

INVLOED VAN INBEDDING IN Ca-ALGINAAT OP DE CYTOKINESE- EN
KARYOKINESE-FREQUENTIE VAN PROTOPLASTEN VAN Nicotiana tabacum
EN Solanum tuberosum (cv. ASTARTE).

Door: E. Nales

Doctoraalverslag bij de vakgroep cel- en plantengenetica.

Periode: 1-10-1990 tot 1-6-1991.

Begeleider: W. J. van Everdink.

Inhoudsopgave:

	pagina.
- <u>Samenvatting.</u>	:1
- <u>Inleiding.</u>	:2
- <u>Materiaal en methoden.</u>	:6
§1. Steriliteit.	:6
a. Handelingen.	
b. Media.	
§2. Meten van de osmolaliteit.	:6
§3. Isolatie van protoplasten.	:7
§4. Het gebruik van de haemocytometer.	:8
§5. De cultuur van protoplasten.	:8
a. In suspensie.	
b. In Ca-alginaat.	
§6. Protoplasten uit de Ca-alginaat halen.	:9
§7. Groottebepaling van de protoplasten.	:9
§8. Cultuurmedia met verschillende osmolaliteit.	:10
§9. Fluorescentiemicroscopie.	:10
§10. Kleuringen.	
§10.1 Fluorescerende kleurstoffen.	:11
a. Calcofluor white.	
b. Acridine orange.	
c. Hoechst 33342 en Hoechst 33258.	
d. Congo rood.	
e. Aniline blue.	
§10.2 Niet fluorescerende kleurstoffen.	:13
a. Giemsa.	
b. Orceïne.	
c. Chlorazol Black E.	
d. Fuchsine kleuring.	
§11. Behandeling met cellulase.	:15
§12. Tellen van de kern- en celdeling.	:15
a. Celdeling met calcofluor white.	
b. Delingen tellen met Giemsa.	
- <u>Resultaten.</u>	:17
§1. Opbrengst van de isolatie van bladprotoplasten.	:17
§2. Verschillen in de groei in alginaat en in suspensie.	:17
§3. Groottebepaling in media met een verschillende osmolaliteit.	:18
§4. Kleuringen.	
§4.1 Fluorescerende kleurstoffen.	:19
a. Calcofluor white.	
b. Acridine orange.	
c. Hoechst 33342 en Hoechst 33258.	
d. Congo rood.	
e. Aniline blue.	
§4.2 Niet fluorescerende kleurstoffen.	:20
a. Giemsa.	
b. Orceïne.	
c. Chlorazol Black E.	
d. Fuchsine kleuring.	
§5. Behandeling met cellulase.	:21
§6. Tellen van de kern- en celdeling.	:22
a. Celdeling met calcofluor white.	
b. Delingen tellen met Giemsa.	

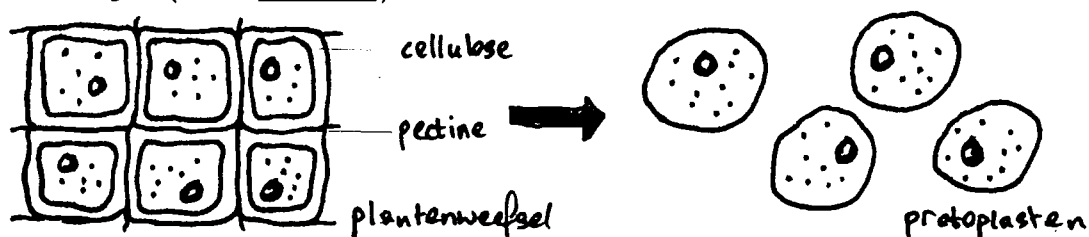
- <u>Discussie.</u>	:29
- <u>Conclusies.</u>	:33
- <u>Referenties.</u>	:35
- <u>Bijlagen.</u>	:36

Samenvatting:

Er werd gekeken naar de groei van protoplasten van Nicotiana tabacum en Solanum tuberosum (cv. Astarte). In het begin van de cultuur van deze protoplasten konden diverse chromosomale afwijkingen ontstaan, die samengevat werden onder het begrip somaclonale variatie. Eén van deze afwijkingen was de vorming van meerkernige protoplasten. Uit onderzoek was gebleken, dat als protoplasten werden ingebed in alginaat de celdeling verbeterde. Nu werd er gekeken of deze verbeterde celdeling ook gevolgen had op het ontstaan van meerkernige protoplasten. Hierbij werden protoplasten ingebed in 1% of 1,4% alginaat, daarna werden de cel- en kerndeling gevolgd met calcofluor white en Giemsa-kleuring. De protoplasten van dag nul tot dag vijf werden verzameld en gekleurd. Uit tellingen bleek, dat er met calcofluor white geen grote verschillen in celdeling tussen protoplasten in alginaat en in suspensie te zien waren. Na tellen van de met Giemsa gekleurde protoplasten bleek, dat er zowel verschillen waren in de celdeling als in het ontstaan van meerkernige protoplasten. Het bleek, dat bij protoplasten van tabak in suspensie de celdeling het beste verliep. Ook werden hier de minste meerkernige protoplasten waargenomen. Bij Astarte werd het hoogste percentage celdeling waargenomen in 1% alginaat, maar ook in 1,4% alginaat delen de protoplasten beter, dan als ze niet werden ingebed in alginaat. Het laagste percentage acytokinese werd bij Astarte gevonden in protoplasten die waren ingebed in 1,4% alginaat.

Inleiding:

Een plant bestaat uit cellen die omgeven zijn door een celwand, die voornamelijk uit cellulose bestaat. Tussen de plantencellen zit een middenlamel, waarvan het grootste bestanddeel pectine is en dit lamel houdt de cellen bij elkaar. Als van plantencellen de celwanden en de middenlamellen worden verwijderd dan ontstaan er losse ronde cellen. Als van een plantencel de celwand verwijderd wordt, dan verdwijnt de vorm van de celmembraan. De druk op alle punten van de membraan wordt gelijk en er ontstaat een ronde vorm. Deze ronde cellen zonder celwand heten protoplasten. Deze protoplasten komen vrij wanneer de celwand geheel of gedeeltelijk is verdwenen. Als deze protoplasten een celwand vormen dan heten ze weer cellen. (N.B. Om verwarring te voorkomen wordt in het verslag geen onderscheid gemaakt tussen protoplasten en cellen, die uit protoplasten zijn ontstaan.) Om van een plantencel een protoplast te maken zijn in ieder geval twee processen noodzakelijk (zie fig. 1).



Figuur 1 Protoplasten verkrijgen uit plantenweefsel.

1. Het verwijderen van de pectine tussen de cellen om ze los van elkaar te krijgen.

2. Het afbreken van de cellulose in de celwand.

Tegenwoordig is het met enzymen mogelijk grote hoeveelheden protoplasten te isoleren uit verschillende plantenweefsels, zoals bladeren, stengels en wortels.

Protoplasten krijgen in het gebruik de voorkeur boven plantencellen, omdat ze beter in staat zijn te delen. Daarnaast zijn er nog andere toepassingen die specifiek zijn voor protoplasten of waar protoplasten beter voor kunnen worden gebruikt, dit zijn achtereenvolgens:

1. Fusie.
2. Opname (of injiceren) van organellen.
3. Opname van DNA.
4. Mutant isolatie.

1. Het fuseren van protoplasten kan op twee manieren: met PEG (polyethyleenglycol) of met electrofusie.

Fusie van protoplasten brengt de genomen en de cytoplasma's van twee cellen bijeen. Het verschil met een kruising is:

a. Er worden geen eisen gesteld aan de mate van verwantschap van de fusiepartners.

b. Bij kruising brengt de mannelijke gameet in het algemeen geen cytoplasma mee dus kan er in principe geen recombinatie van genetische informatie in celorganellen plaatsvinden, dit kan na fusie wel.

c. Door de kern van één van de fusiepartners uit te schakelen en het cytoplasma van de ander kan door deze cellen te laten fuseren (cybridisatie) een nieuwe kern/cytoplasma combinatie worden gemaakt.

2. Opname van organellen kan op twee manieren worden gerealiseerd. Meestal vindt dit plaats in de vorm van fusie. Een andere methode is dat de organellen met een micro-injektienaald in een cel worden geïnjecteerd.

3. Opname van DNA kan leiden tot transformatie. Net als bij fusie moet de membraan worden aangetast, omdat plantencellen niet zoals sommige bacteriën over een actief opnamesysteem voor DNA beschikken. Doorlaatbaar maken van de membraan kan met PEG, maar het is ook mogelijk om te werken met electroporatie, waarbij door een elektrische puls poriën ontstaan.

4. Het gebruik van protoplasten voor mutantenisolatie heeft voordelen boven het gebruik van een celsuspensie of losse bladcellen.

a. Bij uitplaten ontstaat elk callus uit één cel.

b. Als men uitgaat van bladprotoplasten dan hebben op het moment van isoleren nog geen chromosomale veranderingen plaatsgevonden.

c. Protoplasten delen beter dan losse bladcellen.

Dit zijn de toepassingen waar protoplasten voor gebruikt kunnen worden en waar cellen niet of minder goed geschikt voor zijn. Er kleven echter ook bezwaren aan het gebruik van protoplasten. Nadeel van een protoplast is dat deze veel gevoeliger is dan een plantencel. Dit komt doordat een protoplast slechts omgeven is door een dun membraan, dat geen of weinig stevigheid biedt. Wanneer de osmolaliteit van het medium, waarin de protoplast zich bevindt anders is dan de interne osmolaliteit kan de protoplast hierdoor inkrimpen of zelfs exploderen, omdat er niet langer een celwand is die tegendruk biedt.

Er zijn twee belangrijke problemen die het gebruik van protoplasten bemoeilijken:

1. Bij verschillende economisch belangrijke soorten (vooral monocotylen) is het nog niet gelukt om planten te regenereren.

2. Een hoge graad van somaclonale variatie wordt waargenomen in de regeneranten.

Dit laatste is een serieus probleem, dat al lang is onderzocht en ontstaat door verschillende mechanismen (of foutief verloopende processen):

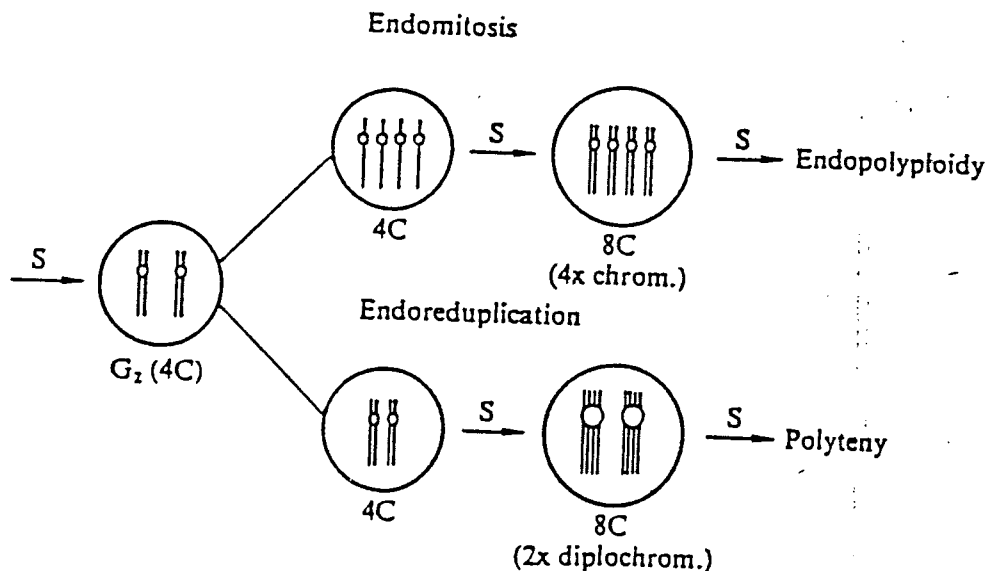
A) Teruggave mitose (restitutional mitoses).

Dit mechanisme, dat leidt tot somaclonale variatie ontstaat als het spoelfiguur niet goed functioneert (tijdens de anafase of soms tijdens de metafase), waardoor de chromosomen niet of niet goed uit elkaar worden getrokken. Ze leidt tot de vorming van een polyploïde restitutie kern. Spoelfiguur verstoringen kunnen vaak worden geassocieerd met verkeerde bewegingen van chromosomen.

B) Endomitose.

Bij endomitose vindt er net als bij een gewone mitose eerst contractie plaats van de chromosomen. In dit geval heet dit een endoprofase, waarna de kernmembraan niet verdwijnt, zoals in een normale prometafase zou gebeuren. Nu contraheren de chromosomen zich verder (endometafase). De kernmembraan blijft aanwezig en de chromatiden splitsen zich parallel aan elkaar (endoanafase). Daarna decondenseren ze zich weer om de rustende kernstructuur aan te nemen.

C) Chromosoom-endoreduplicatie.
 Chromosoom-endoreduplicatie (ER) is een endonucleaire chromosoom duplicatie die optreedt in de interfase in de afwezigheid van elke vorm van condensatie of decondensatie stappen. Endoreduplicatie leidt tot de vorming van chromosomen met 2^n (4,8,16,32) chromatiden (polytenie), terwijl het chromosoomaantal gelijk blijft. De laagste graad van polytenie wordt gekenmerkt door de aanwezigheid van diplochrosomen (chromosomen met 4 chromatiden), welke ontstaan door twee opeenvolgende ronden van DNA-replicatie zonder mitose (S_1 en S_2).



Figuur 2 Verschil tussen endomitose en endoreduplicatie.
 G_2 : DNA post-synthese fase. C: kern DNA-inhoud.
 S: DNA synthese fase.

D) A-cytokinetische mitose.
 Dit is een belangrijk mechanisme dat mogelijk verantwoordelijk is voor een groot deel van de somaclonale variatie. Een a-cytokinetische mitose is een mitose, waar aan het einde geen cytokinese plaatsvindt. Er wordt dan geen of een onvolledige tussenwand gevormd. Het resultaat is een tweekernige cel. Als deze tweekernige cel één of meerdere a-cytokinetische mitoses ondergaat kan er een cel ontstaan met 4 of meer kernen.

E) Spoelfiguur fusie (spindle fusion).
 Omdat de kernen van een meerkernige cel in het algemeen synchroon delen is er een kans (vooral in kleinere cellen) op spoelfiguur fusie (SF). Hiervoor zijn er twee mogelijkheden. Ten eerste kunnen de metafaseplaten van verschillende kernen fuseren. De tweede mogelijkheid ontstaat bij de anafase, als er twee polen dicht bij elkaar in de buurt liggen of als twee groepen chromosomen naar dezelfde pool worden getrokken. Als de chromosomen dan gaan decondenseren is het mogelijk, dat ze door één kernmembraan worden omgeven. Duidelijk is, dat deze diverse processen allen tot de vorming van poly- of aneuploïde kernen leiden. Om genetisch onderzoek te doen met protoplasten heeft men een stabiel systeem nodig.

Door deze vorm van variatie heeft men dit echter niet. Hierdoor kunnen de uitkomsten van het onderzoek beïnvloed worden en dat is niet wat een onderzoeker wil.

