei op medium A (zie later), vandaar dat groei op chloraat niet het belangrijkste criterium was voor de eerste selectie.
Van de 42 calli die twee of drie keer op NR-vivo aktiviteit werden getest, bleken 9 calli steeds NR aktiviteit te vertonen, 29 calli bleken steeds NR^- te zijn en 4 calli hadden wisselende uitkomsten. Van de overige 166 slechts één keer geteste calli waren 133 calli NR^-, 30 calli NR^+ en 3 calli twijfelachtig. Zo bleven na de tweede selectie nog 44 calli over, zie tabel 1. Van een aantal calli is het, gezien hun voorgeschiedenis, mogelijk dat ze subklonen zijn van één callus op MSC: 11, 12 en 13; 16 en 17; 30 en 31; 33 en 34; en 38 en 39. In totaal was de opbrengst van heterologe fusieprodukten dus 38 tot 44 op de 900 calli die geregenereerd waren, hetgeen een heteroloog-fusiepercentage van 4 á 5 % betekent.

3.3.2.Experiment 2.

De calli, overgezet op medium A (nummers 1 t/m 250) werden direct getest op NR-vivo aktiviteit. Van de 211 geteste calli waren 34 NR^+. Dit impliceert een heteroloog fusiepercentage van 16%. Van de controle (nummers 901-950) zijn nog geen gegevens beschikbaar.

3.4.Chromosoomanalyse.

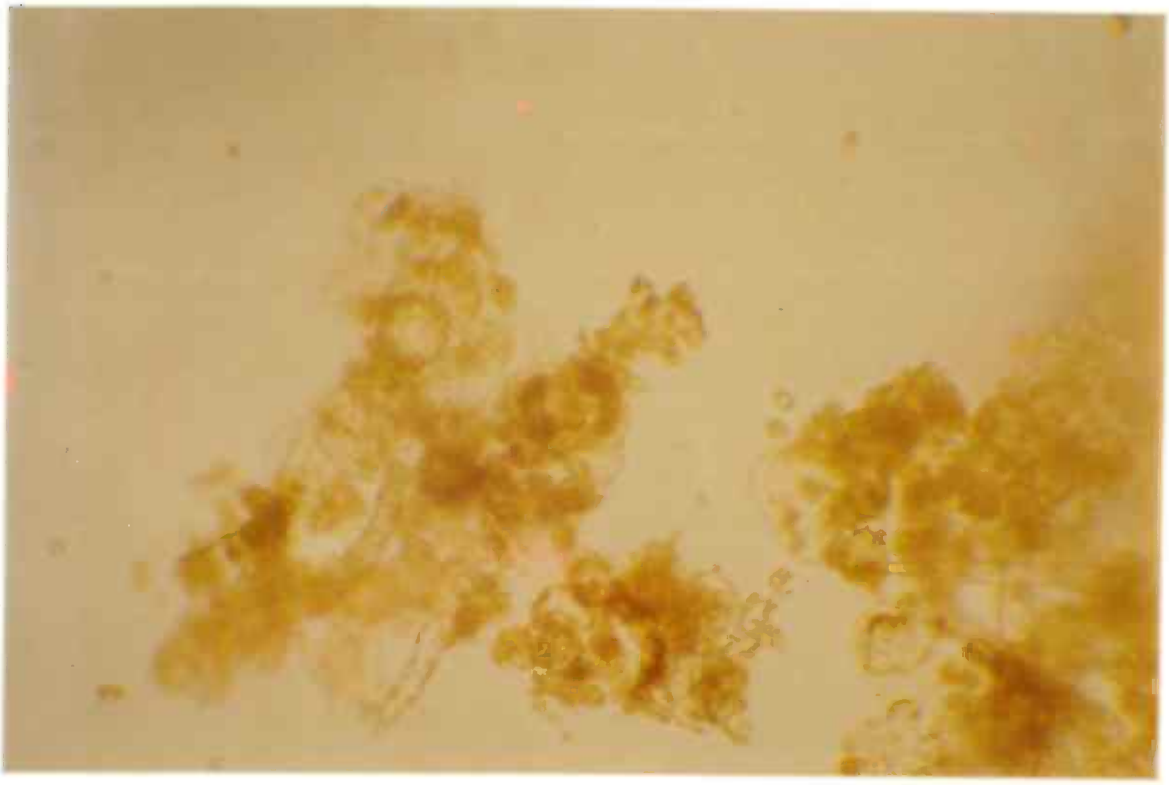
Van experiment 2 zijn nog geen resultaten beschikbaar. De resultaten van de chromosoomtellingen van experiment 1 zijn weergegeven in tabel 2. De meeste aantallen zijn bij benadering weergegeven, omdat squashpreparaten eigenlijk alleen geschikt zijn om te zien óf er chromosomen van beide fusiepartners aan

Figuur 4: Microcolonie van experiment 1, 48 dagen na protoplast-isolatie. De celdelingen zijn regelmatig, en puntcellen zijn niet aanwezig. Vergroting ± 500 x.

