

HET GEDRAG VAN DIPLOCHROMOSOMEN IN
BEGINNEND CALLUS VAN SOLANUM TUBEROSUM L.
TIJDENS DE MITOSE

Gert Baarda

D 270

HET GEDRAG VAN DIPLOCHROMOSOMEN IN BEGINNEND CALLUS VAN
SOLANUM TUBEROSUM L. TIJDENS DE MITOSE

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

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

Voorwoord

Dit verslag is het resultaat van een onderzoek bij de werkgroep cel- en plantengenetica aan de Rijks Universiteit te Groningen. Het onderzoek stond in het kader van een acht maands doctoraalonderwerp cel- en plantengenetica. De verslaglegging van het onderzoek gebeurt in twee delen : dit verslag en het verslag "Invloed van DNA-syntheseremmers op de polyploidisatie tijdens callusinductie aan bladexplantaten van Solanum tuberosum L."

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

Augustus '87

Gert Baarda

Inhoudsopgave.

Voorwoord	pagina 0
Inleiding	pagina 2
Materiaal en methoden	pagina 6
Resultaten	pagina 8
Conclusies en discussie	pagina 12
Literatuur	pagina 16

Inleiding.

Men kan de levenscyclus van een cel onder normale omstandigheden verdelen in een aantal fasen. Na het ontstaan van een cel (door deling) start de cel in de G1 (Gap 1) fase en doorloopt vervolgens de S (Synthese) fase, de G2-fase en de Mitose, waarna er uit de oorspronkelijke cel twee dochtercellen zijn gevormd. De G1- tot en met G2-fase wordt de interfase genoemd. Tijdens de S-fase vindt replicatie van het DNA plaats, terwijl RNA- en eiwitsynthese gedurende de hele interfase voorkomen. Tijdens de mitose treedt condensatie van de chromosomen op, waarna de chromosomen in twee identieke chromatiden gesplitst worden. Elk van deze twee chromatiden komt in een van de dochtercellen terecht. Deze splitsing van chromosomen en de gelijke verdeling van de chromatiden over de dochtercellen gebeurt door spoeldraden (in de spoelfiguur), die de chromatiden naar de uiteinden (polen) van de cel "trekken".

Onder bepaalde omstandigheden wijkt de levenscyclus van de cel af van de bovenbeschreven cyclus. Onder "natuurlijke" omstandigheden gebeurt dit bij de meiose, bij differentiatie en bij de vorming van wondweefsel. In het laboratorium treedt afwijking van de "normale" celcyclus voornamelijk op bij de vorming van wondweefsel. Dit wondweefsel ontstaat aan plantedelen bij het begin van een calluskweek, waarbij men een ongedifferentieerde celmassa in vitro doorkweekt. De meest voorkomende afwijking is het optreden van polyploidisatie. Hierbij heeft een cel in plaats van de normale set chromosomen een veelvoud van deze set, tot stand gekomen door een of meer verdubbelingen van het genoom.

Er worden drie mechanismen genoemd die op deze manier tot polyploidisatie kunnen leiden (Levan & Hauschka 1953) :

1. Restitutie : een normale mitose lijkt plaats te hebben, de chromatiden laten elkaar los, maar de scheiding in twee groepen ontbreekt. Er ontstaat een nieuwe kernmembraan om alle chromosomen.

2. Endomitose : tijdens de mitose blijft de kernmembraan aanwezig, zodat geen normale scheiding van de chromosomen plaats kan vinden.

3. Endoreduplicatie : de mitose wordt in zijn geheel overgeslagen.

Na genoemde evenementen kan de cel opnieuw een zelfde cyclus ingaan, dan wel een "normale" cyclus.

In het geval van endoreduplicatie blijven de twee chromatiden van het chromosoom bij elkaar en na de daaropvolgende interfase zijn in de mitose aggregaten van vier chromatiden zichtbaar, die diplochrosomen genoemd worden (White 1935). Mogelijk is dit ook bij endomitose het geval, terwijl Nagl (1978) beweert, dat zelfs bij restitutie diplochrosomen kunnen optreden, door stickyness (het aan elkaar kleven van chromatiden) of het slecht functioneren van de spoelfiguur.