Uit experimenten is gebleken, dat als protoplasten ingebed worden in een gel de plating efficiency toeneemt ten opzichte van protoplasten die niet worden ingebed. Plating efficiency is in het algemeen het percentage protoplasten, dat kolonies gaat vormen. Hierbij is niet duidelijk of men uitgaat van het totaal aantal ingezette protoplasten of van de protoplasten die blijven leven (ref. 3,4 en 5). Ook het tijdstip waarop men deze plating efficiency bepaald varieert in diverse artikelen van twee tot zes weken. Het is wel duidelijk, dat protoplasten ingebed in een gel vaker in deling gaan. Plantencellen zijn betrekkelijk gevoelig voor veranderingen in het milieu en daarom mogen alleen de zachtste methoden van immobilisatie gebruikt worden.

Enkele stoffen die hier het meest voor in aanmerking komen zijn agar, agarose en alginaat. Met agar en agarose heeft men ook in het verleden al goede resultaten behaald. Voor onderzoek, waarbij de protoplasten weer makkelijk uit de gel te halen moeten zijn hebben deze twee stoffen een groot nadeel. Om de gel vloeibaar te maken zijn temperatuursstijgingen noodzakelijk waar de protoplasten hinder van ondervinden. Bij het inbedden van protoplasten in alginaat kent men deze problemen niet, omdat deze gel gevormd wordt door kationafhankelijke dwarsverbindingen, die ontstaan door toevoeging van tweewaardige kationen (bv. Ca^{2+}). Om de gel weer vloeibaar te maken kan men een chelaterend middel toevoegen, zoals EDTA of citraat. Uit experimenten is gebleken, dat alginaat de kolonievorming uit protoplasten stimuleert met een efficiëntie, die gelijk is aan die van een agarmedium.

Het doel van dit onderzoek is om te kijken of meer celdeling leidt tot minder meerkernige protoplasten. Als protoplasten vaker delen, terwijl de karyokinese gelijk blijft, dan zouden er minder meerkernige cellen moeten ontstaan. Een ander doel van het onderzoek is om te kijken wat dan de oorzaak is van de verbeterde deling. Voordat een protoplast gaat delen neemt zijn celvolume toe en verandert vaak zijn vorm. Door inbedding in een gel zou deze toename in volume wel eens minder kunnen zijn, waardoor de deling beter zou kunnen verlopen.

Het onderzoek wordt gedaan aan twee soorten, Nicotiana tabacum (=tabak) en Solanum tuberosum (cv. Astarte) (=Aardappel). In eerste instantie wordt er gekeken hoe de deling in Astarte verbetert, omdat in de aardappel veel chromosomale afwijkingen optreden en de deling van protoplasten die in cultuurmedium worden gekweekt slecht verloopt. N. tabacum wordt gebruikt als referentie, waarvan bekend is dat de deling ook zonder dat de protoplasten zijn ingebed altijd al relatief goed verloopt.

Materiaal & Methoden:

§1. Steriliteit.

a. Handelingen.

Een plantencel deelt met een betrekkelijk lage snelheid, ongeveer eens in de twee dagen. De media waarin losse plantencellen gekweekt worden bevatten alle stoffen die een plantencel nodig heeft om te groeien. Ze zijn dus zeer volledig en bevatten ook alle stoffen waarin bijna elke bacterie kan groeien. Bacteriën groeien meestal met een zeer grote snelheid, vooral als ze in een volledig medium zitten. Dit houdt in dat als er in de cultuur met protoplasten een infectie plaatsvindt van een bacterie, de protoplasten binnen enkele dagen overwoekerd zullen zijn door de bacteriën.

Om te voorkomen dat er infectie van bacteriën plaatsvindt moet er dus zeer steriel worden gewerkt. Alle steriele handelingen worden daarom uitgevoerd in een laminar flow bench. Uit deze laminar flow bench komt een constante steriele stroom lucht. De zwevende bacteriën en stofdeeltjes worden zo uit de kast geblazen. Het werkblad en de handen worden met alcohol afgenomen en de instrumenten worden geflambeerd en afgekoeld in alcohol.

b. Media.

Er zijn twee methoden om de media en andere oplossingen te steriliseren:

1. Door autoclaveren, waarbij de bacteriën door de hoge temperatuur gedood worden.
2. Door filtersterilisatie, waarbij de media door een filter met openingen van $0.2 \mu\text{m}$ worden gehaald. Deze openingen zijn zo klein, dat de bacteriën op het filter blijven liggen. Deze tweede methode wordt veel gebruikt voor protoplasten media. Deze media bevatten alle stoffen, die protoplasten voor hun groei nodig hebben en zijn daardoor zeer complex. Door autoclaveren kunnen er kleine hoeveelheden schadelijke stoffen ontstaan en plantencellen zijn hier zeer gevoelig voor. Een andere reden voor filtersterilisatie van de media is, dat door hydrolyse van grotere moleculen de osmolaliteit van het medium wordt verhoogd.

§2. Meten van de osmolaliteit.

De osmolaliteit die gebruikt wordt voor de cultuur van protoplasten is een osmolaliteit, die gelijk is aan de interne osmolaliteit op het moment van isolatie, dit is ongeveer 500 mOsm. Dit is noodzakelijk, omdat een protoplast niet omgeven is door een celwand, die voor stevigheid kan zorgen. Een protoplast is daarom zeer gevoelig voor de osmolaliteit van de oplossing, waarin zij zich bevindt. Als deze osmolaliteit te hoog is zal de protoplast in elkaar krimpen. Is daarentegen de osmotische waarde van de oplossing te laag, dan zal de protoplast knappen. De osmolaliteit van een oplossing wordt bepaald met een osmometer. Voor het bepalen van de osmolaliteit wordt een monster genomen van $100 \mu\text{l}$. De osmometer meet de osmolaliteit door een bepaling van het vriespunt van de te meten oplossing. Als de osmolaliteit van een medium toeneemt zal deze bij een lagere temperatuur pas bevriezen.

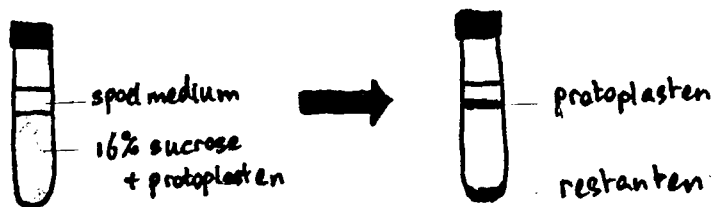
De daling van het vriespunt beneden dat van puur water is een direkte meting van de osmotische waarde. Puur water bevriest bij 0 °C, een oplossing van een stof in water met een osmolaliteit van 1 Osmol/kg water bevriest bij -1,858 °C.

§3. Isolatie van protoplasten.

De planten, waaruit de protoplasten worden geïsoleerd zijn twee tot vier maanden oud. Ze worden om de vier weken tot de bodem teruggesnoeid. Als de MS10, waarin de plantjes groeien is volgegroeid of als deze gaat barsten, dan worden de plantjes weggegooid. Van de planten, worden alleen de jonge groene blaadjes gebruikt om protoplasten uit te maken.

Er wordt gewerkt met protoplasten, die worden geïsoleerd uit bladmateriaal. De cellen in de bladeren zijn gedifferentieerd. Na behandeling met de enzymen cellulase en macerozyme vindt er een dedifferentiatie van deze cellen plaats. De protoplasten, die op deze wijze uit het bladmateriaal worden geïsoleerd zijn daarom ongedifferentieerd. In dit geval worden de protoplasten gemaakt van mesophylcellen, die uit de bladeren van de gewenste plantensoort worden geïsoleerd. Mesophylcellen hebben een grote vacuole en hun voornaamste taak in het blad is fotosynthetiseren. De protoplasten worden geïsoleerd uit de jonge blaadjes van de planten met de enzymen cellulase (breekt de cellulose af) en macerozyme (breekt de pectine tussen de plantencellen af, waardoor de cellen los komen van elkaar). Deze enzymen bevinden zich in het enzymmedium (zie bijlage 1). De procedure is als volgt, de blaadjes worden eerst van de plant afgesneden en in een speciaal gecoate petrischaal gesneden. Vervolgens wordt het gesneden bladmateriaal gespoeld met spoelmedium (zie bijlage 1) om eventueel vrijgekomen schadelijke stoffen te verwijderen, zoals ethyleen, dat vrijkomt als plantencellen worden verwond. Dan wordt er tien milliliter enzymmedium toegevoegd en wordt de petrischaal overnacht geïncubeerd bij 25°C in het donker.

De volgende dag wordt de suspensie enkele malen opgezogen in een tien milliliter plastic pipet, zodat er meer protoplasten loskomen uit het bladmateriaal. Vervolgens wordt deze suspensie door steriele filters van 425 µm en 106 µm gezeefd, waardoor de niet afgebroken delen van de blaadjes achterblijven op de filters. Daarna wordt deze suspensie over steriele buizen verdeeld en vier minuten gecentrifugeerd in een MSE-tafelcentrifuge (met swing-out rotor) bij 62,5 g. Het supernatant wordt afgegoten en de pellets worden in een buis geresuspendeerd in spoelmedium en deze suspensie wordt gecentrifugeerd (4 min, MSE-centrifuge 62,5 g). Nog een keer wordt het supernatant afgegoten en de protoplasten worden geresuspendeerd in 'floating' medium (zie bijlage 1). Hierop wordt een laagje spoelmedium aangebracht en dan worden de protoplasten omhooggedraaid door tien minuten te centrifugeren in een MSE-centrifuge bij 111 g. De protoplasten gaan naar boven, omdat de gemiddelde dichtheid van deze protoplasten lager is dan die van het 'floating' medium (zie fig. 3).

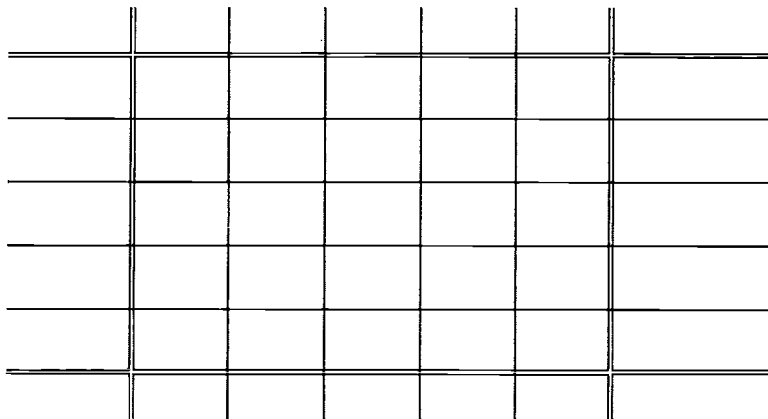


Figuur 3. Het omhoogdraaien van de protoplasten op 'floating' medium.

De protoplasten worden dan voorzichtig afgezogen en de opbrengst wordt bepaald met een haemocytometer.

§4. Het gebruik van de haemocytometer.

Het gebruik van de haemocytometer berust op het gegeven, dat onder het dekglasje van de haemocytometer een vooraf bekend volume protoplastensuspensie past. Onder het telhokje (zie fig. 4) komt een volume van precies 0,1 μ l.



Figuur 4 Telhokje van de haemocytometer.

Binnen dit telhokje wordt het aantal protoplasten geteld. Alleen de protoplasten die links of aan de bovenkant gedeeltelijk binnen het telhokje vallen worden meegeteld. Dit aantal wordt dan vermenigvuldigd met 10.000 om het aantal per ml te krijgen.

§5. De cultuur van de protoplasten.

1. In suspensie.

Het cultuurmedium (zie bijlage 2) waarin de protoplasten worden gekweekt, Km8p (ref. 12, zie bijlage 1) is zeer complex. Het bevat onder meer kokosmelk en de fytohormonen NAA, BAP en zeatine. De protoplasten worden gekweekt in speciaal gecoate petrischalen. De coating van de petrischalen dient ervoor dat de suspensie met protoplasten over de gehele bodem wordt verspreid. Daarnaast voorkomt ze dat de protoplasten worden beschadigd als ze in aanraking komen met de plastic wand van de petrischaal. De concentratie waarin de protoplasten worden gekweekt is $5 \cdot 10^4$ prpl/ml of $2.5 \cdot 10^4$ prpl/ml.

Deze laatste concentratie wordt gebruikt om het zicht in de alginaatgel voldoende groot te houden.

De cultures worden gekweekt bij 25 °C in het donker.

2. In Calcium-alginaat.

Bij het inbedden in Ca-alginaat is het van belang dat dit zeer voorzichtig gebeurt aangezien de Na-alginaatoplossing visceus is en de protoplasten gemakkelijk beschadigd kunnen worden tijdens het mengen.

Er worden twee concentraties alginaat gebruikt, een uiteindelijke concentratie van 1.0% en van 1.4%. Voordat de protoplastensuspensie wordt gemengd met de alginaat wordt ze eerst gespoeld met een KCl-oplossing. Dit spoelen is noodzakelijk, omdat het spoelmedium, waar de protoplasten in zitten Ca^{2+} -ionen bevat, die de Na-alginaat te vroeg zou kunnen laten geleren, voordat deze verdeeld is over verschillende petrischalen. Na het spoelen worden de protoplasten op volume gebracht met een mannitol-oplossing.

Bij de protoplasten wordt een gelijk volume Na-alginaat gevoegd (zie bijlage 2). Om de Na-alginaat te laten geleren dienen er Ca^{2+} -ionen te worden toegevoegd. Hiervoor zijn van tevoren CaCl_2 -agarplaatjes gegoten met 20 mM Ca^{2+} (zie bijlage 2).

De protoplast/alginaat suspensie wordt hierop gedruppeld (2 ml. per plaatje) en goed over de plaatjes verspreid door deze voorzichtig heen en weer te zwenken. De calcium diffundeert naar de alginaat die na ongeveer een uur zal zijn gegeleerd. Hierna worden de gelletjes van de calciumagar-plaat gehaald met twee pincetten en overgebracht naar een petrischaal met acht milliliter cultuurmedium. Deze wordt dan geïncubeerd in een stoof bij 25 °C in het donker.

§6. Protoplasten uit de Ca-alginaat halen.

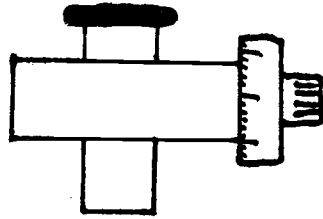
Voordat de kernen van de protoplasten worden gekleurd, is het nodig om de protoplasten uit de alginaat te halen. Hiervoor wordt de gel vloeibaar gemaakt door een chelaterend middel toe te voegen aan de ingebedde protoplasten (zie bijlage 2). De plakjes alginaat worden in kleine stukjes in een citraatoplossing gedaan en na ongeveer een uur zwenken is dan de alginaat vloeibaar geworden.

De werking van het chelaterende middel is gebaseerd op de hoge concentratie citraat, waardoor de Ca^{2+} -ionen met de citraat reageren en de alginaat loslaten. Als de alginaat vloeibaar is worden de protoplasten afgedraaid en het supernatant afgegoten.

§7. Grootte-bepalingen van de protoplasten.

Bij het bepalen van de grootte van de protoplasten wordt gebruik gemaakt van een oculair met schroefmicrometer.

Dit is een oculair met een vergroting van 12.5 x en een meetgebied van 10 mm. Hierbij wordt een dwars over het veld verloopende dunne lijn met behulp van een microschoef verplaatst, waarbij gehele millimeters op een vaste verdeling, die eveneens in het veld zichtbaar is, kunnen worden afgelezen. De stand van de lijn wordt afgelezen op een trommel, die aan de microschoefmeter bevestigd is en die in 100 delen is verdeeld (zie fig. 5).



Figuur 5 Een oculair met schroefmicrometer (Bleeker, Zeist).