Tabel 1: Nummering van 44 hybride calli geselecteerd op groei op A-medium en op NR-vivo aktiviteit. Het aantal NR-vivotesten (één tot drie) is aangegeven (+ is NR^+, - is NR^-, ± is twijfelachtig). Twee calli (nummers 9 en 44) zijn een keer NR^- bevonden na een NR-vivo test, maar hebben toch chromosomen van H7322 (zie ook tabel 2).

Kloon nr.	NR-vivo 1	2	3	Kloon nr.	NR-vivo 1	2	3	Kloon nr.	NR-vivo 1	2	3	Kloon nr.	NR-vivo 1	2	3	Kloon nr.	NR-vivo 1	2	3
1	+			11	+			21	+	+	+	31	+			41	+	+	
2	+			12	+			22	+	+		32	+			42	+		
3	+			13	+			23	+			33	+			43	+	-	-
4	±			14	+			24	+	+		34	+			44	-		
5	+			15	+	+		25	+			35	+	-	-				
6	+			16	+			26	+			36	+						
7	+			17	+			27	+	+		37	+	+					
8	±			18	+			28	+	-		38	+						
9	+	-		18	+			29	+	+		39	+						
10	+			20	+			30	+	+		40	+						

wezig zijn en om hun aantal te schatten. Het preciese aantal chromosomen is op deze manier alleen in uitzonderlijke gevallen vast te stellen.
In tabel 2 is te zien dat vaak naast 6 tot 12 H7322-chromosomen 20 tot 40 Cnx20-chromosomen aanwezig zijn. Eén preparaat van kloon nummer 22 was uitzonderlijk goed, in fig.6 is goed te zien



Figuur 5: Microcolonies in cultures van experiment 1, 48 dagen na fusie van H7322 met cnx20. De celdelingen zijn onregelmatig (aan de colonies hangen veel kapotte cellen). Er zijn puntcellen aanwezig die waarschijnlijk specifiek zijn voor hybride colonies. Vergroting ± 200 x.

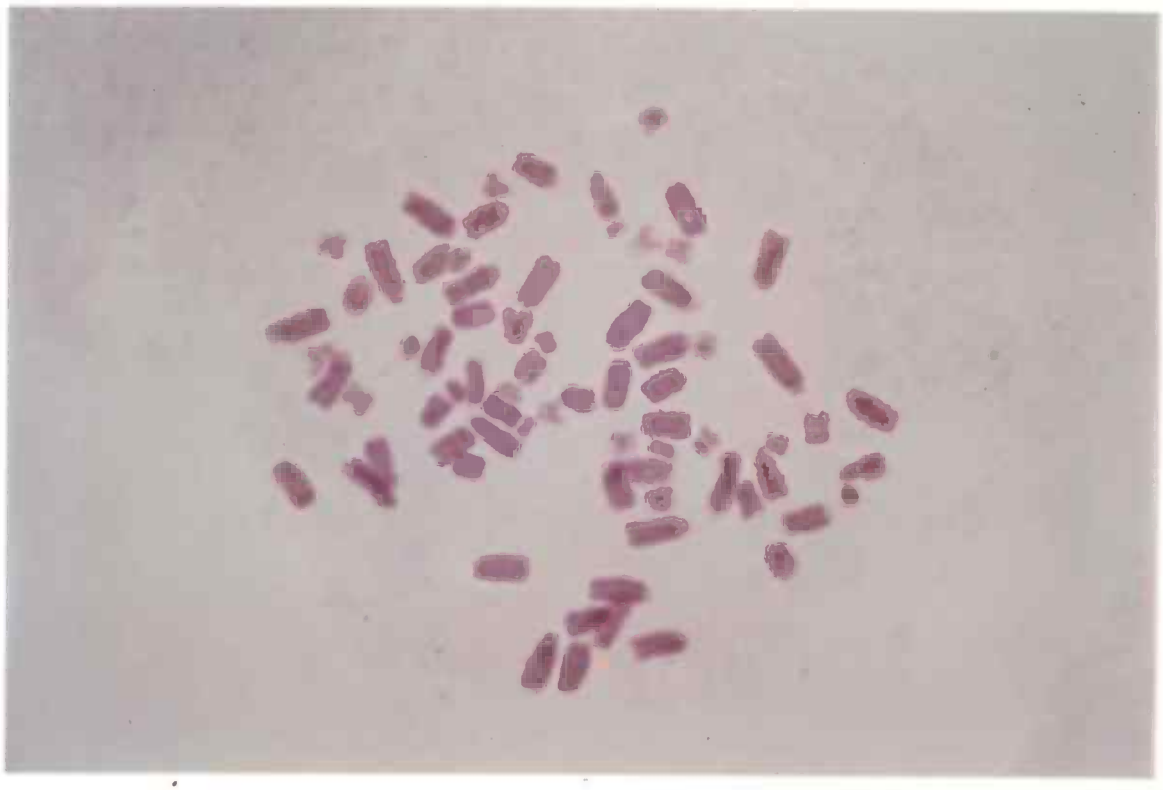
Tabel 2: Chromosoomtellingen in squashpreparaten van 14 at random gekozen calli Na selectie op groei op medium A en op NR-vivo aktiviteit. De nummering van de calli is hetzelfde als in tabel 1. N is het aantal metafasen waarin chromosomen geteld zijn.