Het kan gebeuren dat er meerdere ronden achtereen dergelijke afwijkingen van de normale celcyclus optreden. Er kunnen dan in een volgende mitose aggregaten van acht (quadruplochrosomen), zestien, etcetera, chromatiden gevonden worden. Dit soort aggregaten en diplochrosomen zijn onder andere gevonden bij wondweefsel van de knol van Sauromatum guttatum (Grafl 1939), uiewortels na behandeling met groeistof (Levan 1939), kankercellen van een muizeëmbryo (Levan & Hauschka 1953) en callusweefsel van de aardappel (Pijnacker et al. 1986).

De opbouw van diplochrosomen (en grotere aggregaten) is nog niet geheel duidelijk. Levan & Hauschka (1953) stellen, dat de vier chromatiden bijeen gehouden worden door een gemeenschappelijk centromeer. Goyanes & Schvartzman (1981) maken echter met EM-fotos duidelijk, dat een diplochrosoom is opgebouwd uit twee afzonderlijke chromosomen (met elk een centromeer), terwijl er lussen van chromatinedraden optreden tussen de twee naast elkaar gelegen chromosomen. Deze lussen zouden in aantal verminderen bij toenemende condensatie van de chromosomen.

Er zijn aanwijzingen (D'Amato 1952; Levan & Hauschka 1953) om te stellen, dat tijdens de mitose de diplochrosomen, onder invloed van de spoelfiguur, uiteenvallen in losse chromosomen,

die daarna op een "normale" manier, onafhankelijk van elkaar, in twee chromatiden uiteenvallen. Pijnacker et al. (1986) achten het daarentegen niet onmogelijk, dat de twee zusterchromosomen van een diplo als chromosoom naar de polen getransporteerd worden en daar pas in de volgende interfase of nog later in twee eenheden gesplitst worden. Deze suggestie wordt door het werk van Schenkel-Helder (1986) niet onderstreept, hoewel de theorie ook niet eenduidig weerlegd kan worden. Zij acht het niet waarschijnlijk, dat er een vaste combinatie van twee chromatiden gezamenlijk naar een pool migreert.

Het voornaamste hulpmiddel bij dergelijk onderzoek is de differentiële kleuring. Door gebruik te maken van DNA-precursors als bromodeoxyuridine (BrdU) of bromodeoxycytidine (BrdC), welke beiden in plaats van thymidine ingebouwd worden in het DNA, kan men verschillend gekleurde chromatiden (of gedeelten daarvan) verkrijgen. In het geval van BrdU of BrdC komt het er op neer, dat chromatiden, die enkelstrengs een van deze stoffen in hun DNA geïncorporeerd hebben, niet of moeilijk te onderscheiden zijn van "normale", met thymidine geïncorporeerde chromatiden. Chromatiden, die echter dubbelstrengs BrdU of BrdC in hun DNA geïncorporeerd hebben, kleuren duidelijk lichter dan de "normale" chromatiden. Dit kleurverschil is slechts te zien na UV-bestraling van met een fluorescentiekleurstof gekleurde preparaten, gevolgd door een Giemsa-kleuring. Deze techniek wordt over het algemeen aangeduid als "Fluorescent-Plus-Giemsa" (FPG) (Perry & Wolff 1974; Goto et al. 1975).

Diplochrosomen blijken nu na twee ronden DNA-synthese in aanwezigheid van BrdU of BrdC een uniek uiterlijk te vertonen: de diplo ziet eruit als een rijtje van vier chromatiden, waarvan de buitenste twee licht gekleurd zijn (dubbelstrengs geïncorporeerd) en de binnenste twee donker (enkelstrengs geïncorporeerd) (Takanari & Izutsu 1981; Pijnacker et al. 1986). De oorzaak hiervan is, dat de nieuwgevormde DNA-strands altijd aan de buitenzijde van de ouderlijke gevormd worden.

Met behulp van deze differentiële kleuring is het mogelijk het mitotisch gedrag van diplochrosomen te volgen. Immers, gaat een diplo in een keer uiteen, waarbij de twee zusterchromosomen

elk naar een pool migreren, dan verwacht men in de anafase altijd een combinatie van een donker en een licht chromatide (chromosoom) bij elke pool. Gaan de zusterchromosomen echter uit elkaar en gedragen zij zich daarna als "normale" mitotische chromosomen, dan verwacht men in de anafase zowel combinaties van een licht met een donker chromatide (chromosoom), als van twee lichte of twee donkere.