Een deelinterval komt overeen met 0.01 mm in het beeld en in het object met een afstand gelijk aan 0.01 mm, gedeeld door de vergroting van het objektief.

Bij de vergroting 12.5 x 20 is $1\text{mm} \pm 0.05\text{ mm}$. Gemeten worden zowel gedeelde als ongedeelde protoplasten, waarbij in elke batch van totaal 50 (gedeelde en ongedeelde) protoplasten de grootte wordt bepaald.

§8. Cultuurmedia met verschillende osmolaliteit.

De protoplasten worden ingebed in een gel. Deze gel kan mogelijk druk op een protoplast uitoefenen op dezelfde manier als een celwand dit doet. De protoplasten in alginaat zijn daarom minder kwetsbaar voor veranderingen van de osmolaliteit. Hierdoor kan dan het medium, waarin de protoplasten worden gekweekt een andere osmolaliteit worden gegeven zonder dat de protoplasten directe schade ondervinden of knappen. De osmolaliteit, waarbij protoplasten niet krimpen of opzwellen is ongeveer 500 mosm.

Nu worden, om te kijken of ingebedde protoplasten minder hinder ondervinden van een andere osmolaliteit dan niet ingebedde protoplasten, cultuurmedia met een verschillende osmolaliteit gebruikt. Omdat de protoplasten na het isoleren opgelost zijn in spoelmedium of mannitol/alginaat met een osmolaliteit van 500 mosm, moet dit worden gecorrigeerd om een andere osmolaliteit vast te kunnen stellen. Om verschillende osmolaliteiten van het medium te krijgen wordt een volgend schema gebruikt:

- 8 ml medium 250 mosm + 2 ml prpl == molaliteit 300 mosm
- 8 ml medium 375 mosm + 2 ml prpl == molaliteit 400 mosm
- 8 ml medium 500 mosm + 2 ml prpl == molaliteit 500 mosm
- 8 ml medium 625 mosm + 2 ml prpl == molaliteit 600 mosm

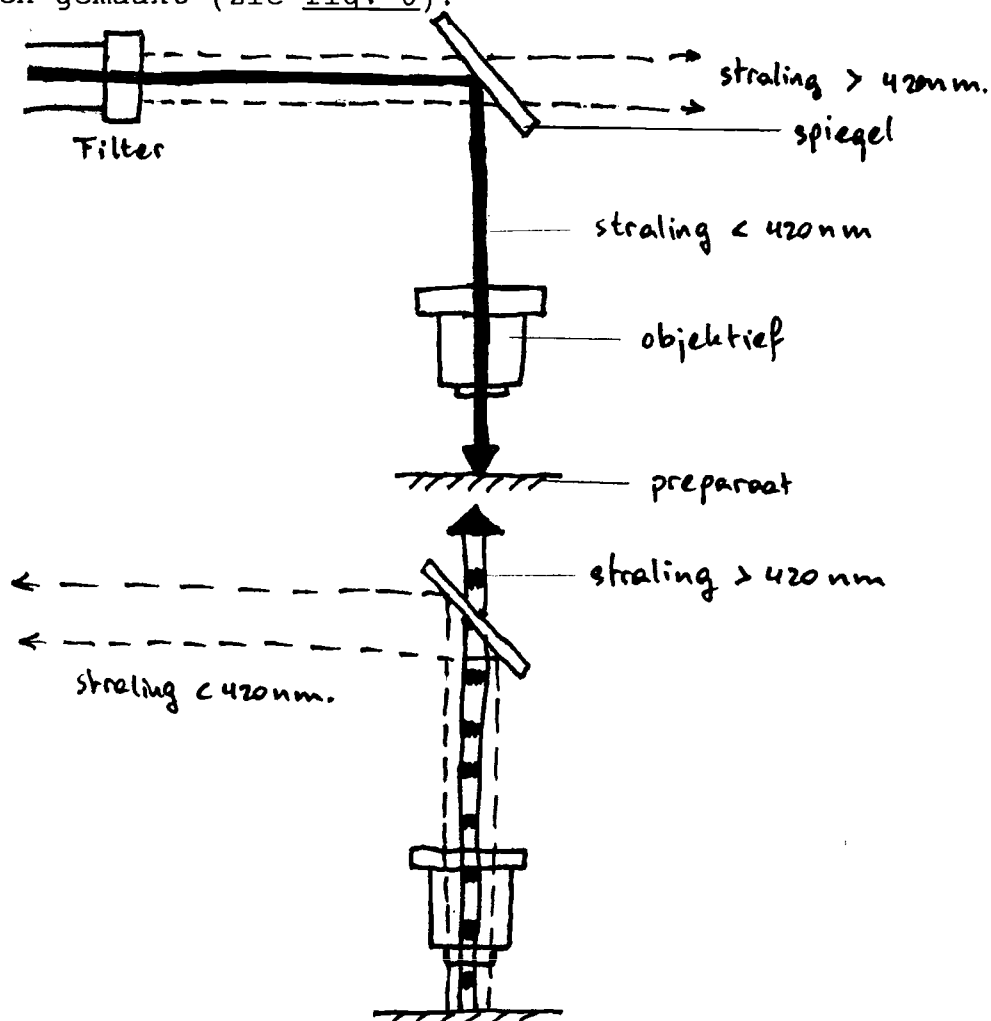
De diverse media worden gemaakt door uit te gaan van het cultuurmedium (zie bijlage 2), dat met glucose op een molaliteit van 250 mosm wordt gebracht.

De andere media worden verkregen door telkens meer glucose toe te voegen tot de volgende osmolaliteit wordt bereikt.

§9. Fluorescentiemicroscopie.

Het principe van de fluorescentiemicroscopie is, dat als een fluorescerende stof wordt blootgesteld aan licht van een bepaalde golflengte, dit stofje licht gaat uitzenden van een andere golflengte (met minder energie). Dit komt, doordat elektronen door lichtdeeltjes in een andere baan (met meer energie) worden gebracht, dit heet excitatie.

De elektronen vallen na korte tijd weer terug in hun oorspronkelijke baan, waarbij ze de overtollige energie kwijtraken door tegelijk een lichtdeeltje uit te zenden, dit lichtdeeltje heeft dan minder energie dan het oorspronkelijke deeltje. (Het uitzenden van licht op deze manier veroorzaakt heet fluorescentie.) En een lichtdeeltje met minder energie heeft een hogere golflengte. Met een speciale spiegel die licht van een lage golflengte reflecteert en licht met een hogere golflengte doorlaat kan deze fluorescentie zichtbaar worden gemaakt (zie fig. 6).



Figuur 6 Principe van de fluorescentiemicroscop.

Het voordeel van fluorescentiemicroscopie is dat, er minder storende werking van resten van dode cellen, tussen de protoplasten is, want door de hoge specificiteit van de fluorescerende stoffen zijn meestal alleen de delen die gebonden worden zichtbaar.

§10. Kleuringen.

§10.1 Fluorescerende kleurstoffen.

a. Calcofluor white (ref.6,7 en 8).

Geregenereerde celwanden van protoplasten in suspensie met medium kunnen worden gekleurd met een fluorescente oplichter, calcofluor white.

Deze fluorescente kleurstof wordt geëxciteerd in ultraviolet licht bij 365 nm en fluoresceert met een maximum bij 435 nm (blauw). De basis van deze positieve fluorescentie van calcofluor white is verbonden met de aanwezigheid in de celwand van β -gebonden glucoside speciaal in cellulose of chitine. De binding van calcofluor white is incorporatie in structurele polysacchariden (ref. 2,6 en 7). Calcofluor white wordt gebruikt in een concentratie van 0.01%.

De methode die wordt gebruikt om de celwanden met calcofluor white te kleuren is als volgt:

-Protoplasten in depolymerisatievloeistof of in cultuurmedium afdraaien.

-Spoelen met NaCl.

-50 μ l calcofluor white (0.01%) toevoegen aan 10 ml protoplasten in NaCl.

- \pm 10 minuten laten staan, daarna afdraaien in MSE-centrifuge 4 minuten bij 62,5 g.

-Spoelen met NaCl (2x).

-Hierna in een petrischaal doen en bekijken onder de fluorescentiemicroscopie met de juiste filters.

b. Acridine orange.

Kernen en nucleoli worden gekleurd door de fluorescerende kleurstof acridine orange.

Deze kleurstof is werkzaam, doordat deze zich bindt met dubbelstrengs en enkelstrengs nucleinezuren. Ze kleurt het DNA groen na excitatie met ultraviolet licht en RNA wordt oranje gekleurd.

Er wordt een stockoplossing gebruikt van 0.05 gram acridine orange in 100 ml. demiwater.

De protoplasten worden op de volgende wijze gekleurd met acridine orange. Een protoplastensuspensie wordt aangevuld met een gelijk volume acridine orange-oplossing. Daarna wordt de acridine orange-oplossing 15 minuten geïncubeerd. Vervolgens wordt de protoplastensuspensie aangevuld tot 10 ml. en afgedraaid in een MSE-centrifuge (4 min., 62,5 g). De protoplasten worden nog drie keer gespoeld met een NaCl-oplossing (van 500 mOsmol) en dan kunnen de protoplasten bekeken worden in een petrischaal met een fluorescentiemicroscopie met filter van 560 nm. Als de acridine orange in een lage concentratie bij de protoplasten wordt gevoegd dan kan deze ook als vitale kleurstof gebruikt worden.

c. Hoechst 33258 en Hoechst 33342 (ref. 9 en 10).

Dit zijn twee bis-benzimidazole kleurstoffen die als vitale kleuring gebruikt worden. Ze kunnen in een levende cel binnendringen, waar ze zich vervolgens aan het DNA binden.

Hoechst 33258 en Hoechst 33342 staan bekend als simpele fluorescentiekleuringen van de kernen. De concentratie Hoechst 33258, die wordt gebruikt is 4 mg/ml. Daarvan wordt 100 μ l toegevoegd aan een protoplastencultuur van 10 ml.

Na 10 tot 20 minuten zijn de kernen dan zichtbaar onder de fluorescentiemicroscopie.

Hoechst 33342 zit in een speciale oplossing en wordt gebruikt in een concentratie van 10 μ g/ml (zie bijlage 3). De kleuring van het DNA van de protoplasten gebeurt in drie stappen.

1. De pH van het medium waarin de protoplasten zitten wordt met 1M KOH op pH 10 gebracht.
2. Hoechst 33342 wordt toegevoegd tot een concentratie van 10 µg/ml.
3. Protoplasten worden gespoeld met vers medium, zodat de pH weer 5.6 wordt.

Hierna blijft deze kleuring enkele dagen zichtbaar.

d. Congo rood.

Kleurt de celwanden rood en is zowel zichtbaar met licht- als ook met de fluorescentiemicroscoop. De laagste concentratie waarmee met congo rood nog kan worden gewerkt is 150 µg/ml. Er wordt bij een protoplastensuspensie een gelijk volume congo rood gedaan, waarna de celwanden na enkele minuten gekleurd zijn. Het absorbtie-maximum ligt bij 495 nm.

e. Aniline blauw.

Aniline blauw is een fluorescente kleurstof die cellulose kleurt. De concentratie van aniline blauw die gebruikt wordt is 1% opgelost in absolute alcohol. De kleuring gaat op dezelfde wijze als die van congo red. De celwanden worden zichtbaar na excitatie met ultraviolet licht. Het absorbtie-maximum ligt bij 495 nm.

§10.2 Niet-fluorescerende kleurstoffen.

a. Giemsa.

Giemsa is een oplossing van meerdere kleurstoffen die gebruikt worden om de kernen en chromosomen van de protoplasten te kleuren. Hiervoor is het noodzakelijk, dat de protoplasten eerst gefixeerd worden en dat ze op de juiste manier op het objektglas gespreid worden, zodat er geen klompjes met gefixeerde protoplasten ontstaan. De kleuring kan pas na deze twee stappen plaatsvinden.

1. Fixatie met Carnoy.

Carnoy is een mengsel van absolute alcohol (100%) met ijsazijn in een verhouding van 3:1.

Vlak voor de fixatie wordt het vers aangemaakt en het wordt bewaard in een koelkast bij 4°C. Voordat de protoplasten kunnen worden gefixeerd moeten ze eerst worden gespoeld met NaCl (van 500 mOsm.). De spoeling dient ervoor dat stoffen, zoals citraat uit de depolymerisatievloeistof en glucose uit het cultuurmedium niet uitkristaliseren in de Carnoy. Door uitkristallisatie kunnen de protoplasten worden beschadigd. Er wordt twee keer 10 ml carnoy toegevoegd, waarna telkens wordt gecentrifugeerd.

Daarna wordt het pellet geresuspendeerd in 1-3 ml carnoy en de gefixeerde protoplasten kunnen worden bewaard in de koelkast.

2. Spreiden van de protoplasten.

Voordat de protoplasten op de objektglazen worden gebracht moeten de objektglazen eerst worden ontvet met 96% ethanol. Anders blijven de gefixeerde protoplasten niet plakken op de objektglazen. De objektglazen worden gecodeerd met een glaszrijver. Dan worden er twee tot drie druppels Carnoy op de objektglazen aangebracht, waarna van ± 5 cm afstand drie tot vier druppels protoplastensuspensie op de objektglazen wordt gedruppeld. Daarna worden de preparaten minstens een uur gedroogd aan de lucht.

3. Kleuring met Giemsa.

Om het cytoplasma goed helder te maken worden de preparaten eerst een half uur in 0.2 M HCl geplaatst. Hierna wordt de HCl afgegoten en worden de preparaten drie keer gespoeld met demiwater. Dan worden de preparaten 15 minuten in 2x SSC (zie bijlage 3) geplaatst in de stoof bij 60 °C. De SSC zorgt ervoor, dat de kernen na de behandeling met de HCl weer wordt gestabiliseerd.

Direkt nadat de preparaten uit de stoof zijn gekomen worden ze tweemaal gespoeld met demiwater. Van tevoren wordt er 200 ml. Sörensenbuffer gemaakt (zie bijlage 3), dat over twee bakjes wordt verdeeld. In één van deze bakjes wordt drie ml. Giemsa gepippeteerd. In dit bakje met Giemsa worden de preparaten 30 tot 45 minuten geïncubeerd. Daarna worden de preparaten snel in het andere bakje met Sörensenbuffer gespoeld en op filterpapier gedroogd met perslucht.

Als de kleuring goed gelukt is kan men de preparaten permanent maken door ze eerst in xylol te dopen en door dan een druppeltje DePeX (dit is een kunsthars) op de objektglazen doen en dit afdekken met een dekglasje.

b. Orceïne kleuring.

Orceïne is een kleurstof die de kernen en de chromosomen van plantencellen kleurt. De kleurstof wordt opgelost in lactaat, wat een oplosmiddel is dat langzaam verdampt. De cellen worden eerst gesquashed op een objektglas met een dekglasje. Hierna worden enkele druppels orceïne op de cellen gedruppeld. Dan laat men deze kleurstof ongeveer twee minuten inwerken en wordt de resterende kleurstof met een dekglasje en een filterpapiertje van de cellen afgehaald. Hierna zijn de kernen en chromosomen met een lichtmicroscop zichtbaar.

c. Chlorazol black E.

Chlorazol black E is een kleurstof die van plantencellen de celwanden en de kernen doet kleuren. Hiervoor moeten deze cellen eerst gefixeerd worden. Fixeren van de cellen kan met de fixatieprocedures van Bouin of Flemming.