Callus nr.	aantal cnx20-chromosomen	aantal H7322-chromosomen	n	Opmerkingen
9	± 20	± 10	1	weinig delingen
15	38-40	7-9	14	
21	± 120	± 30	5	
22	40	12	12	zie fig.6
24	40-45	≥ 8	1	weinig delingen
27	≥ 12	≥ 3	1	idem
28	20-33	0 of 1	12	geen hybride ?
29	38	6	10	
30	≥ 34	≥ 7	3	weinig delingen
35	26-36	0	6	geen hybride
37	23	9	6	
41	18-21	7-8	3	weinig delingen
43	20	0 of 1	20	geen hybride ?
44	52	16	1	weinig delingen

dat hierin naast 40 Cnx20-chromosomen 12 H7322-chromosomen aanwezig zijn. Deze hybride groeit erg goed op medium A, groeit niet op medium AA+chloraat en vertoonde in twee in vitro-testen NR-ac-

Figuur 6: Chromosomen in een metafaseplaat van hybride nummer 22. De 12 kleine, en wat lichter gekleurde aardappelchromosomen zijn goed te tellen. Daarnaast zijn er op deze foto 39 chromosomen van **Nicotiana plumbaginifolia** mutant cnx20 te zien (langer, donkerder, acrocentrisch). In andere metafases bleek deze hybride toch 40 cnx20-chromosomen te hebben. Orceine-squash, vergroting ± 1550 x.

tiviteit. Het lijkt of in een aantal calli chromosomen van H7322 verloren zijn gegaan, echter zoals hierboven genoemd is dit met het nodige voorbehoud. Twee hybriden bezaten beduidend meer chromosomen: nummer 21 heeft ±120 Cnx20- en ±30 H7322-chromosomen, nummer 44 heeft ±52 Cnx20- en ±16 H7322-chromosomen (zie fig.7). Waarschijnlijk zijn dit multifusieprodukten (gevolgd door aneuploidie bij nummer 44) aangezien de andere mogelijkheid, chromosoomverdubbeling door weefselkweekeffecten, dan algemener voor zou moeten komen. Het is opvallend hoe weinig chromosoomverdubbellingen of multifusies in dit experiment zijn opgetreden, dit in tegenstelling tot eerdere soortgelijke experimenten (de Vries **et al.** 1987[c], van Everdink 1987). In kloon nr. 28 werden geen aardappelchromosomen waargenomen, hoewel hiervan wel een keer NR-aktiviteit gemeten werd (tabel 1). Verder werden wel metacentrische cnx20-chromosomen waargenomen, terwijl **Nicotiana plumbaginifolia** normaal alleen acrocentrische chromosomen bezit. Het lijkt daarom waarschijnlijk, dat een chromosoom van cnx20 via translokatie een fragment van een aardappelchromosoom heeft opgenomen.



Figuur 7: Chromosomen van hybride nummer 44. Alle chromosomen zijn in deze metafase aanwezig. De ± 16 aardappelchromosomen zijn herkenbaar naast ± 52 chromosomen van cnx20. Ook zijn waarschijnlijk enkele chromosoomfragmenten aanwezig. Orceine-squash, vergroting ± 2000 x.

3.5.Selectie op chloraat.

In § 3.3 werd al vermeld dat de selectie op chloraatresistentie niet eenduidig was. Onder de 44 calli zijn 18 calli die zowel NR^+ als chloraatresistent zijn. Hiervan zijn er at random 4 calli aan chromosoomanalyse onderworpen. Van deze 4 calli blijken er twee somatische hybriden te zijn (nummers 29 en 41). De nummers 28 en 43 zijn hierbij aangemerkt als niet-hybride hoewel dat nog niet zeker is (zie tabel 1). De conclusie is, dat chloraatresistentie geen eenduidig selectiecriterium is voor de (negatieve) selectie van somatische hybriden in dit systeem. Een mogelijke oorzaak zou een zekere mate van chloraatresistentie van H7322 zelf kunnen zijn.

4.Discussie.

4.1.PFP en CIPC.