In dit onderzoek zal met behulp van differentiële kleuring van chromosomen in bladexplantaten van de aardappel een antwoord gezocht worden op de vraag :

Hoe gedragen diplochrosomen zich tijdens de meta- en anafase van de mitose ?

Materiaal en methoden.

Callus werd geïnduceerd aan blad- en stengelstukjes van de aardappel, Solanum tuberosum, monohaploïde ($2n=x$) lijn 7322 (Jacobsen 1981). De plantjes waren steriel opgekweekt op MS 10 (Murashige & Skoog medium met 10 g/l sucrose). Voor callusinductie werd de stengeltop met 2-4 blaadjes gebruikt. Stengel en blaadjes werden in stukjes en reepjes (loodrecht op de hoofdnerf) gesneden en uitgelegd op vast medium M 308 (Murashige & Skoog medium met 5 mg/l NAA en 0.1 mg/l Bap en 8 g/l agar) en geïncubeerd bij 25°C in het donker in met parafilm afgesloten petrischalen. Per petrischaal met 25 ml gestold medium werd 270 µg BrdC, opgelost in 2 ml demiwater, toegevoegd via een bacteriefilter. Dit gebeurde minstens een dag voor uitleggen van de explantaten. Schalen zonder BrdC dienden als contrôle.

Na 5, 6, of 7 dagen werden de explantaten van de schalen afgehaald en gefixeerd in koude (4°C) Carnoy (ethanol absoluut:ijsazijn= 3:1) voor minimaal 24 uur. Hierna werden van deze explantaten microscopische preparaten gemaakt volgens de methode, beschreven door Pijnacker et al. (1986). Na spoelen in demiwater werden de explantaten 45 minuten geïncubeerd in 15% (v/v) pectinase (Sigma P5146) / 1.5% (w/v) cellulase R10 (Yakult) in citraatbuffer pH 4.8 bij 37°C, weer gespoeld en minimaal 2 uur bewaard in demiwater. Daarna werd elk explantaat overgebracht op een met alcohol (96%) gereinigd objectglas en werd een druppel azijnzuur (60%) toegevoegd. Hierna werden de cellen in het explantaat in suspensie gebracht door met fijne naalden het materiaal uit elkaar te plukken. Deze suspensie werd omrand met Carnoy en een paar druppels Carnoy werden op de suspensie gedruppeld. Deze preparaten werden aan de lucht gedroogd.

Differentiële kleuring werd als volgt uitgevoerd (Pijnacker et al. 1986) : De preparaten werden 15 minuten bij kamertemperatuur geïncubeerd in 0.2 ml Hoechst 33258 oplossing (1 mg Hoechst in 1 ml alcohol absoluut) in 100 ml $\frac{1}{2}$ xSSC (2xSSC = 0.3 M NaCl + 0.03 M Na-citraat), uitgewassen in $\frac{1}{2}$ xSSC, waarna er

dekglasjes op werden aangebracht. Deze dekglasjes werden na 15 minuten bestralen met UV-licht van 154 nm en 366 nm (afstand 10 cm) weer verwijderd en de preparaten werden gedurende 30 minuten geïncubeerd in 2xSSC bij 60°C. Na spoelen met demiwater werden de preparaten gekleurd met 2% Giemsa oplossing in Sörensenbuffer (100 ml = 55 ml 1/15 M Na_2HPO_4 + 45 ml KH_2PO_4), gespoeld met Sörensenbuffer, demiwater, en daarna gedroogd met perslucht. De preparaten werden, via xylol, met DePeX permanent gemaakt. Kleuring van controlepreparaten werd volgens dezelfde procedure uitgevoerd, met dien verstande, dat de incubatie in Hoechst en de bestraling met UV-licht achterwege gelaten werden.

Resultaten.

In vele preparaten werden mitosen gevonden, zowel met diplochromosomen als met monochromosomen. Ook werden zowel platen met differentieel gekleurde chromosomen waargenomen als platen met niet differentieel gekleurde chromosomen, beiden met diplo- of met monochromosomen.