Voor het kleuren zelf gebruikt men een 1% oplossing van Chlorazol black E in 70% ethanol. Hiervan laat men een paar druppels twee tot vijf minuten op de gefixeerde cellen inwerken, waarna deze gekleurd zijn.

d. Fuchsinekleuring.

Kleurt de kernen van protoplasten die eerst gefixeerd zijn met Carnoy (zie 10.2a). De protoplasten worden eerst uit de Carnoy gehaald door door 1 ml met Carnoy/protoplasten aan te vullen met demiwater.

Deze oplossing laat men staan tot de protoplasten naar beneden zijn gezakt, daarna centrifugeren en nog een keer spoelen met demiwater. Hierna kan de kleuring met fuchsine beginnen en deze gaat als volgt.

- Protoplasten eerst in 5M HCl, gedurende 25 minuten.
- Afdraaien en een overmaat Schiff's reagent toevoegen.
- Twee tot drie uur wachten tot de oplossing roze kleurt.
- Afdraaien en zwavelhoudend water toevoegen in dit geval kraanwater, omdat dit al voldoende zwavel bevat.
- Als laatste stap dan de protoplasten spoelen met demiwater tot de oplossing kleurloos wordt.

De kernen zijn dan zichtbaar op een heldere achtergrond met een lichtmicroscop.

§11. Behandeling met cellulase.

Protoplasten die gekweekt worden in cultuurmedium vormen na enkele dagen celwanden. Giemsa kleurt zowel kern- als celwandmateriaal. Als er teveel celwand wordt aangemaakt is er een kans, dat de kernen niet langer meer zichtbaar zullen zijn. Dit komt, omdat de kernen met een lichtere tint worden gekleurd dan de celwand. De kernen en de chromosomen van de protoplasten worden rood of lichtpaars gekleurd. Wanneer er teveel celwand wordt gekleurd geeft dit een donkerpaarse (of zwarte) kleur. Om deze problemen tegen te gaan wordt van deze protoplasten die vier dagen of ouder zijn voor de fixatie de celwand, die hoofdzakelijk uit cellulose bestaat afgebroken met 1% cellulase (zie bijlage 3). De tussenwanden, die hoofdzakelijk uit pectine bestaan kunnen door de cellulase niet afgebroken worden. Het moet daarom waarschijnlijk mogelijk zijn, om na een cellulase-behandeling nog steeds te zien welke cellen gedeeld zijn.

§12. Tellen van de kern- en celdeling.

a. Protoplasten gekleurd met calcofluor white.

Protoplasten die gekleurd zijn met calcofluor white moeten direct na kleuring worden geteld. Bij kleuring met calcofluor white worden alleen de celwanden gekleurd er kan dus alleen een opdeling in wel of geen celdeling plaatsvinden. Van de gekleurde protoplasten worden er in dit geval telkens per culture 400 geteld. Het nadeel van de kleuring met calcofluor white is, dat de protoplasten niet gefixeerd mogen worden. Het is mogelijk, dat een niet geheel gevormde tussenwand geteld wordt als een volledige deling (zie fig. 7)



Figuur 7 Gedeeltelijke tussenwandvorming, die gezien wordt als een volledige tussenwand.

b. Protoplasten gekleurd met Giemsa.

Er worden zes cultures gevolgd in het ontstaan van somaclonale variatie. En dan specifiek in de vormen van somaclonale variatie, waarbij meerkernige cellen ontstaan.

Deze cultures zijn:

1. N.tabacum (in suspensie).
2. N.tabacum 1% alginaat.
3. N.tabacum 1.4% alginaat.
4. Astarte (in suspensie).
5. Astarte 1% alginaat.
6. Astarte 1.4% alginaat.

Van elk van deze cultures worden 5 series preparaten gemaakt van dag een tot en met dag vijf. Deze serie preparaten bestaat uit twee delen, de eerste van een serie van dag een tot en met dag drie en een tweede serie van dag vier en vijf. In de meeste gevallen wordt bij protoplasten van dag vier en vijf voor de fixatie een enzymbehandeling met 1% cellulase toegepast. Bij protoplasten ouder dan drie dagen wordt verwacht, dat zich hier al enige mate van celwand heeft gevormd. Na fixatie worden van elke dag vijf preparaten gemaakt, bij elk van deze preparaten worden telkens van minimaal 200 ongedeelde protoplasten de kernen geteld. Elke gedeelde protoplast die ook wordt gevonden wordt apart meegeteld. Als deling worden aangemerkt, de protoplasten die duidelijk een insnoering vertonen en een gekleurde tussenwand hebben. De protoplasten die geen celdeling hebben kunnen goed worden onderscheiden van de gedeelde protoplasten. Alle kernen worden geteld, zowel bij de gedeelde als de ongedeelde protoplasten. Tot tweemaal deling worden alle vormen apart in een tabel weergegeven. Als er meer dan twee kerndelingen gevolgd door celdeling hebben plaatsgevonden, dan wordt dit weergegeven, als 5x, 6x, 7x, ...nx. De x staat hier voor deling en de n voor het aantal kernen in deze gedeelde protoplast. Ook wordt van zowel Astarte als tabak de acytokinesefrekwentie bepaald. (Acytokinese is kerndeling zonder celdeling.)

Onder de acytokinesefrekwentie wordt hier verstaan de verhouding tussen :

- a. Het aantal protoplasten t.o.v. de totale populatie, met een deling, waarbij de kernen op de juiste manier verdeeld worden, zodat elke dochtercel één kern heeft.
- b. Het aantal protoplasten t.o.v. de totale populatie, dat wel een kern- of celdeling heeft ondergaan, maar waarbij er bij de kern- of celdeling onregelmatigheden hebben voorgedaan. Deze onregelmatigheden moeten dan leiden tot een cel met meerdere kernen of een gedeelde cel met meerdere kernen in één van de dochtercellen.

Resultaten:

§1. Opbrengst van de isolatie van bladprotoplasten.

Massa van het bladmateriaal van Astarte en N. tabacum, waaruit de protoplasten werden geïsoleerd:

N. tabacum 2.08 g blad.

Astarte 0.76 g blad.

Het volume waarin de protoplasten zich bevonden was.

N. tabacum $2.2 * 10^6$ protoplasten.

Astarte $0.9 * 10^6$ protoplasten.

Dit gaf de volgende hoeveelheden protoplasten, die dan geïsoleerd waren:

N. tabacum $1.06 * 10^6$ prpl/g.

Astarte $1.18 * 10^6$ prpl/g.

§2. Verschillen in groei in alginaat en in suspensie met cultuurmedium.

Een opvallend verschijnsel aan protoplasten, die in cultuurmedium worden gekweekt is het optreden van zgn. budding patronen, waarbij delen van het cytoplasma worden afgeknoopt en een patroon van steeds kleinere knopjes ontstaat. Dit is een verschijnsel, dat vooral bij Astarte veel gezien werd, maar in mindere mate ook bij tabacum voorkwam. Bij zowel Astarte als tabacum werd "budding" in alginaat niet waargenomen.

N. tabacum groeide in suspensie met medium ongeveer net zo goed als in alginaat. Dit in tegenstelling tot Astarte, waar niet ingebedde protoplasten na ongeveer een week sterk opzwollen en er een bruinkleuring van de cellen optrad. Deze protoplasten waren dan ook nagenoeg dood (zie fig. 8). In alginaat was te zien, dat er kolonies werden gevormd en ook na twee weken leefden deze protoplasten nog (zie fig. 9). Hierna gingen ook deze kolonies bruinkleuren en ging ook in alginaat alles dood.



Figuur 8 Protoplasten van Astarte twee weken oud, niet ingebed in alginaat gekleurd met calcofluor white.



Figuur 9 Protoplasten van Astarte twee weken oud ingebed in 1,4% algiinaat gekleurd met calcofluor white.

§3. Groottebepaling in media met een verschillende osmolaliteit.

De Groottebepalingen zijn uitgezet in de figuren 10 en 11.

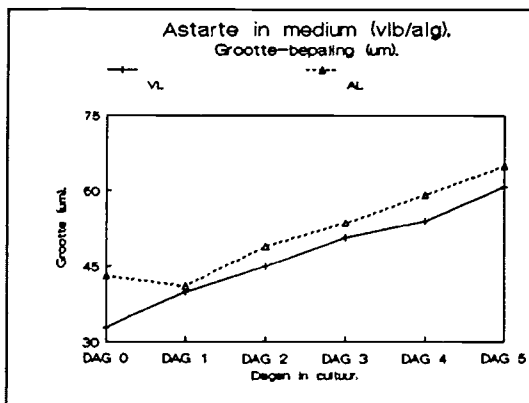


Fig.10 Grootte van protoplasten van N.tabacum.

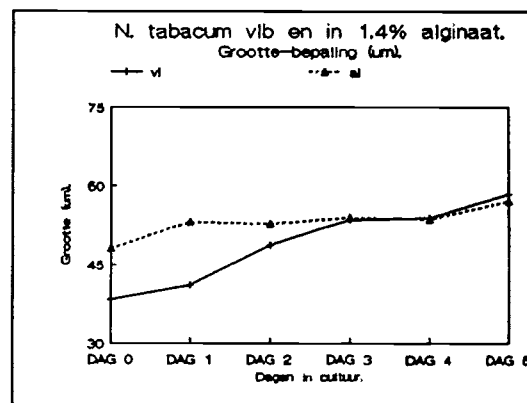


Fig.11 Grootte van protoplasten van Astarte.

In deze figuren is uitgezet de grootte van de protoplasten van tabak en Astarte. Deze groottebepaling is gedaan aan protoplasten die zijn ingebed in 1,4 % algiinaat en aan protoplasten, die niet zijn ingebed. Daarnaast zijn standaardcondities van 500 mOsm. gebruikt. Het valt op, dat de protoplasten, die ingebed waren in algiinaat in eerste instantie groter waren. Dit verschil in grootte verdween na één of twee dagen. Daarna groeiden de protoplasten van beide soorten, zowel ingebed als in suspensie in een gelijk tempo door.

Als men protoplasten in media brengt met een andere osmolaliteit dan hun interne osmolaliteit, werd er een ander beeld gezien. De gegevens hierover zijn uitgezet in twee grafieken figuur 12 en 13. Als er gegevens zijn ontbreken kon dit twee oorzaken hebben:

- a. Er is infectie opgetreden van micro-organismen.
- b. Alle protoplasten zijn dood gegaan, omdat het verschil in osmolaliteit zo groot was, dat ze zijn geknapt.

Voor zover de groei van de protoplasten niet geleden had onder bovenstaande oorzaken is te zien, dat bij een zeer lage osmolaliteit van 300 mOsmol er grote verschillen zichtbaar zijn tussen protoplasten die niet en die wel zijn ingebed.

In het algemeen gingen de protoplasten zowel in alginaat, als in suspensie dood, maar in één experiment zijn er in een petrischaal met medium van 300 mOsm bij protoplasten ingebed in Ca-alginaat drie kolonies ontstaan. Nadat deze kolonies enkele weken in dit medium werden gekweekt en gedurende die tijd ook nog witgekleurd bleven zijn ze overgeplaatst op regeneratiemedium. Na enkele dagen op dit medium kleurden ze toen bruin en zijn ook alle cellen doodgegaan.

Ook zijn er grote verschillen tussen de protoplasten in medium van 300 en 400 mOsm en de protoplasten in 600 mOsm, deze laatste zijn veel kleiner. Er zijn bij deze laatste groep echter weinig verschillen tussen protoplasten in alginaat en protoplasten die niet zijn ingebed.

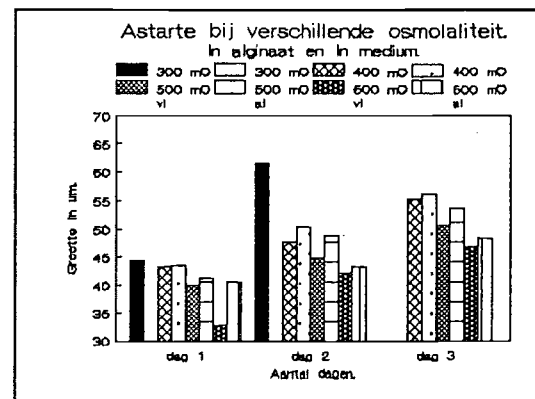
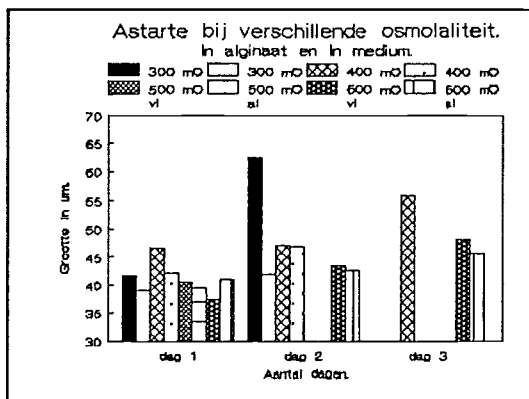


Fig. 12 Groottebepaling van Astarte protoplasten bij verschillende osmolaliteiten.

Fig. 13 Groottebepaling van Astarte protoplasten bij verschillende osmolaliteiten.

§4. Kleuringen.

§4.1 Kleuringen met een fluorescente kleurstof.

a. Calcofluor white.

Met deze kleurstof werden zowel de celwand als de tussenwand van de protoplasten gekleurd. Na twee dagen was er bij tabak met deze kleurstof al de eerste deling te zien. In tabaksprouplasten, die waren ingebed in alginaat was de celwand al na twee dagen zichtbaar, maar delingen waren pas een dag later te zien. Bij Astarte duurde de vorming van een celwand langer dan bij tabak en ook de delingen begonnen pas op dag drie of vier.

b. Acridine orange.

Deze kleurstof kleurde zowel het enkelstrengs RNA als het dubbelstrengs DNA. De kernen waren bij een lage concentratie acridine orange niet zo goed zichtbaar. Acridine orange was dan wel bruikbaar als een vitale kleurstof. Bij een experiment met Solanum tuberosum (cv. SVP 11) met een concentratie acridine orange van 1/10.000 µg/ml gaf dit één dag na kleuring kleine donkerrode vacuoles te zien in de protoplasten. Als deze vacuoles werden bekeken met UV-licht dan knapten deze vacuoles samen met de cellen en ging de protoplast dood.

c. Hoechst 33258 en Hoechst 33342.

Bij het bekijken van de met deze kleuringen gekleurde protoplasten viel op, dat niet van alle protoplasten de kernen werden gekleurd. Ook was het niet mogelijk om met één van deze twee kleurstoffen chromosomen van de protoplasten te kleuren. Het verschil tussen deze kleurstoffen, zoals dit werd waargenomen, was datvooral met Hoechst 33342 er weinig tot geen kernen werden gekleurd. Met Hoechst 33258 was er soms nog een aantal kernen gekleurd. Dit was altijd slechts een klein percentage van alle protoplasten.

d. Congo red.

Deze kleurstof gaf een kleuring van de celwand, die zowel met licht- als ook met fluorescentiemicroscoop goed zichtbaar was. Met UV-licht was ze bij dezelfde golflengte als calcofluor white zichtbaar. Congo red gaf vergeleken met calcofluor white de celwanden minder goed weer.

e. Aniline blue.

Kleurde de celwanden met UV-licht ongeveer even goed als congo red deed. Met aniline blue was er naast de kleuring van de celwand ook nog een grote hoeveelheid stipjes in de protoplasten te zien. Onduidelijk was of dit deeltjes van de kleurstof zijn die niet goed zijn opgelost of dat er iets anders werd gekleurd. Omdat dit niet zeker was werd ook met deze kleurstof niet verder gewerkt.