Vijf dagen incubatie op 0.55 tot 550 μM PFP had geen aanwijsbaar effect op het chromosoomaantal in scheutprimordia van H7322/2x. Toch voldoen deze concentraties aan de in de literatuur genoemde waarden, waarbij in celcultures van hogere planten chromosoomverlies en haploidisatie gevonden wordt (Evans & Gamborg (1979): 100-1000 μM; Niizeki & Fukui (1983):80-400 μM). Langere incubatie op 550 μM PFP is waarschijnlijk lethaal, gezien het aantal gedegenereerde kernen in planten die hierop 5 dagen geïncubeerd werden. Wat op dit experiment zou moeten volgen, is een langere incubatie op lagere concentraties PFP, omdat de duur van de behandeling misschien belangrijker is dan de dosis. Verder is het mogelijk om bewortelde scheutjes op media met PFP te zetten, zodat de plant misschien beter in staat is om PFP op te nemen. Een ander obstakel, het lage aantal metafases dat werd gevonden in met PFP behandeld materiaal, zou vermeden kunnen worden door bij volgende experimenten niet het chromosoomaantal te tellen via squashes, maar met behulp van de cytofotometer de DNA-hoeveelheid te meten. Voordeel hiervan is, dat de genoomgrootte van cellen die misschien niet meer delen vanwege hun gereduceerde chromosoomaantal, toch gemeten kan worden, zodat meer duidelijkheid ontstaat over het effect van PFP. Belangrijk is dan wel het oplossend vermogen van de cytofotometer: er moet duidelijk onderscheid gemaakt kunnen worden tussen cellen met 24 chromosomen en cellen met bijvoorbeeld 14 of 18 chromosomen.

Incubatie van 5 dagen op CIPC gaf bij concentraties van 15 en 35 μM een duidelijk effect op het chromosoomaantal in H7322/2x te zien: verdubbelingen en aneuploidie. Echter, niet het gewenste effect, namelijk chromosoomverlies. Toch is het mogelijk, net als bij PFP, dat er wel cellen met minder chromosomen gevormd worden, maar dat deze cellen niet meer kunnen delen en dus niet gescoord kunnen worden op chromosoomaantal. Met name de waarneming van micronuclei bevestigt dit vermoeden (Clayton & Lloyd 1984), evenals het voorkomen van aneuploidie. Bovendien zijn deze uitkomsten niet in overeenstemming met bijvoorbeeld Roth & Lark (1984): die vinden alleen maar chromosoomverlies bij het gebruik van CIPC. Een herhaling van dit experiment, maar dan met analyse van de (flow-)cytofotometer zou uitkomst kunnen brengen. Stel dat dan een goede CIPC-behandeling gevonden wordt, dan zou men van op dergelijke manier voorbehandelde monohaploide planten protoplasten kunnen isoleren, waarna de cellen met minder chromosomen als het ware "gered" worden door te fuseren met bijvoorbeeld cnx20 callusprotoplasten.

4.2.Chloraatresistentie.

De selectie op chloraatresistentie is niet eenduidig in het systeem zoals dat nu gebruikt is. Kennelijk sluit de resistentie tegen chloraat niet uit dat het gen voor NR gecomplementeerd is. Dit kan betekenen dat 1) de kloon H7322 een zekere mate van chloraatresistentie bezit waarbij waarbij chloraat op een andere manier wordt afgebroken, of 2) dat chloriet niet meer toxisch is

voor de cel (chlorietresistentie, omzetting van chloriet), of 3) dit wordt veroorzaakt door somaclonale variatie, waarbij voornoemde resistenties ontstaan, of 4) de media niet de juiste samenstelling hebben waardoor op medium AA+Chloraat het enzym nitraatreductase onderdrukt wordt. Dit laatste is eigenlijk het meest waarschijnlijk, immers NR wordt geïnduceerd door het substraat (i.c. nitraat)(Grafe et al. 1986), hetgeen in medium AA+Chloraat niet aanwezig is. Wellicht is het daarom beter om in volgende experimenten de chloraatresistentie te bepalen op medium A+Chloraat.

4.3.BrdC-fusie.

Om de specifieke invloed van BrdC vast te stellen zal eerst het controle fusie-experiment (in exp.2) geanalyseerd moeten worden. Zekerheid over chromosoomverlies van H7322 in de verkregen fusieprodukten is er nog niet. In een aantal hybride klonen werden met squashes een verminderd aantal chromosomen werd waargenomen (nrs. 27, 28, 29, 30, 37, 41 en 43), die lijken zeker interessant. Analyse via spreidpreparaten en Giemsa-C-bandering (volgens Pijnacker & Ferwerda 1984) zou hierin meer duidelijkheid moeten brengen. Verder is het goed mogelijk dat in een aantal gevallen meerdere protoplasten van H7322 met verminderd chromosoomaantal zijn gefuseerd met cnx20 protoplasten. Alleen Giemsa-C-bandering kan daarover uitsluitsel geven, want dan kan onderzocht worden of alle 12 verschillende chromosomen aanwezig zijn, of dat er enkele chromosomen dubbel aanwezig zijn en dat er andere chromosomen geëlimineerd zijn. Dat er in kloon 28 een aardappelfragment zou kunnen voorkomen, hoeft niet speciaal een effect van BrdC te zijn: ook in "gewone" hybriden komt dat voor (de Vries et al. 1987[c]).