In de differentieel gekleurde mitosen werd regelmatig SCE (= Sister Chromatid Exchange, zie o.a. Wolff 1977; Latt 1981) waargenomen, waarbij chromatiden zowel donkere als lichte delen bevatten. In differentieel gekleurde platen bleken de lichte chromatiden (met 2x BrdC geïncorporeerd) altijd langer te zijn dan de donker gekleurde (met 1x BrdC), hoewel dit lengteverschil niet van plaat tot plaat gelijk is. Vooral bij anafasen blijkt een dergelijk lengteverschil een bemoeilijkende factor te zijn, omdat daarbij niet gezocht kan worden naar chromatiden (chromosomen) met gelijke lengte, die dan als afkomstig van één diplochromosoom betiteld zouden kunnen worden. Chromosomen met SCE's geven, samen met genoemde lengteverschillen, soortgelijke problemen.

In veel platen wordt daarnaast gezien, dat de chromatiden van verschillende (diplo)chromosomen aan elkaar vastkleven (stickyness). Bij lichte (2x BrdC geïncorporeerde) chromatiden lijkt deze neiging groter te zijn dan bij donkere (geen of een keer geïncorporeerd). Door dit soort problemen, en de voorgenoemde SCE's en lengteverschillen, werden geen bruikbare, differentieel gekleurde anafaseplaten gevonden.

Aan de hand van een aantal foto's zal getracht worden een verklaring te geven van tijdens de mitose van diplochromosomen waargenomen fenomenen. De foto's zullen besproken worden in de volgorde, waarin ze waarschijnlijk in de mitose voor zullen komen.



Foto 1

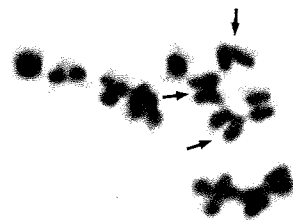


Foto 2

Foto 1 : Het typische uiterlijk van differentieel gekleurde diplochromosomen (hier 24) in de metafase : donkere chromatiden binnen, lichte chromatiden buiten. In deze metafaseplaat zijn stickyness (pijltje) en SCE's (diplo bij kruisje) duidelijk waarneembaar.

Foto 2 : In deze metafaseplaat van 12 differentieel gekleurde diplochromosomen zijn naast de bij foto 1 beschreven diplochromosomen nog enkelen te zien, waarvan de zusterchromosomen elkaar in zekere mate loslaten (pijltjes), maar niettemin duidelijk als een diplochromosoom naast elkaar liggen.