§4.2 Niet fluorescerende kleurstoffen.

a. Giemsa kleuring.

Dit is een oplossing van meerdere kleurstoffen. De Giemsa-kleuring zorgde ervoor, dat de kernen goed gekleurd werden en dat ze makkelijk te tellen waren.

Een voordeel van de Giemsa-kleuring was dat de protoplasten eerst werden gefixeerd, waarna ze bewaard konden blijven. Hierdoor hoefden niet alle preparaten direkt gemaakt te worden en was het mogelijk om een kleuring die niet goed gelukt was over te doen. Ook was het niet nodig om alle preparaten op dezelfde dag te tellen, waardoor er een grotere steekproef kon worden genomen zonder dat de resultaten van telling 1 tot en met 5 grote afwijkingen vertoonden. Zowel de kernen en de chromosomen als ook de cel- en eventuele tussenwand waren zichtbaar na kleuring met Giemsa. Hierdoor was het ook mogelijk om celdelingen waar te nemen. Het nadeel van de kleuring van de celwand was dat de kernen na dag drie niet goed zichtbaar meer waren (fig. 14).



Figuur 14 Een protoplastenklompje van vier dagen oud gekleurd met Giemsa.

b. Orceïne kleuring.

Orceïne kleurde de kernen en de chromosomen van de protoplasten en plantencellen. Met deze kleuring was het mogelijk om mitoses in plantenmateriaal waar te nemen. Nadeel was, dat de cellen gesquashed moeten worden. Door het squashen werden de cellen uit en over elkaar gedrukt. Dit had vaak als consequentie, dat de kernen over het preparaat werden verspreid. Hierdoor werd het zeer moeilijk om te bepalen welke kern (of kernen) bij welke cel hoorde.

c. Chlorazol black E (ref.13).

Zowel de celkern als ook de celwand werd gekleurd met deze kleurstof. Nadeel van deze kleurstof was echter, dat ze in alcohol is opgelost. Dit moest, omdat de protoplasten na fixatie ook in alcohol waren opgelost. Zo gauw de alcohol was verdampt verschrompelden de protoplasten. Hierna waren aan deze protoplasten geen waarnemingen meer te doen.

d. Fuchsine kleuring.

De celkernen en de chromosomen konden met deze kleuring mooi tegen een heldere achtergrond worden gekleurd. De kernen van oudere protoplasten(klompjes) konden hierdoor toch geteld worden, ondanks de vele celwandvorming. Nadeel was dat zelfs met een fasecontrast-microscop het moeilijk of onmogelijk was om te bepalen in welke cel de kern zich bevond.

§5. Behandeling met cellulase.

Protoplasten die ouder dan drie dagen waren vormden zoveel celwandmateriaal, dat de kernen na kleuring met Giemsa niet langer zichtbaar waren (zie fig. 14). Te zien in dit figuur, dat de cellen door kleuring met Giemsa ondoorzichtig werden. Dit kwam, doordat de cellulose die gevormd wordt ook gekleurd werd. Nu was het mogelijk om de cellulose die gevormd wordt af te breken met cellulase-R10.

Als de protoplasten voor fixatie een uur lang met cellulase werden behandeld en daarna gekleurd met Giemsa, dan waren de kernen in de protoplasten wel goed zichtbaar (zie fig. 15). Hier is goed te zien, dat de tussenwand aanwezig bleef en gedeelde protoplasten niet in dochtercellen uit elkaar gingen. Op deze wijze waren de gedeelde cellen nog steeds goed te tellen.



Figuur 15 Giemsa-kleuring van een protoplast van vier dagen oud na behandeling met cellulase-R10.

§6. Tellen van de kern- en celdeling van protoplasten die wel en niet ingebed zijn in algiinaat.

a. Celdeling met calcofluor white.

Omdat de protoplasten, die gekleurd werden met calcofluor white niet gefixeerd konden worden is het minder goed mogelijk om grote hoeveelheden te tellen. Dit omdat er tussen de eerste en de laatste protoplast die geteld werd dan een groot verschil in tijd kon ontstaan. De resultaten van de tellingen zijn uitgezet in figuren 16 en 17.

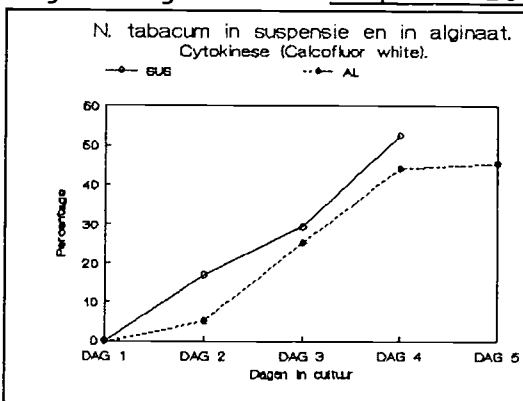


Fig.16 Percentage gedeelde protoplasten van N.tabacum gekleurd met calcofluor white.

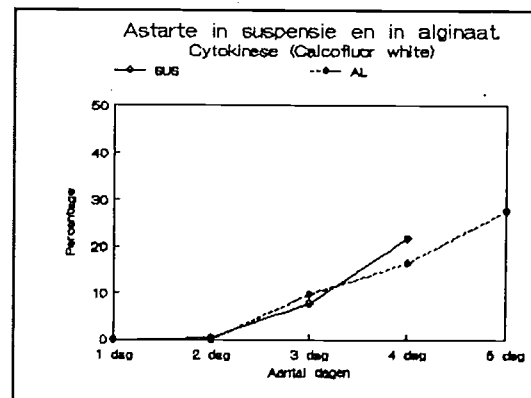


Fig.17 Percentage gedeelde protoplasten van Astarte gekleurd met calcofluor white.

Bij het tellen van protoplasten die zijn gekleurd met calcofluor white viel op, dat er weinig verschil in deling was tussen protoplasten die waren ingebed in alginaat en die niet waren ingebed. Bij tabak waren er nog wel kleine verschillen tussen beide cultures. Bij Astarte waren de verschillen tussen deze twee cultures slechts enkele procenten. Alleen op dag vijf was er een iets groter verschil, omdat de deling van de protoplasten in suspensie toen plotseling afnam. Opvallend was ook in de grafieken het grote verschil in het percentage protoplasten, dat gedeeld was bij tabak in vergelijking met het percentage protoplasten, dat gedeeld was bij Astarte. Daaruit bleek, dat op een zelfde tijdstip bij tabak ongeveer drie maal zoveel protoplasten waren gedeeld.

b. Delingen tellen met Giemsa-kleuring.

Met de Giemsa-kleuring konden van de protoplasten zowel de celdeling als de kerndeling worden bepaald. Bovendien was het mogelijk, om aan veel meer protoplasten bepalingen te doen, omdat van de gefixeerde protoplasten ook preparaten konden worden gemaakt. In de figuren 18t/m 21 zijn de acytokinese- en de celdelingsfrequenties (per 1000 protoplasten) van de verschillende cultures tegen elkaar uitgezet.

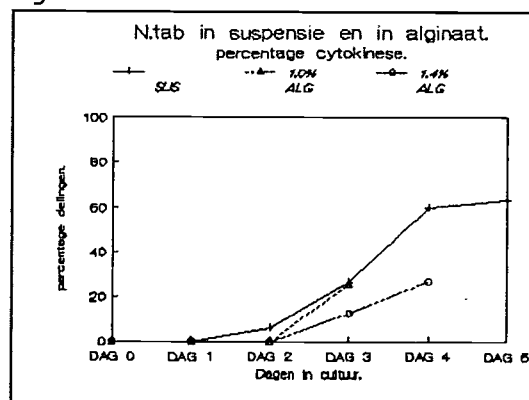
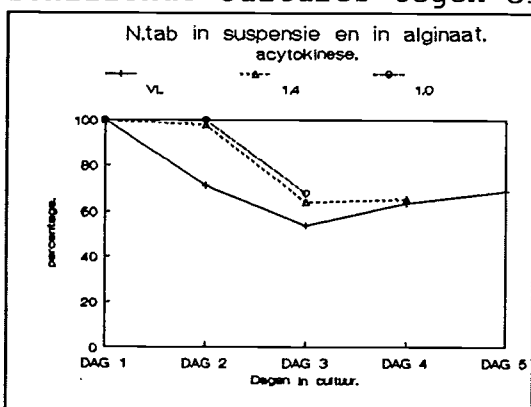


Fig. 18 percentage acytokinese in protoplasten van N.tabacum gekleurd met Giemsa.

Fig. 19 Percentage cytokinese in protoplasten van N.tabacum gekleurd met giemsa.

In figuur 18 is de acytokinesefrekwentie van de protoplasten van tabak uitgezet. De acytokinesefrekwentie werd bepaald aan het aantal protoplasten, dat tenminste één kern- of celdeling had ondergaan. In figuur 19 zijn de celdelingsfrequenties van de protoplasten uitgezet, omdat er grote verschillen tussen de verschillende cultures waren werden de celdelingen omgerekend naar het aantal celdelingen per 1000 protoplasten. Duidelijk zichtbaar is in deze grafieken, dat bij tabak de cel- en kerndeling het beste verliep als protoplasten in suspensie werden gekweekt. In alginaat van 1,4 % verliep zowel de kern- als ook de celdeling minder goed. Op dag vier kwam er verbetering in de deling van tabakprotoplasten, die waren ingebed in 1,4 % alginaat. Toen was de acytokinesefrekwentie ongeveer gelijk aan de acytokinese van de protoplasten in suspensie. Van protoplasten ingebed in 1.0 % alginaat zijn te weinig gegevens beschikbaar.

In de figuren 20 en 21 zijn de acytokinese- en cytokinesefrekwenties van de protoplasten van Astarte uitgezet.

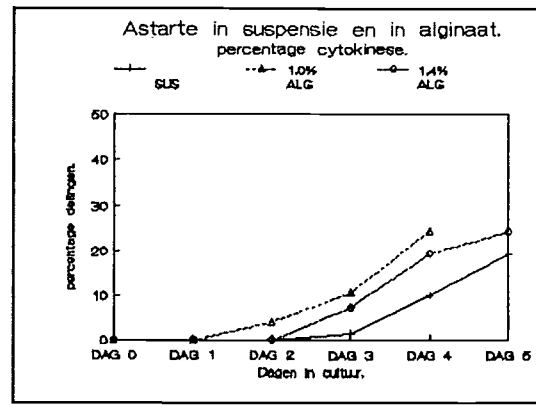
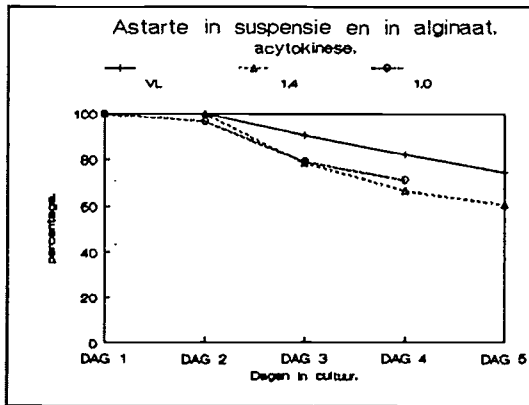


Fig. 20 Percentage acytokinese in protoplasten van Astarte gekleurd met Giemsa.

Fig. 21 Percentage cytokinese in protoplasten van Astarte gekleurd met Giemsa.

Bij protoplasten van Astarte was een ander beeld te zien dan bij tabak. Zowel bij protoplasten ingebed in 1% als bij protoplasten ingebed in 1.4% algiinaat verliep de celdeling beter dan bij protoplasten die niet waren ingebed in algiinaat. De cultuur met protoplasten die het hoogste percentage deling vertoonde was de cultuur met protoplasten ingebed in 1% algiinaat. Wanneer er werd gekeken naar de acytokines van protoplasten van Astarte dan viel op, dat er bij de protoplasten ingebed in algiinaat minder acytokinese voorkwam dan als de protoplasten in suspensie werden gekweekt. Dit verschil was tijdens de dagen, dat de acytokinesefrekwentie werd bepaald constant ongeveer 10 %.

Om te kijken hoe de kerndeling verliep zijn de percentages protoplasten uitgezet in aparte figuren met daarin de kern- en de celdeling van de verschillende cultures. In de figuren 22 t/m 24 de cultures van tabak en de figuren 25 t/m 27 de cultures van Astarte.

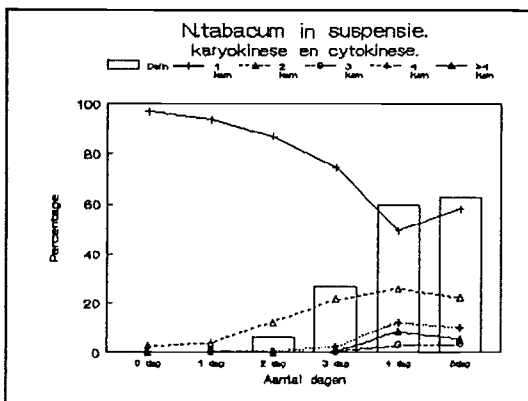


Fig.22 Karykinese en cytokinese bij protoplasten van tabak in suspensie.

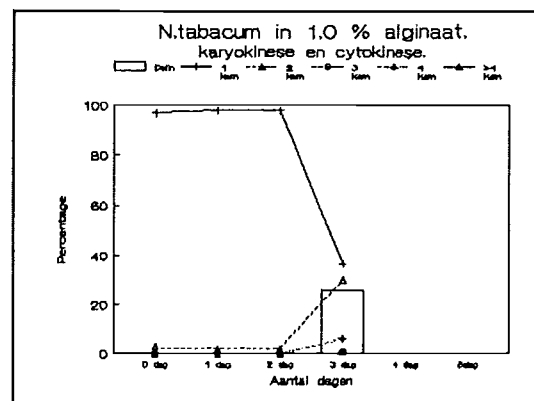


Fig.23 Karyokinese en cytokinese bij protoplasten van tabak in 1,0% algiinaat.

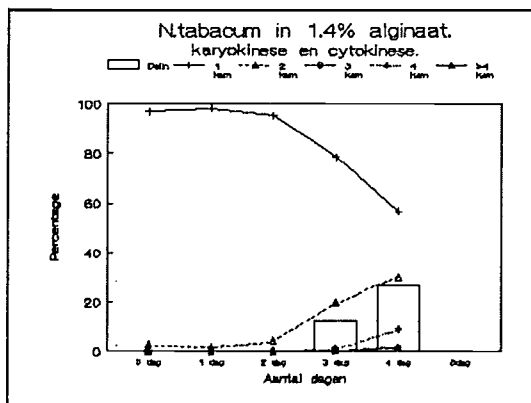


Fig.24 Karyokinese en cytokinese in protoplasten van tabak in 1,4 % alginaat.

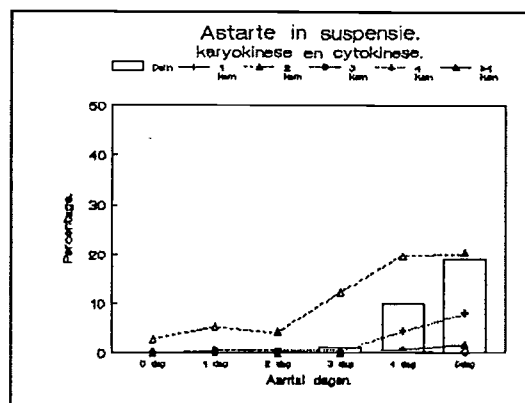


Fig.25 Karyokinese en cytokinese in protoplasten van Astarte in suspensie.