Een idee om de invloed van BrdC wat beter te kunnen waarnemen, is om scheuten na BrdC opname te bestralen en dan opnieuw BrdC laten incorporeren. Een differentiële kleuring met Giemsa en Hoechst 33258 (Pijnacker et al. 1986) moet dan uitwijzen of er inderdaad meer zusterchromatide-uitwisselingen plaatsvinden dan in de controle. Een geheel andere mogelijkheid om tot meer chromosoomverlies te komen, is het kiezen van een andere fusiepartner die minder nauw verwant is aan de aardappel waardoor chromosoomeliminatie sneller zal optreden. Te denken valt bijvoorbeeld aan de sojaboon, de erwt of de lathyrus. Wel moeten daarvan dan goed gekarakteriseerde mutanten beschikbaar zijn.

Belangrijk is verder dat er weinig verdubbelingen in de chromosoomaantallen gevonden werden. Dit is een duidelijke verbetering in vergelijking met eerdere soortgelijke fusie-experimenten (de Vries et al. 1987[c] en van Everdink 1987). Wat hiervan de oorzaak is, is nog moeilijk vast te stellen. In de eerste plaats is een ander medium gebruikt om protoplasten in te regenereren. In voorgaande experimenten werd daarvoor medium VkM-AA gebruikt, terwijl voor de hier beschreven experimenten GS-medium werd gebruikt. Misschien ontstaan hierdoor minder polyploidisaties van de fusieprodukten. In de tweede plaats is BrdC gebruikt als voorbehandeling van één van de fusiepartners. Als nu H7322 verantwoordelijk is voor de chromosoomverdubbelingen in de somatische hybriden, zou deze eigenschap van H7322 onderdrukt geweest kunnen zijn door de incubatie op BrdC (suggestie Dr. Sytske de Vries). En ten derde kan de methode van electrofusie ook iets

anders geweest zijn dan in een voorgaand electrofusie-experiment. Met name is nu geprobeerd de tijd voor het "oplijnen" van de protoplasten zo kort mogelijk te houden (10 seconden) waardoor te grote aggregatie van protoplasten werd vermeden.

4.4.Concluderend.

De behandeling BrdC-opname gevolgd door fusie en bestraling met zichtbaar licht, en de chemicaliën PFP en CIPC vallen nog niet direct af om chromosoomverlies te induceren, maar behoeven nader onderzoek. Er blijft een aantal interessante klonen over voor nadere analyse via Giemsa-C-bandering. Met name kloon nr. 22, met 12 H7322-chromosomen en 40 cnx20-chromosomen, lijkt interessant voor verder onderzoek, bijvoorbeeld (zie van Everdink 1987) om achteraf nog te proberen chromosoomeliminatie te induceren. Voor electrofusie van protoplasten lijkt het beter om kort op te lijnen en GS-medium te gebruiken voor regeneratie van protoplasten.
Tenslotte zou de methode van detectie van hybriden (NR-vivo test en chromosoomanalyse) aangevuld kunnen worden met of vervangen kunnen worden door snellere moleculair-genetische methoden. Te denken valt aan DNA-micro-isolatie, dot-blotten en hybridisatie met een probe met op alle aardappelchromosomen voorkomend repetetief DNA om fusieprodukten aan te tonen. Hybridiseren met verschillende probes specifiek voor verschillende aardappelchromosomen zou dan chromosoomverlies aan het licht kunnen brengen.

Dankwoord.

Graag wil ik Sytske de Vries bedanken voor de prettige begeleiding, Gerrit van der Steege voor het "knutselen" aan het GS-medium, Dave Lavèbvre voor de samenwerking tijdens de PFP- en CIPC-experimenten, Margriet Ferwerda voor de foto's van figuren 6 en 7 en Theo Saat voor de NR-vivo analyse van fusie-experiment 2.

5.Referenties

Bates,G.W., C.A.Hasenkampf, C.L.Contolini and W.C.Piastuch (1987): Asymmetric hybridization in **Nicotiana** by fusion of irradiated protoplasts. Theor. Appl. Genet. 74: 718-726.

Bokelmann,G.S. and S.Roest (1983): Plant regeneration from protoplasts of potato (**Solanum tuberosum** cv. Bintje). Z. Pflantzenphysiol. 109:259-265.

Chien,Y.-C., K.N.Kao and L.R.Wetter (1982): Chromosomal and isozyme studies of **Nicotiana tabacum** - Glycine max hybrid cell lines. Theor. Appl. Genet. 62: 301-304.