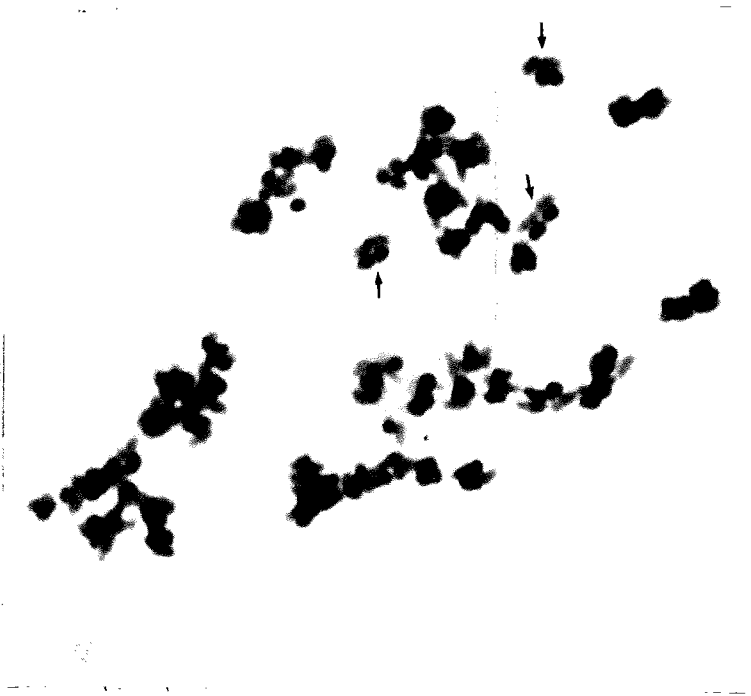


Foto 3

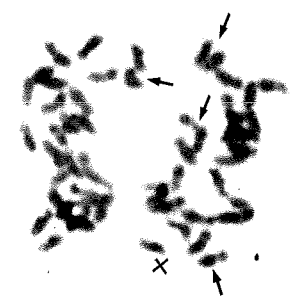


Foto 4

Foto 3 : Het grootste deel van deze metafaseplaat van 48 diplochrosomen is zeer moeilijk te interpreteren, mede omdat de chromosomen zeer sterk gecondenseerd zijn. Bij de vrijliggende diplochrosomen is echter een aantal waar te nemen, waar de twee zusterchromosomen (van een diplo) in elkaars verlengde lijken te liggen (pijltjes).

Foto 4 : Anafase van 12 niet differentieel gekleurde diplochrosomen. In deze anafase is te zien dat sommige chromatiden (chromosomen), die tezamen tot een diplochrosoom behoord hebben, nog zeer dicht bij elkaar liggen (pijltjes) en soms zelfs nog aan elkaar vast (lijken te) zitten. Bij het kruisje zijn twee chromosomen 2 te zien ("nucleolar organiser" chromosoom), die via hun sattelieten met elkaar verbonden (lijken te) zijn.

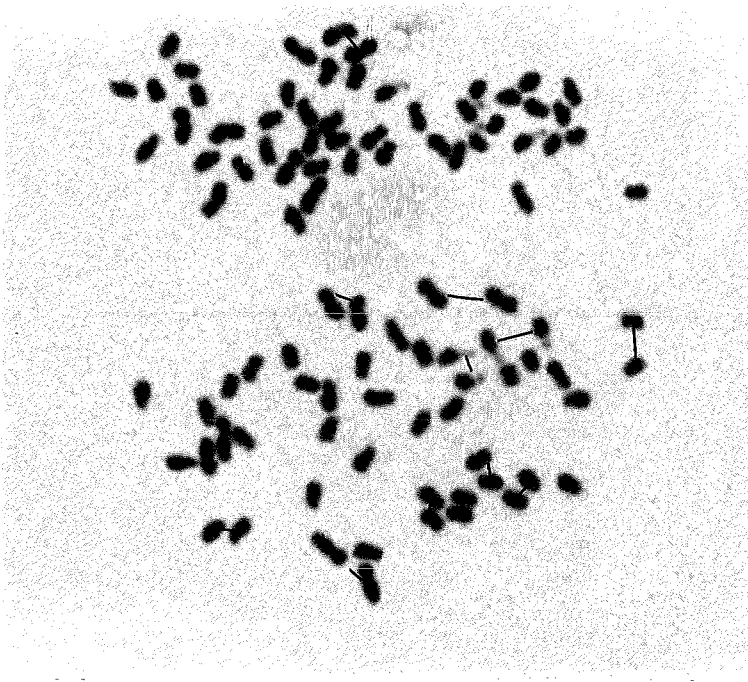


Foto 5

Foto 5 : Anafase van 24 niet differentieel gekleurde diplochromosomen, waarin geen verbinding meer lijkt te bestaan tussen de van een diplochromosoom afkomstige chromatiden (chromosomen). Het is echter aannemelijk dat deze plaat afkomstig is van diplochromosomen, doordat er zeer vaak twee uiterlijk gelijke chromatiden (chromosomen) vlak bij elkaar in de plaat liggen (streepjes).

Conclusies, Discussie.

Op grond van de in dit onderzoek verkregen resultaten kan over het gedrag van diplochrosomen in de mitose een aantal conclusies getrokken worden. Tijdens de profase en minstens een deel van de metafase is er een duidelijke, uniforme rangschikking van de chromatiden in de diplochrosom. Dit blijkt uit de zeer vaak gevonden rijtjes van vier chromatiden, waarbij in het geval van differentiële kleuring de lichtgekleurde (= laatstgevormde) chromatiden aan de buitenkant liggen. Het is echter niet duidelijk of de diplochrosomen in een levende cel ook als deze rijtjes voorkomen. Men kan zich namelijk voorstellen, dat de vier chromatiden een andere ruimtelijke oriëntatie en/of een zekere beweeglijkheid ten opzichte van elkaar bezitten, en slechts door de manier van preparaten maken (waarbij de chromosomen in een plat vlak gedwongen worden) als een plat rijtje worden waargenomen.