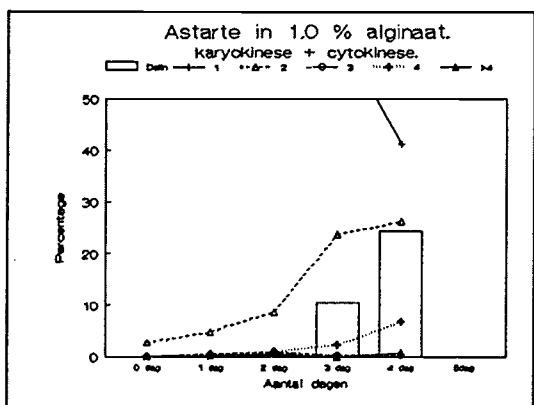


Fig.26 Karyokinese en cytokinese in protoplasten van Astarte in 1,0 % alginaat.

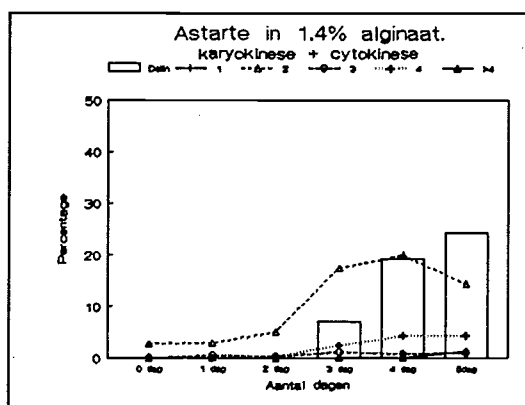


Fig.27 Karyokinese en cytokinese in protoplasten van Astarte in 1,4% alginaat.

Als men de figuren van tabak onderling vergelijkt, dan valt op, dat bij de protoplasten van tabak in suspensie na drie dagen het percentage protoplasten met twee kernen afnam. Na vier dagen nam ook het percentage protoplasten met vier en met meer dan vier kernen af. Het percentage protoplasten met één kern bereikte een minimum na vier dagen en nam daarna weer toe op dag vijf. Dit terwijl bij de meerkernige protoplasten van tabak, die waren ingebed in alginaat geen maximum optrad. Zowel bij protoplasten van tabak in 1% als ook in 1,4% alginaat vond er na drie dagen een stijging plaats van het percentage meerkernige protoplasten.

In de cultures van Astarte was een volkomen ander beeld te zien. Bij de protoplasten van Astarte, die niet waren ingebed was te zien, dat na drie dagen het percentage tweekernige protoplasten toenam. Op dag vier bereikten deze een maximum en op dag vijf nam dit weer af. Het percentage protoplasten met vier kernen nam na vier dagen in aantal toe en deze toename ging door op dag vijf.

Bij Astarte protoplasten, die ingebed waren in 1% alginaat begon het percentage protoplasten met twee kernen al toe te nemen op dag twee en de protoplasten met vier kernen al op dag drie. Beide bereikten ze voor zover de gegevens strekken (tot dag vijf) geen maximum. Bij protoplasten van Astarte, die waren ingebed in 1,4% alginaat vond zowel van het percentage met twee als met vier kernen een duidelijke stijging in aantal plaats op dag drie. Deze protoplasten met twee en met vier kernen hadden ook beide een maximum op dag vier. Op dag vijf namen ze weer in aantal af.

De volgende opdeling, die gemaakt wordt is een opdeling in de deling van protoplasten van beide soorten. De percentages delingen zijn te zien in grafieken 28 t/m 33. In de grafieken 28 t/m 30 staan de delingen van de protoplasten van tabak in de grafieken 30 t/m 33 staan de delingen van Astarte.

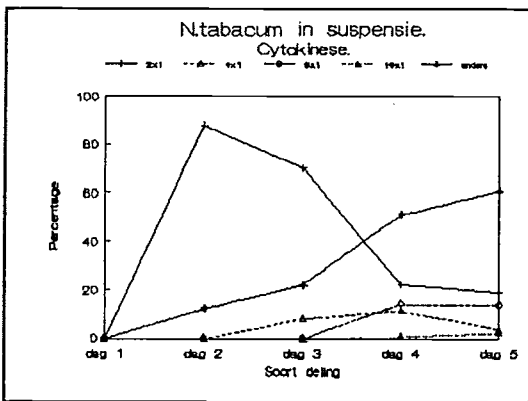


Fig.28 Celdelingen in protoplasten van tabak in suspensie met medium.

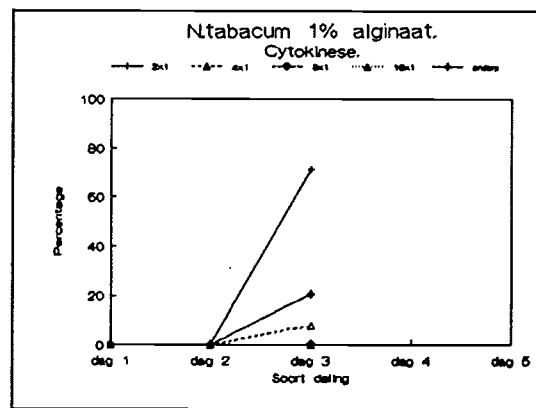


Fig.29 Celdelingen in protoplasten van tabak ingebed in 1% alginaat.

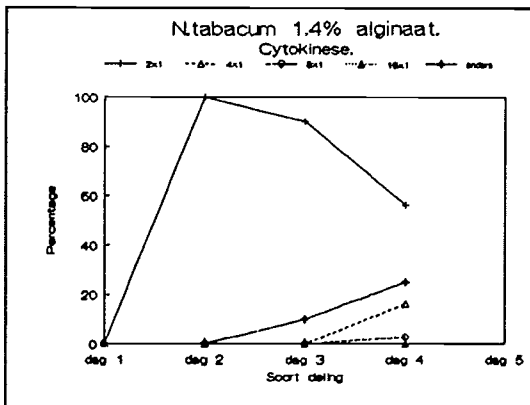


Fig.30 Celdelingen in protoplasten van tabak ingebed in 1,4 % alginaat.

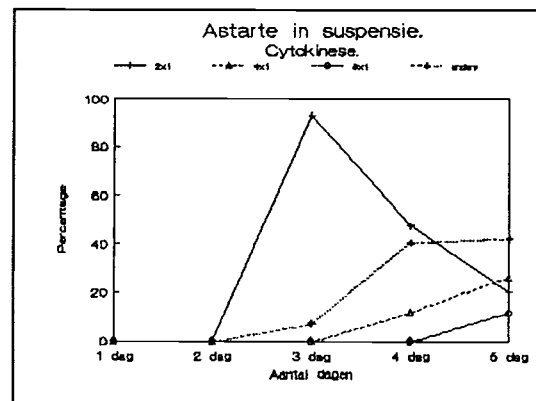


Fig.31 Celdelingen in protoplasten van Astarte in suspensie met medium.

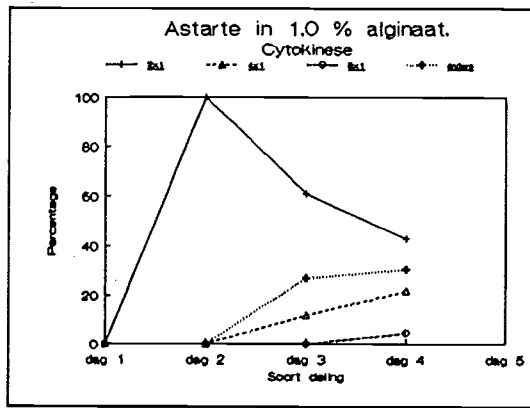


Fig.32 Celdelingen in protoplasten van Astarte ingebed in 1% alginat.

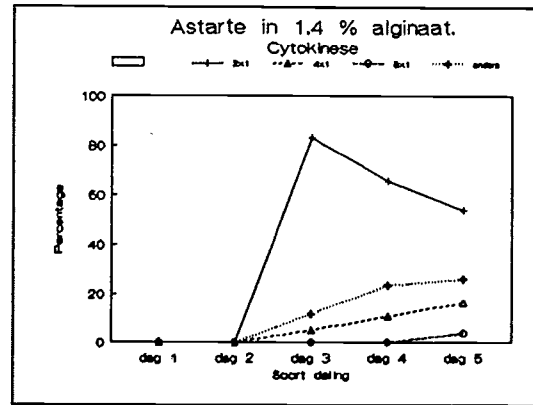


Fig.33 Celdelingen in protoplasten van Astarte ingebed in 1,4 % alginat.

Bij tabaksprotoplasten die niet waren ingebed was opvallend, dat in de eerste dagen veel 'normale' delingen waren, waarbij de chromosomen zich over twee cellen verdeelden. Dit percentage nam af na dag drie, op dat moment waren er ook celdelingen, waarbij er vier cellen ontstonden met ieder één kern. Op dag vier bereikte dit percentage cellen zijn maximum en ontstonden er ook cellen met acht en zestien kernen. Daarnaast ontstond er een steeds groter percentage cellen met andere hoeveelheden kernen. Op het moment, dat deze protoplasten gingen delen ontstonden er vele combinaties in de verdeling van de kernen over de gedeelde cellen. Een voorbeeld hiervan was een protoplast met zes kernen. Deze kernen werden dan door één tussenwand gescheiden. Daarnaast was het ook mogelijk, dat als een cel deelde de kern in één dochtercel nogmaals deelde zonder dat er hier cytokinese plaatsvond. Bij tabaksprotoplasten, die ingebed waren in 1% alginat zijn alleen gegevens beschikbaar van de deling op dag drie. Deze delingspercentages vertoonden grote overeenkomst met de deling van tabaksprotoplasten, die gekweekt waren in suspensie. De protoplasten van tabak, die waren ingebed in 1,4% alginat vertoonden minder deling, dan de andere twee cultures. Het percentage protoplasten met één geslaagde deling nam minder snel af en de percentages protoplasten twee geslaagde delingen was groter dan op een zelfde tijdstip in de beide andere cultures.

Als de deling in Astarte werd bekeken dan viel op, dat bij de niet ingebedde protoplasten al op dag vier een groot aantal afwijkende delingen optrad (delingen waar de kernen niet goed over de cellen verdeelt werden en waardoor er meerdere kernen in één cel kwamen). Dit percentage liep dan al op tot ± 40% en er waren vele vormen van deze 'afwijkende' delingen mogelijk, zoals drie kernen in drie cellen. Deze variatie betekende, dat er twee kernen waren gefuseerd tot één kern met de dubbele hoeveelheid chromosomen of dat er één dochtercel was, die deelde, terwijl de andere dochtercel niet deelde.

Bij protoplasten, die ingebed waren in alginaat waren deze percentages ongeveer de helft van wat ze waren bij de protoplasten die in suspensie waren gekweekt. Vooral in figuur 29 waarin de percentages delingen staan van de protoplasten, die waren ingebed in 1,4% alginaat komen hoofdzakelijk delingen voor met een even aantal kernen, waarbij de kernen netjes over de cellen waren verdeeld.

Als men beide soorten met elkaar vergelijkt dan is te zien, dat de protoplasten van tabak in medium meer deling vertoonden. Daarnaast is te zien, dat de delingen meer van de verwachte soort waren (2,4,8,16 cellen, met dezelfde hoeveelheid kernen). Behalve in protoplasten van tabak, die niet waren ingebed in alginaat: daar kwamen op dag vijf ongeveer zestig procent onregelmatige delingen voor.

Bij protoplasten van Astarte waren er minder delingen. De delingen die plaatsvonden waren percentueel wel vaker normale delingen en er ontstonden hier dus minder meerkernige cellen dan bij tabak. Wel ontstonden er meer meerkernige protoplasten in Astarte dan in tabak.

Discussie:

Als er gekeken werd hoe de protoplasten van tabak en Astarte groeiden in alginaat ingebed en in suspensie, dan was het eerste dat opviel de "budding" bij protoplasten in suspensie. Bij protoplasten, die waren ingebed in alginaat kwam deze "budding" niet voor. De oorzaak hiervan is misschien, dat een Ca-alginaatgel in ieder geval zoveel tegendruk geeft, dat er geen uitstulpingen van de cel ontstaan. Bij tabak viel verder op, dat protoplasten, die in suspensie gekweekt werden snel kolonies vormden, terwijl dit bij de protoplasten die waren ingebed in alginaat langer duurde. Dit kwam mogelijk door de handelingen, die werden verricht om protoplasten in te bedden. De protoplasten werden in een Na-alginaat oplossing gebracht, voordat de alginaat op een CaCl_2 -plaatje geleerde. Na-alginaat met een concentratie van 1,4% was een visceuse oplossing en dit kon mogelijk mechanische stress veroorzaken. Bij Astarte vormden protoplasten in suspensie helemaal geen kolonies, terwijl protoplasten, die in alginaat werden ingebed wel kolonies vormden. Protoplasten van Astarte in suspensie gingen binnen een week dood en zoals in figuur 8 te zien is deden ze dit, nadat ze sterk in grootte waren toegenomen. Dit in tegenstelling tot protoplasten van Astarte die waren ingebed, waarvan de kolonies na veertien dagen ongeveer even groot werden als één protoplast die niet was ingebed. Dit leek erop, dat Ca-alginaat ervoor zorgde, dat protoplasten die ingebed waren minder in grootte toenamen dan protoplasten in suspensie.

Bij de groottebepaling tot en met dag vijf bleek hier overigens weinig van. Tot dag zes waren tussen de verschillende culturen met protoplasten geen verschillen te zien in grootte. De gemiddelden van de protoplasten in suspensie en ingebed in alginaat waren ongeveer even groot. Ook de standaarddeviaties waren in dezelfde orde van grootte. De grootte van deze standaarddeviaties was ongeveer $10 \mu\text{m}$. Er waren dus wel grote verschillen in de protoplasten, maar deze verschillen waren zowel aanwezig in suspensie als in alginaat. Als er werd gekeken naar de grootte van de protoplasten bij tabak dan was te zien, dat in de eerste twee dagen de protoplasten in alginaat groter waren. Op dag drie was het gemiddelde van de protoplasten even groot. Ook op dag vier en vijf waren er nauwelijks verschillen tussen de gemiddelden van de protoplasten. Wel opvallend was, dat de standaarddeviatie van de groottebepaling bij tabak (in alginaat en in suspensie) de zelfde orde van grootte had als bij Astarte: $\pm 10 \mu\text{m}$. Dit wees erop, dat in alle culturen met protoplasten er een grote variatie was in de grootte van protoplasten en dat er ook grote verschillen waren in de groeisnelheid van de protoplasten. Wanneer er werd gekeken naar de groottebepalingen van de protoplasten bij Astarte, die gekweekt werden in media met verschillende osmolaliteit dan is hier het ontbreken van een aantal metingen dat er voor zorgt, dat de bruikbaarheid van de gegevens gering is. Dit kwam deels door infectie in een deel van de culturen, deels doordat in culturen die gekweekt waren bij een osmolaliteit van 300 en 400 mOsmol in suspensie, grote hoeveelheden protoplasten waren geknapt.