Clayton,L., and C.W.Lloyd (1984): The relationship between the division plane and spindle geometry in Allium cells treated with CIPC and griseofulvin: an anti-tubulin-study. Eur. J. of Cell Biol. 34: 248-253.

Dirks,R., I.Negrutiu, V.Sidorov and M.Jacobs (1985): Complementation analysis by somatic hybridisation and genetic crosses of nitrate reductase-deficient mutants of **Nicotiana plumbaginifolia**. Mol. Gen. Genet. 201: 339-343.

Dudits,D., O.Fejér, G.Hadlaczky, C.Koncz, G.B.Lázár and G.Horvath (1980): Intergeneric gene transfer mediated by plant protoplast fusion. Mol. Gen. Genet. 179: 283-288.

Evans,D.A., and O.L.Gamborg (1979): Effects of para-fluorophenylalanine on ploidy levels of cell suspension cultures of **Datura innoxia**. Envir. and Exp. Botany 19:269-275.

Everdink,W.J.van (1987): Pogingen tot genlocalisatie bij de aardappel (**Solanum tuberosum** L.) door middel van intraspecifieke somatische hybridisatie met **Nicotiana plumbaginifolia**. Doctoraalverslag vakgroep plant- en celgenetica, Biologisch Centrum, R.U.Groningen.

Gleba,Y.Y., and Sytnik (1984): . In: Gleba & Sytnik: Protoplast fusion. Genetic engeneering in higher plants. Springer Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo 1984.

Gleba,Y.Y., I.F.Kanevsky and N.N.Cherep (1984): Transmission genetics of **Nicotiana** hybrids produced by protoplast fusion. II Genetic constitution of **N. tabacum + N. plumbaginifolia** hybrid cell lines obtained using selective and nonselective screening methods. In: Gleba & Sytnik: Protoplast fusion. Genetic engeneering in higher plants. Springer Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo 1984.

Grafe,R., A.Marion-Poll and M.Caboche (1986): Improved in vitro selection of nitrate reductase-deficient mutants of **Nicotiana plumbaginifolia**. Theor. Appl. Genet. 73: 299-304.

Gupta,N., and P.S.Carlson (1972): Preferential growth of haploid cells in vitro. Nature 239:. 86-.

Gupta,P.P., M.Gupta and O.Schieder (1982): Correction of nitrate reductase defect in auxotrofic plant cells through protoplast-mediated intergeneric gene transfers. Mol. Gen. Genet. 188: 378-383.

Gupta,P.P., O.Schieder and M.Gupta (1984): Intergeneric nuclear gene transfer between somatically and sexually incompatible plants through asymmetric protoplast fusion. Mol. Gen. Genet. 197: 30-35.

Hamill,J.D., D.Pental and E.C.Cocking (1984): The combination of a nitrate reductase deficient nuclear genome with a streptomycin resistant chloroplast genome, in **Nicotiana tabacum**, by protoplast fusion. J. Plant Physiol. 115: 253-261.

Hermsen,J.G.Th., M.S.Ramanna and J.Vogel (1973): The location of a recessive gene for chlorophyll deficiency in diploid **Solanum tuberosum** by means of trisomic analysis. Can. J. Genet. Cytol. 15: 807-813.

Imamura,J., M.W.Saul and I.Potrykus (1987): X-ray irradiarion promoted asymmetric somatic hybridisation and molecular analysis of the products. Theor. Appl. Genet. 74: 445-450.

Installé,P., I.Negrutiu and M.Jacobs (1985): Protoplast-derived plants in **Nicotiana plumbaginifolia** Viviani: improving the regeneration response of wild type and mutant cultures. J. Plant Physiol. 119: 443-454.

Jaworski, E.G. (1971): Nitrate reductase assay in intact plant tissue. Biochem. Biophys. Res. Comm. 43: 1274--1279.

Kao,K.N. (1977): Chromosomal behaviour in somatic hybrids of soybean-**Nicotiana glauca**. Molec. Gen. Genet. 150: 225-230.

Kao,F.T. (1983): Somatic cell genetics and gene mapping. Int. Rev. Cytol. 85: 109-146.

Kao,F.-T., C.Jones and T.T.Puck (1976): Genetics of somatic mammalian cells: Genetic, immunologic, and biochemical analysis with Chinese hamster cell hybrids containing selected human chromosomes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73: 193-197.

Keller,W.A., and G.Melchers (1973): The effect of high pH and calcium on tobacco leaf protoplast fusion. Z. Naturforsch. 28: 737-741.

Larizza,L., G.Simoni, F.Tredici and L.de Carli (1974): Griseofulvin: a potential agent of chromosomal segregation in cultured cells. Mut. Research 25: 123-130.

Müller,A.J., and R.Grafe (1978): Isolation and characterisation of cell lines of **Nicotiana tabacum** lacking nitrate reductase. Mol. Gen. Genet. 161: 67-76.

Murashige,T. and F.Skoog (1962): A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.

Negrutiu,I. (1981): Improved conditions for large-scale culture, mutagenesis, and selection of haploid protoplasts of **Nicotiana plumbaginifolia** Viviani. Z. Pflanzenphysiol. 104: 431-442.

Negrutiu,I., R.Dirks and M.Jacobs (1983): Regeneration of fully nitrate-reductase-deficient mutants from protoplast cultures of **Nicotiana plumbaginifolia** (Viviani). Theor. Appl. Genet. 66: 341-347.

Niizeki,H., and K.Fukui (1983): Elimination of somatic chromosomes in strawberry plants by treatment with para-fluorophenylalanine. Japan J. Breed. 33(1): 55-61.

Pental,D., J.D.Hamill, A.Pirrie and E.C.Cocking (1986): Somatic hybridisation of **Nicotiana tabacum** and **Petunia hybrida**. Mol. Gen. Genet. 202: 342-347.

Pijnacker,L.P., and M.A.Ferwerda (1982): Normal and BrdC-substituted chromosomes during spermatogenesis with an endomeiotic chromosome reduplication in **Carausius morosus** Br.. Chromosoma 85: 67-82.

Pijnacker,L.P., and M.A.Ferwerda (1984): Giemsa C-banding of potato chromosomes. Can. J. Genet. Cytol. 26: 415-419.

Pijnacker,L.P., K.Walch and M.A.Ferwerda (1986): Behaviour of chromosomes in potato leaf tissue cultured in vitro as studied by BrdC-Giemsa labelling. Theor. Appl. Genet. 72: 833-839.

Pontecorvo,G. (1971): Induction of directional chromosome elimination in somatic cellhybrids. Nature 230: 367-369.

Puck,T.T. and F.T.Kao (1967): Genetics of somatic mamalian cells,V. Treatment with 5-BromodeoxyUridine and visable light for isolation of nutritionally deficient mutants. Proc. Nat. Ac. Sc. 38:1227-1234.

Ross,H. and E.Jacobsen (1975): Beobachtungen an Nachkommenschaften aus Kreuzungen zwischen dihaploiden und tetraploiden Kartoffelformen: Samenzahl, Ploidiestufen sowie Spaltungsverhaltnisse des Gens für extreme Resistenz gegen das X-Virus (Rx_{acl}). Z. Pflanzenzucht 76: 265-280.

Roth,E.J. and K.G.Lark (1984): Isopropyl-n-(3-chlorophenyl)carbamate (CIPC) induced chromosomal loss in soybean: a new tool for plant somatic cell genetics. Theor. Appl. Genet. 68: 421-431.

Roth,E.J., G.Weber and K.G.Lark (1982): Use of isopropyl-n(3-chlorophenyl)carbamate (CIPC) to produce partial haploid cells from suspension cultures of Soybean (**Glycine max.**). Plant Cell Rep. 1: 205-208.

Sidorov,V.A., M.K.Zubko, A.A.Kuchko, I.K.Komarnitsky and Y.Y.Gleba (1987): Somatic hybridization in potato: use of γ-irradiated protoplasts of **Solanum pinnatisectum** in genetic reconstruction. Theor. Appl. Genet. 74: 364-368.

Tempelaar, M.J. and M.G.K.Jones (1985a): Fusion characteristics of plant protoplasts in electric fields. Planta 165: 205-216.

Tempelaar,M.J. and M.G.K.Jones (1985b): Analytical and preperative electrofusion of plant protoplasts. Oxford Surv. Pl. Mol. & Cell Biol. 2: 347-351.

Tempelaar,M.J. and M.G.K.Jones (1985c): Directed electrofusion between protoplasts with different responses in a mass fusion system. Plant Cell Reports 4:92-95.

Tempelaar,M.J., A.Duyst, S.Y.de Vries, G.Krol, C.Symmonds and M.G.K.Jones (1987): Modulation and direction of the electrofusion response in plant protoplasts. Plant Science 48: 99-105.

Vries,S.E.de, R.Dirks, R.R.Mendel, J.G.Schaart and W.J.Feenstra (1986): Biochemical characterization of some nitrate reductase deficient mutants of **Nicotiana plumbaginifolia**. Plant Science 44: 105-110.

Vries,S.E.de, E.Jacobsen, M.G.K.Jones, A.E.H.M.Loonen, M.J.Tempelaar, J.Wijbrandi and W.J.Feenstra (1987a): Somatic hybridization of amino acid analogue - resistant cell lines of potato (**Solanum tuberosum** L.) by electrofusion. Theor. Appl. Genet. 73: 451-458.

Vries,S.E.de, E.Jacobsen, M.G.K.Jones, A.E.H.M.Loonen, M.J.Tempelaar, J.Wijbrandi and W.J.Feenstra (1987b): Electrofusion of biochemically well characterized nitrate reductase deficient **Nicotiana plumbaginifolia** mutants. Studies on optimization and complementation. Plant Science, 51: 105-112.