Bij protoplasten in alginaat kan mogelijk gebeuren, dat protoplasten door de lage externe osmolaliteit (en de alginaat, die expansie moeilijk maakt) verschrompelen en niet knappen. Bij een osmolaliteit van 300 of 400 mOsmol kwam er door osmose zoveel (extra) water in de protoplasten, dat ze sterk gingen opzwellen en uiteindelijk knapten. Alleen op dag 1 van de groottebepaling kon de grootte bepaald worden bij een osmolaliteit van 300 mOsm. van zowel in alginaat ingebedde, als in suspensie gekweekte protoplasten. Het verschil in grootte tussen protoplasten in alginaat en in suspensie kon waarschijnlijk worden toegeschreven aan de inbedding van protoplasten in alginaat, deze waren kleiner.

Bij de kleuringen van de protoplasten waren er ook enkele opvallende resultaten. Bij het kleuren van protoplasten van SVP 11 met Acridine orange viel op, dat er na één dag rode vacuoles binnen de cellen werden gevormd. Deze rode vacuoles knapten, als er enige tijd naar werd gekeken met UV-licht. De mogelijke oorzaak hiervan was, dat deze vacuoles gevuld waren met acridine orange en dat door het UV-licht elektronen werden geëxciteerd, waarbij er warmte vrijkwam. Deze warmte zou dan de oorzaak van het knappen van de protoplast zijn.

Twee andere kleuringen, die werden uitgetoetst waren Hoechst 33342 en Hoechst 33258. Er bleken weinig kernen gekleurd te worden door deze kleurstoffen. Dit was ook al eerder door Michel Lalone et al. waargenomen (ref. 9). De oorzaak hiervan is mogelijk, dat deze kleurstoffen moeilijk worden opgenomen door de cellen. Dit wordt bevestigd door het feit, dat in dode cellen de kernen vaak wel werden gekleurd.

De cellen ouder dan drie dagen, die gekleurd werden met Giemsa, werden geïncubeerd met cellulase, waardoor de cellulose in de celwand werd afgebroken. Cellen die gedeeld waren bleven dan bij elkaar (zie fig. 15). Het bewijs, dat de tussenwanden niet werden afgebroken waren de delingspercentages, die bij tellingen aan protoplasten na incubatie met cellulase niet lager werden. Als er wel protoplasten vrijkwamen zou het aantal gedeelde protoplasten afnemen, omdat er minder gedeelde protoplasten zouden zijn en meer losse protoplasten.

Bij het bepalen van de celdelingspercentages van Astarte en tabak met calcofluor white werden geen verschillen gevonden in de celdelingspercentages van protoplasten, die waren ingebed in 1.4% alginaat en protoplasten in suspensie. Wel opvallend was het verschil tussen de percentages celdeling met calcofluor white en de percentages celdeling, zoals die werden bepaald met Giemsa. Met Giemsa-kleuring werden lagere percentages celdeling gevonden in protoplasten van tabak, die waren ingebed in alginaat, maar bij protoplasten van tabak in suspensie werd ongeveer een gelijk percentage celdelingen gevonden.

De verwachting was, dat er minder celdeling zou worden gevonden bij kleuring met Giemsa, omdat er bij kleuring met calcofluor white mogelijk een aantal protoplasten met een gedeeltelijk gevormde tussenwand, als deling werden meegeteld. Bij de protoplasten in suspensie was dit blijkbaar niet zo, terwijl dit wel het geval leek te zijn bij de protoplasten die waren ingebed.

Een verklaring voor de grote verschillen bij tabak is mogelijk, dat er net zo vaak een tussenwand wordt aangelegd bij protoplasten in alginaat, als bij protoplasten in suspensie, maar dat dit bij de protoplasten in suspensie vaker tot een deling leidde dan bij de protoplasten van tabak, die waren ingebed in alginaat. Hierdoor werd er na kleuring met calcofluor white een gelijk percentage celdelingen in beide cultures gevonden, maar bleek na kleuring met Giemsa, dat er toch grote verschillen in celdeling tussen de verschillende cultures waren. Bij Astarte bleek dat hetzelfde proces aanwezig was. Ook hier werden na kleuring met calcofluor white ongeveer gelijke delingspercentages gevonden. In tegenstelling met tabak werden hier na kleuring met Giemsa hogere percentages celdelingen gevonden in de culture met protoplasten, die waren ingebed in 1,4% alginaat en in 1% alginaat tot dag vijf. Het grote verschil in acytokinese bij tabak leek te zijn veroorzaakt door het grote verschil in celdeling tussen de protoplasten in alginaat en in suspensie. De belangrijkste oorzaak hiervan leek te zijn, dat de protoplasten die ingebed waren in alginaat in de eerste dagen minder cel- en kerndeling vertoonden. Dit leek zo, omdat de karyokinese- en cytokinesefrekwenties van één dag later ongeveer gelijk waren aan die van tabakprotoplasten in suspensie. Mogelijk werd dit veroorzaakt door de mechanische stress, die de protoplasten ondergingen tijdens de inbedding. Alginaat in een concentratie van 1,4 % is een visceuse oplossing en deze krimpt tijdens de gelering. Tijdens de menging en de opeenvolgende gelering kunnen er trek- en drukkrachten op de protoplasten ontstaan. Opvallend was, dat bij protoplasten van Astarte een volkomen ander beeld te zien was. De hoogste percentages cytokinese en de laagste percentages acytokinese werden gemeten bij de protoplasten, die ingebed waren in alginaat. Het bleek dus dat de inbedding in alginaat wel een positieve invloed had op de protoplasten van Astarte. De oorzaak was misschien, dat de mechanische stress een positieve invloed had. Hieruit bleek, dat inbedden van protoplasten van tabak in alginaat niet leidde tot een vermindering van het aantal meerkernige cellen bij de kweek. Dit in tegenstelling tot de groei van protoplasten van Astarte. Zowel bij tabak als Astarte viel op, dat na enkele dagen de percentages twee- en vierkernige protoplasten afnamen. Deze fracties twee- en vierkernige protoplasten waren weer terug te vinden in de percentages deling. Dit wees erop, dat er protoplasten met twee en vier kernen waren, die in eerste instantie acytokinese vertoonden, maar waar later toch celdeling in optrad. Als naar de celdeling werd gekeken dan was te zien, dat ondanks dat er veel celdeling bij protoplasten van tabak in suspensie was er hier zeer veel onregelmatigheden voorkwamen. De acytokinese werd mogelijk veroorzaakt door processen, die leiden tot somaclonale variatie en duiden er op dat bij protoplasten van tabak in suspensie de celdeling niet goed verliep. Bij protoplasten, die zijn ingebed in 1,4% alginaat was te zien, dat er hier minder onregelmatige celdelingen optraden. De oorzaak hiervan kan zijn, dat bij protoplasten van tabak, die waren ingebed in 1,4 % alginaat in de eerste dagen van cultuur minder celdeling voorkwam, maar ook minder chromosomale afwijkingen optraden.

Opvallend was dat bij Astarte weinig onregelmatige delingen optraden. Celdelingen verliepen bij protoplasten in alginaat beter dan bij protoplasten in suspensie. De oorzaak hiervan is mogelijk, dat in alginaat een grotere fractie van de protoplasten, die één of meer kerndelingen ondergingen ook celdeling vertoonde. Dit terwijl het aantal protoplasten in suspensie met één celdeling bij Astarte op dag vijf zelfs afnam. Op dat moment was er bij deze protoplasten nog slechts een fractie van $\pm 20\%$ met één celdeling. Op dat zelfde moment was er van de protoplasten in 1,4% alginaat $\pm 60\%$ met één celdeling. De belangrijkste oorzaak, dat bij de protoplasten van Astarte in alginaat minder acytokinese voorkwam was, dat er een grotere fractie van de populatie protoplasten met kerndeling ook celdeling had.

Conclusies:

Als protoplasten werden gekweekt in suspensie met cultuurmedium dan ontstond er zogenaamde "budding". Deze "budding" ontstond niet bij protoplasten, die waren ingebed in 1% of 1,4% alginaat. Bij protoplasten van Astarte, die waren ingebed in alginaat ontstonden kolonies, terwijl protoplasten in suspensie na ongeveer een week doodgingen. Er is dus sprake van een positieve invloed van de inbedding op de protoplasten van Astarte.

Wanneer de resultaten van de kleuringen werden bekeken, die zijn uitgeprobeerd om tot een zo goed mogelijke telling te kunnen komen van de karyokinese en de cytokinese bleek, dat kleuringen met calcofluor white en Giemsa hiervoor het beste geschikt waren. Cytokinese- en karyokinesefrekwenties bleken het best bepaald te kunnen worden met Giemsa-kleuring. Hoewel de cytokinesefrekwentie ook bepaald kon worden met calcofluor white. Nadeel van de kleuring met calcofluor white was, dat met deze kleuring mogelijk ook niet geheel gevormde tussenwanden als celdeling werden geteld. Dit viel af te leiden uit de verschillen, die in sommige gevallen optraden tussen de percentages celdeling, als die bepaald werden met calcofluor white vergeleken met de percentages zoals die bepaald werden met Giemsa.

Het was niet mogelijk om een goede vitale kleuring te vinden, waarmee zowel de cel- als de kerndeling enkele dagen lang gevolgd konden worden. Hoechst 33342 en 33258 bleken niet alle kernen te kleuren. Voornamelijk van dode cellen bleken de kernen wel goed gekleurd te zijn. Dit wees erop, dat deze kleurstoffen mogelijk problemen hadden om de celmembraan te passeren.

Behandeling met cellulase R-10 bleek een goede methode om overtollig gevormd celwandmateriaal te verwijderen zonder de tussenwanden te verbreken. Deze cellulase diende wel toegevoegd te worden, voordat de protoplasten werden gefixeerd. Uit de resultaten van tellingen van de celdeling, na kleuring met calcofluor white bleek, dat er geen verschillen werden waargenomen tussen protoplasten in alginaat en protoplasten in suspensie. Bij protoplasten van tabak lagen deze percentages wel veel hoger dan bij Astarte, maar bij zowel protoplasten van Astarte als bij tabak waren geen verschillen in celdeling na inbedden van protoplasten in alginaat. Als men de percentages celdeling, die bepaald werden met calcofluor white ging vergelijken met de cijfers van de celdeling na kleuring met Giemsa, dan waren er grote verschillen tussen deze bepalingen. Na kleuring met Giemsa bleken er wel verschillen te zijn tussen protoplasten, die waren ingebed en protoplasten in suspensie. Bij tabak was te zien, dat de protoplasten die niet waren ingebed veel beter delen. Bij Astarte daarentegen bleken de protoplasten die waren ingebed in alginaat beter te delen. Opvallend was, dat de cijfers van de celdeling van de cultures die goed deelden overeenkomen met de cijfers van de celdeling bepaald met calcofluor white. Daaruit valt te concluderen, dat de protoplasten net zoveel tussenwanden aanleggen, maar dat dit bij tabak in suspensie en bij Astarte in alginaat meestal leidde tot deling. Dit terwijl bij de andere cultures de vorming van een tussenwand niet altijd leidde tot celdeling.

Tellingen van de kerndelingen gaven bij de cultures die het meeste celdeling vertoonden aan, dat hier de minste meerkernige protoplasten voorkwamen. Het antwoord op de doelstelling of inbedden in alginaat een invloed heeft op het ontstaan van meerkernige protoplasten is moeilijk te geven.

Bij Astarte leidde het inbedden in alginaat tot betere resultaten. De celdeling van de protoplasten nam duidelijk toe en er onstonden minder meerkernige protoplasten dan als de protoplasten in suspensie werden gekweekt. Bij tabak nam de celdeling af als gevolg van het inbedden in alginaat.

Er was bij Astarte dus wel een positieve invloed van inbedding in alginaat, terwijl dit (in ieder geval niet de eerste vijf dagen) bij tabak niet het geval was. Met meer onderzoek bij meer planten en over een iets langere periode kunnen mogelijk de positieve effecten van alginaat beter onderzocht worden.

Referenties:

1. S. Roest and L.J.W. Gilissen (1989).
Plant regeneration from protoplasts: a literature review.
Acta Bot. Neerl. **38** (1) p. 1-23.
2. Francesco D'amato (1989).
Polyploidy in cell differentiation.
Caryologica vol. **42** n. 3-4 : 183-211.
3. Toshijuki Nagato and I taru Takebe (1971).
Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar
medium.
Planta **99** :12-20
4. R.D. Shillito, J. Paszowski, and I. Potrykus (1983).
Agarose plating and a bead type culture technique enable
and stimulate development of protoplast-derived colonies in
a number of plant species.
Plant Cell Reports **2** :244-247.
5. E. N. Adaoha Mbanaso and D. H. Roscoe (1982).
Alginate: an alternative to agar in plant protoplast cul-
ture.
Plant science letters, **25** :61-66.
6. David W. Galbraith (1981).
Microfluorimetric quantitation of cellulose biosynthesis by
plant protoplasts using Calcofluor White.
7. Wolfgang Blaschek, Dieter Haas, Hildegard Koehler and
Gerhard Franz (1981).
Cell wall regeneration by *Nicotiana tabacum* protoplasts:
chemical and biochemical aspects.
Plant Science letters, **22** :47-57.
8. Toshiyuki Nagata and Itura Takebe (1970).
Cell wall regeneration and cell division in isolated to-
bacco mesophyll protoplasts.
Planta **92** :301-308.
9. Michel Lalone, Didier Courtois and Pierre Manigault (1980).
Convenient and rapid fluorescent staining of plant cell
nuclei with '33258' Hoechst.
Plant science letters, **17** :175-179.
10. H. C. P. M. van der Valk, J. Blaas, J. W. van Eck, and
H. A. Verhoeven (1988).
Vital DNA staining of agarose-embedded protoplasts and
cell suspensions of *Nicotiana plumbaginifolia*.
Plant cell reports, **7** :489-492.
11. P. Brodelius and K. Nilsson (1980).
Entrapment of plant cells in different matrixes. A com-
parative study.
FEBS Letts, **122** :312-
12. K. N. Kao and M. R. Michayluk (1975).
Nutrient requirements for growth of *Vicia hajastana* cells
and protoplasts at very low population density in liquid
media.
Planta, **126** :105-
13. Cannon (1937).
A new biological stain for general purposes.
Nature, 1937 :549.

1. Enzymmedium.

Voorschrift voor 500 ml, osmolaliteit wordt gesteld op 500 mOsm ± 2%.

Km8p-stock (5x)	100 ml.
Glucose	20 g.
Mannitol	20 g.
Cellulase-R10 (1%)	5 g.
Macerozyme-R10 (0.2%)	1 g.
pH	5.6.

Osmolaliteit stellen met Mannitol/water.

2. Spoelmedium.

Voorschrift voor 500 ml, osmolaliteit wordt gesteld op 500 mOsm ± 2%.

Km8p-stock (5x)	10 ml.
KCl	8.8 g.
pH	5.6.

Osmolaliteit stellen met KCl/water.

3. "Floating" medium.

Voorschrift voor 100 ml, osmolaliteit wordt gesteld op 500 mOsm ± 2%.

Sucrose	16 g.
pH	n.v.t.

Osmolaliteit stellen met sucrose.