Vries,S.E.de, M.A.Ferwerda, A.E.H.M.Loonen, L.P.Pijnacker and W.J.Feenstra (1987c): Chromosomes in somatic hybrids between **Nicotiana plumbaginifolia** and a monoploid potato. Theor. Appl. Genet. 75: 170-176.

Wagenfoort,M. (1982): Location of the recessive gene **ym** (yellow margin) on chromosome 12 of diploid **Solanum tuberosum** by means of trisomic analysis. Theor. Appl. Genet. 61: 239-243.

6.Appendix: media

Voor Scheutcultures

MS10

4.7 gr MS
10 gr Sucrose
in 1 liter aqua dest
pH 5.6, autoclaveren

Voor protoplast-isolatie

Enzymmedium

50 ml Spoelmedium
0.3 gr Cellulase (Onazuka R10)
0.06 gr Macerozyme

oplossen, filteren over papierfilter
pH 5.5, filtersteriliseren

Spoelmedium

190 mg KNO_3
44 mg $CaCl_2.2H_2O$
37 mg $MgSO_4.7H_2O$
17 mg KH_2PO_4
91.1 gr Mannitol

in 1 liter aqua dest
pH 5.5, autoclaveren

0.57 M Sucrose

97.5 gr Sucrose
in 500 ml aqua dest
pH 5.5, autoclaveren

Voor regeneratie van protoplasten

GS-MEDIUM

100	ml	K6 macro
0.25	ml	PG micro
20	ml	Fe-EDTA stock
5	ml	Vit. Morel stock
25	ml	AO stock
63.2	mg	$CaHPO_4.2H_2O$
3	mg	NAA
1	mg	BAp
33.3	ml	NH_4-succinaat stock
30	g	sucrose
60	g	mannitol

in 1 liter aqua dest
pH 5.8, filtersteriliseren.
Aangepast aan KA_1AO, referenties: Negrutiu 1981
Installé et al. 1985

GS/60-GS/30 (laag hormoon medium)

als GS-medium
m.u.v. AO stock: 7.5 ml
NAA : 0.03 mg
BAp : 0.1 mg
mannitol: 60, 50, 40, of 30 g/l

K6-MACRO-elementen stock (10*)

0.25	g	$NaH_2PO_4.2H_2O$
4.5	g	$CaCl_2.2H_2O$
2.5	g	$MgSO_4.7H_2O$
1.34	g	$(NH_4)_2SO_4$

in 1 liter aqua dest
(autoclaveren)

PG-micro-elementen stock (4000*)

620	mg	H_3BO_3
1680	mg	$MnSO_4.H_2O$
1060	mg	$ZnSO_4.7H_2O$
1583	mg	KI
25	mg	Na_2MoO_4
2.5	mg	$CuSO_4.5H_2O$
2.5	mg	$CoCl_2.6H_2O$

in 1 liter aqua dest.

Fe-EDTA stock (50*)

1390 mg $FeSO_4.7H_2O$
1865 mg Na_2EDTA
in 500 ml aqua dest.

Vitamine Morel stock (200*)

500 mg Ca-panthotenaat
50 mg Myo-inositol
5 mg Biotine
500 mg Nicotinezuur
500 mg Pyridoxine-HCl
500 mg Thiamine

in 1 liter aqua dest.

AO stock (40-70*)

0.4 g Pyruvaat
0.8 g Malaat
0.8 g Citroenzuur
0.8 g Fumaraat

in 500 ml aqua dest.

NH_4-succinaat stock (30*)

8.86 gr Barnsteenzuur
11.23 ml NH_3-opl.

in 500 ml aqua dest.

Voor groei en selectie van callus

MSC

4.7 gr MS
30 gr Sucrose
67 ml NH_4-succinaat (150 mM stock)
5 mg Thiamine
1 mg NAA
1 mg BAp

in 1 liter aqua dest
pH 5.8, autoclaveren

A

4.7 gr MS
20 gr sucrose
1 mg 2,4-D
0.2 mg Kinetine
0.1 mg GA_3

in 1 liter aqua dest
pH 5.8, autoclaveren

AA (+chloraat)

0.78 gr MS zonder nitraat (Gibco)
20 gr Sucrose
2.94 gr KCl
9.6 mg Glycine
100 mg Inositol
0.5 mg Nicotinezuur
0.5 mg Pyridoxine-HCl
1 mg Thiamine-HCl
876.6 mg L-Glutamine
266.2 mg L-Asparaginezuur
174.2 mg L-Arginine
1 mg 2,4-D
0.2 mg Kinetine
0.1 mg GA_3
(6.13 gr $KClO_4$ = 50 mM)

in 1 liter aqua dest
pH 5.8, autoclaveren