4. Km8p-stock (5x).

<u>compound</u>	<u>mg/l</u>	<u>St. (mg/ml)</u>	<u>ml/l</u>	<u>x5</u>	
NH ₄ NO ₃	600			3	g
KNO ₃	1900			9.5	g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	600			3	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	300			1.5	g
KH ₂ PO ₄	170			0.85	g
KCl	300			1.5	g
"Sequestrene 330"	28	Fe-EDTA	4	20	ml
KI	0.75	37.5/100	2	10	ml
H ₃ BO ₄	3	375/250	2	10	ml
MnSO ₄ ·4H ₂ O	12			60	mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2	500/500	2	10	ml
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	12.5/100	2	10	ml
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	12.5/100	0.2	1	ml
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	12.5/100	0.2	1	ml
Sodium pyruvate	20			0.1	g
Citric acid	40			0.2	g
Malic acid	40			0.2	g
Fumaric acid	40			0.2	g
Inositol	100			0.5	g
Nicotinamide	1	200/400	2	10	ml
Pyridoxine HCl	1	250/1000	4	20	ml
Thiamine HCl	1	500/500	1	5	ml
D-Calcium pantothen.	1	50/500	10	50	ml
Folic acid	0.4	10/100	4	20	ml

BIJLAGE 2

p-Aminobezoic ac.	0.02	10/100	0.2	1	ml
Biotin	0.01	10/100	0.1	0.5	ml
Choline Chloride	1	250/250	1	5	ml
Riboflavine	0.2	10/100	2	10	ml
Ascorbic acid	2	100/100	2	10	ml
Vitamin A	0.01	10/100	0.1	0.5	ml
Vitamin D ₃	0.01	10/100	0.2	0.5	ml
Vitamin B ₁₂	0.02	10/100	0.2	1	ml
Sucrose	250			1.25	g
Fructose	250			1.25	g
Ribose	250			1.25	g
Xylose	250			1.25	g
Mannose	250			1.25	g
Rhamnose	250			1.25	g
Cellobiose	250			1.25	g
Sorbitol	250			1.25	g
Mannitol	250			1.25	g
Glucose	68400			342	g
Casein hydrolyz.	250			1.25	g
Coconut water	20000	1000/1	20	100	ml
2,4-D	0.2	10/100	2	10	ml
Zeatin	0.5	10/100	5	25	ml
NAA	1	10/100	10	50	ml

pH 5.6 (NaOH)

5. Cultuurmedium (Km8p).

Voorschrift voor 500 ml, osmolaliteit wordt gesteld op 500 mOsm ± 2%.

Km8p-stock (5x)	100 ml.
Glucose	36 g.
2,4-D	0.1 mg. St.10/100 1 ml.
Zeatine	0.25 mg. St.10/100 (DV) 2.5ml.
NAA	0.5 mg. St.10/100 5 ml.
pH	5,6.

Osmolaliteit wordt gesteld met glucose/water.

6. Recept voor Na-alginaat:

- 2 of 2.8% Na-alginaat.
- 0.4 M Mannitol.
- Osmolaliteit 500 mOsmol.

7. Recept voor Calciumagar-plaatjes:

- 20 mM CaCl₂.
- 0.3 M Mannitol.
- 8 g/l agar.

8. Recept citraat-oplossing:

- 40 mM Na-citraat.
- 0.3 M Mannitol.

9. Hoechst 33342 Stockoplossing 100 ml.

Mannitol	0.45 M	8.5 g.
CaCl ₂	25 mM	0.368 g.
Hoechst 33342	0.5 mg	
pH	10.0	(met KOH).

Osmolaliteit stellen met Mannitol/water.

Hoechst 33342 pas toedienen, nadat de pH en de osmolaliteit gesteld zijn. Sterilisatie gebeurt door een filter.

10. Enzymmedium met cellulase 100 ml.

Km8p-stock (5x)	20 ml.
Glucose	4 g.
Mannitol	4 g.
Cellulase-R10 (0.2%)	1 g.
pH	5.6.

Osmolaliteit stellen met Mannitol/water.

11. Recept 2x SSC:

- 0.3 M NaCl.
- 0.03 M Na-citraat.

12. Recept Sörensenbuffer: (16 mM fosfaat, pH 6.9)

- 110 ml Na₂HPO₄-oplossing.
- 90 ml KH₂PO₄-oplossing.

TABEL 1 :Groottebepaling van protoplasten.
(grootte in μm /sd/aantal)

tijdstip	N.tab (vlb)	N.tab (1,4)	Astarte (vlb)	Astarte (1,4)
dag 0	38.5/8.0/50	48.2/10.5/50	32.9/6.5/50	43.1/7.0/50
dag 1	41.1/7.5/50	53.3/9.4/50	39.9/7.1/40	41.2/7.2/40
dag 2	48.7/8.0/50	52.9/10.7/50	44.9/5.6/40	48.9/8.3/40
dag 3	53.6/10.5/50	54.1/10.4/50	50.7/9.2/40	53.7/8.8/40
dag 4	53.9/11.4/50	53.7/11.1/50	54.0/9.1/50	59.2/10.0/50
dag 5	58.5/13.4/50	57.1/13.7/50	60.8/11.9/50	64.8/12.6/50

BIJLAGE 4

TABEL 2 : Groottebepaling van protoplasten van Astarte gekweekt bij verschillende osmolaliteiten in suspensie (grootte in $\mu\text{m}/\text{sd}/\text{aantal}$).

tijdstip	300 mOsm	400 mOsm	500 mOsm	600 mOsm
dag 1	41.6/10.4/40	46.7/12.4/40	40.6/6.0/40	37.4/7.0/40
dag 2	62.6/15.3/20	47.1/8.2/40	-	43.4/7.4/40
dag 3	-	55.9/12.3/40	-	45.8/6.8/40

TABEL 3 : Groottebepaling van protoplasten van Astarte gekweekt bij verschillende osmolaliteiten in alginaat van 1,4% (grootte in $\mu\text{m}/\text{sd}/\text{aantal}$).

tijdstip	300 mOsm	400 mOsm	500 mOsm	600 mOsm
dag 1	39.8/7.4/40	41.3/7.4/40	39.5/9.4/40	41.1/7.6/40
dag 2	42.0/5.0/40	46.9/9.4/40	-	42.7/6.9/40
dag 3	-	-	-	48.1/7.3/40

TABEL 4 : Groottebepaling van protoplasten van Astarte gekweekt bij verschillende osmolaliteiten in suspensie (grootte in $\mu\text{m}/\text{sd}/\text{aantal}$).

tijdstip	300 mOsm	400 mOsm	500 mOsm	600 mOsm
dag 1	44.4/13.8/20	43.2/10.4/40	39.9/7.1/40	32.8/6.0/40
dag 2	61.6/14.4/20	47.8/9.5/40	44.9/5.6/40	42.2/7.7/40
dag 3	-	55.3/11.0/40	50.7/9.2/40	46.7/6.9/40

TABEL 5 : Groottebepaling van protoplasten van Astarte gekweekt bij verschillende osmolaliteiten in alginaat van 1,4% (grootte in $\mu\text{m}/\text{sd}/\text{aantal}$).

tijdstip	300 mOsm	400 mOsm	500 mOsm	600 mOsm
dag 1	-	43.5/9.6/40	41.2/7.2/40	40.5/7.1/40
dag 2	-	50.5/10.5/40	48.9/8.3/40	43.3/7.0/40
dag 3	-	56.2/10.8/40	53.7/8.8/40	48.5/8.0/40

TABEL 6 : Percentages celdelingen bepaald met calcofluor white.				
tijdstip	N.tab (vlb)	N.tab (1.4%)	Ast (vlb)	Ast (1,4)
dag 1	0	0	0	0
dag 2	17	5	0.5	0
dag 3	29.25	25.25	7.75	9.75
dag 4	52.5	44	21.75	16.5
dag 5	-	45.5	19	17.75

TABEL 7 : Acytokinese en celdeling (per 1000 prpl.) van protoplasten van tabak.						
tijdstip	percentage acytokinese			celdeling		
	vlb	1,0 %	1,4 %	vlb	1,0 %	1,4 %
dag 0	-	-	-	0	0	0
dag 1	100	100	100	0	0	0
dag 2	71.2	100	97.8	61	0	0
dag 3	54.0	67.9	64.1	267	256	1
dag 4	63.5	-	65.4	600	-	268
dag 5	68.6	-	-	630	-	-

TABEL 8 : Acytokinese en celdeling (per 1000 prpl.) van protoplasten van Astarte.						
tijdstip	percentage acytokinese			celdeling		
	vlb	1,0 %	1,4 %	vlb	1,0 %	1,4 %
dag 0	-	-	-	0	0	0
dag 1	100	100	100	0	0	0
dag 2	100	96.6	100	0	4	0
dag 3	90.7	79.2	78.5	13.8	105.5	71.5
dag 4	82.1	71.3	66.8	99	243	193.5
dag 5	74.5	-	60.7	189.6	-	241.8

TABEL 9 : Percentages kern- en celdeling bij pro-
toplasten van tabak in suspensie.

Kernen	dag 0	dag 1	dag 2	dag 3	dag 4	dag 5
1	96.70	93.70	81.41	54.58	19.78	21.44
2	2.90	4.20	11.46	15.97	10.41	8.28
3	0.30	0.90	0.38	0.37	1.36	1.40
4	0.10	0.80	0.47	1.83	4.96	3.77
5	0	0	0	0.07	0.32	0.44
6	0	0	0	0	0.64	0.44
7	0	0	0	0	0.24	0.07
8	0	0	0	0.37	2.00	1.11
10	0	0	0	0	0.08	0
12	0	0	0	0	0.08	0
16	0	0	0	0.07	0.16	0
deling	0	0	6.1	26.74	59.97	63.02

TABEL 10: Percentages kern- en celdeling bij pro-
toplasten van tabak in 1,0 % alginaat.

Kernen	dag 0	dag 1	dag 2	dag 3	dag 4	dag 5
1	96.70	97.90	97.80	36.53	-	-
2	2.90	2.10	2.10	29.99	-	-
3	0.30	0	0	0.96	-	-
4	0.10	0	0.10	6.18	-	-
5	0	0	0	0.15	-	-
6	0	0	0	0.15	-	-
8	0	0	0	0.45	-	-
deling	0	0	0	25.60	-	-

TABEL 11: Percentages kern- en celdeling bij proto-plastaen van tabak in 1,4 % alginaat.						
Kernen	dag 0	dag 1	dag 2	dag 3	dag 4	dag 5
1	96.70	98.00	95.30	68.74	41.72	-
2	2.90	1.80	4.30	17.16	22.14	-
3	0.30	0.10	0.30	0.35	1.17	-
4	0.10	0.10	0	1.14	6.67	-
5	0	0	0	0	0.51	-
6	0	0	0	0	0.07	-
8	0	0	0	0.18	1.03	-
deling	0	0	0.10	12.43	26.69	-

TABEL 12: Percentages kern- en celdeling bij proto-plasten van Astarte in suspensie.						
Kernen	dag 0	dag 1	dag 2	dag 3	dag 4	dag 5
1	96.82	93.32	94.80	85.80	66.94	56.40
2	2.81	5.42	4.20	12.13	17.66	16.45
3	0.09	0.52	0.50	0.20	0.63	0.16
4	0.18	0.63	0.50	0.49	4.05	6.56
6	0.09	0	0	0	0.09	0.16
7	0	0.10	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0.72	1.38
16	0	0	0	0	0	0.08
deling	0	0	0	1.38	10.00	18.96

TABEL 13: Percentages kern- en celdeling bij proto-plasten van Astarte in 1,0 % alginaat.						
Kernen	dag 0	dag 1	dag 2	dag 3	dag 4	dag 5
1	96.82	93.80	88.25	63.06	41.25	-
2	2.81	4.90	8.67	23.70	26.34	-
3	0.09	0.60	1.00	0.36	0.38	-
4	0.18	0.50	1.10	2.32	6.89	-
5	0	0.10	0.50	0	0.15	-
6	0.09	0.10	0	0	0.15	-
8	0	0	0	0	0.53	-
16	0	0	0.10	0	0	-
delling	0	0	0.40	10.55	24.30	-

TABEL 14: Percentages kern- en celdeling bij proto-plasten van Astarte in 1,4 % alginaat.						
Kernen	dag 0	dag 1	dag 2	dag 3	dag 4	dag 5
1	96.82	96.40	94.00	70.57	55.32	54.51
2	2.81	2.90	5.20	17.55	20.00	14.48
3	0.09	0.60	0.40	1.21	0.81	1.06
4	0.18	0	0.40	2.41	4.35	4.40
5	0	0	0	0	0	0.08
6	0.09	0.10	0	0	0.08	0.23
7	0	0	0	0	0	0.08
8	0	0	0	0.09	0.08	0.99
16	0	0	0.09	0	0	0
delling	0	0	0	7.15	19.35	24.18

TABEL 15: Percentages celdeling van proto-plasten van tabak in suspensie geteld na kleuring met Giemsa.

deling	dag 2	dag 3	dag 4	dag 5
2x1	87.69	69.86	22.09	19.13
2x2	7.69	7.95	6.43	3.9
1+3	3.08	6.85	7.23	4.13
2x1+2	1.54	6.58	8.97	8.97
4x1	0	8.22	11.65	3.78
3x1	0	0.55	4.69	4.01
1+2	0	0	3.48	4.49
5x	0	0	3.61	6.73
6x	0	0	8.84	10.86
7x	0	0	2.00	5.79
8x	0	0	14.32	13.81
>8x	0	0	6.81	14.42

TABEL 16: Percentages celdeling van proto-plasten van tabak in 1 % alginaat geteld na kleuring met Giemsa.

deling	dag 2	dag 3	dag 4	dag 5
2x1	0	71.01	-	-
2x2	0	7.54	-	-
1+3	0	4.93	-	-
2x1+2	0	4.35	-	-
4x1	0	8.12	-	-
3x1	0	1.16	-	-
1+2	0	2.32	-	-
6x	0	0.29	-	-
8x	0	0.29	-	-

TABEL 17: Percentages celdeling van proto-plasten van tabak in 1,4 % alginaat geteld na kleuring met Giemsa.

deling	dag 2	dag 3	dag 4	dag 5
2x1	100	90.14	56.28	-
2x2	0	4.93	10.93	-
1+3	0	2.11	9.84	-
2x1+2	0	0	2.19	-
4x1	0	0	16.12	-
3x1	0	0	0	-
1+2	0	2.82	1.64	-
6x	0	0	0.27	-
8x	0	0	2.73	-

TABEL 18: Percentages celdeling van proto-plasten van Astarte in suspensie geteld na kleuring met Giemsa.

deling	dag 2	dag 3	dag 4	dag 5
2x1	0	92.86	47.75	20.51
2x2	0	7.14	24.32	22.65
1+3	0	0	15.32	12.82
2x1+2	0	0	0	4.27
4x1	0	0	11.71	26.50
3x1	0	0	0	0
1+2	0	0	0	0
6x	0	0	0	0
8x	0	0	0	11.54

TABEL 19: Percentages celdeling van proto-plasten van Astarte in 1 % alginaat geteld na kleuring met Giemsa.

deling	dag 2	dag 3	dag 4	dag 5
2x1	100	61.01	42.99	-
2x2	0	19.49	20.56	-
1+3	0	7.63	8.72	-
2x1+2	0	0	0.62	-
4x1	0	11.86	21.81	-
3x1	0	0	0	-
1+2	0	0	0	-
6x	0	0	0	-
8x	0	0	4.67	-

TABEL 20: Percentages celdeling van proto-plasten van Astarte in 1,4 % alginaat geteld na kleuring met Giemsa.

deling	dag 2	dag 3	dag 4	dag 5
2x1	0	83.12	65.83	53.92
2x2	0	10.39	9.85	6.58
1+3	0	1.30	4.58	5.33
2x1+2	0	0	2.92	6.85
4x1	0	5.19	10.83	16.30
3x1	0	0	0	0
1+2	0	0	0	0
6x	0	0	0	0
8x	0	0	0	3.76