Bij verdergaande metafase lijken de zusterchromosomen elkaar los te laten (als in foto 2), terwijl zij mogelijkerwijs daarbij in elkaars verlengde komen te liggen (als in foto 3). Bij deze laatste punten moet men echter de grootst mogelijke voorzichtigheid betrachten. Ook hier is het namelijk mogelijk dat de waargenomen oriëntatie van de chromosomen niet een eigenschap van diplochrosomen is, maar een eigenschap van de manier van preparaten maken.

Stelt men zich bijvoorbeeld voor dat een diplochrosom geen rijtje van vier chromatiden is, maar een soort blokje van vier chromatiden (als in figuur 1a), dan zou het van de manier van "neerleggen" op het objectglas kunnen afhangen, hoe het uiterlijk van de diplochrosomen in de metafaseplaat is (figuur 1b, 1c). In de figuur zijn de chromatiden van de diplo van links naar rechts genummerd (zoals ze in het rijtje van vier te zien zijn). Verder is in de figuur de aanname verwerkt, dat er enige (ver)binding bestaat tussen de binnenste twee chromatiden (nrs. 2 en 3), die echter niet zo sterk is als de verbinding tussen de

twee linkse (1+2) en de twee rechtse (3+4) chromatiden. De verbinding tussen de chromatiden 2 en 3 wordt door Goyanes en Schvartzman (1981) verklaard door lussen van chromatinedraden tussen deze chromatiden, zoals waargenomen met de electronenmicroscop. De chromatiden 1 en 2 zijn door middel van een centromeer aan elkaar verbonden, evenals de chromatiden 3 en 4.

Tijdens de anafase blijven de twee, van een diplochrosomoom afkomstige chromatiden (chromosomen) bij elkaar in de buurt. Uiteindelijk zijn ze helemaal los van elkaar (als in foto 5), maar het is niet onmogelijk, dat dit gedurende de gehele anafase het geval is en dat de waargenomen verbindingen tussen zusterchromatiden (chromosomen) tijdens de anafase veroorzaakt worden door stickyness.

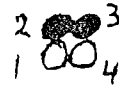
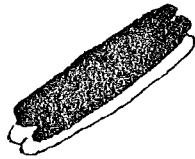
Tijdens dit onderzoek werden geen bruibare anafaseplaten van differentieel gekleurde diplochrosomen gevonden. Omdat de differentiële kleuring mede werd uitgevoerd om iets te kunnen zeggen over de afkomst van twee anafasechromatiden (chromosomen), afkomstig van één diplochrosomoom (immers, ieder van de twee zusterchromosomen in de diplo bevat één licht en één donker chromatide), kan weinig gezegd worden over deze afkomst. Het ontbreken van gehele chromosomen, die in het centromeergebied met elkaar verbonden zijn, tijdens de anafase, duidt echter niet op het uiteenvallen van diplochrosomen in twee gehele chromosomen. Deze mogelijkheid is echter niet uit te sluiten, omdat het mogelijk is, dat de zusterchromosomen onmiddellijk na het verlaten van het "diploverband" in twee chromatiden uiteenvallen, die dan samen verder getransporteerd worden. Een andere waarneming, die duidt op het afzonderlijk uit elkaar gaan van de chromatiden van elk zusterchromosomoom (van een diplochrosomoom) is te vinden bij Schenkel-Helder (1986). Zij vindt soms in anafaseplaten twee lichte of twee donkere chromatiden (chromosomen), die waarschijnlijk van hetzelfde diplochrosomoom afkomstig zijn.

Schenkel-Helder vindt echter wel, dat opvallend vaak in anafaseplaten koppels van een licht en een donker chromatide (chromosomoom) gevonden worden. Dit zou kunnen wijzen op een zodanige rangschikking van het diplochrosomoom in het equatoriale

vlak van de spoelfiguur, dat bij voorkeur het lichte chromatide van het ene chromosoom met het donkere chromatide van het andere (zuster-)chromosoom naar een pool gaat. Het is niet onmogelijk, dat het waargenomen "in elkaars verlengde liggen" met een dergelijk effect te maken heeft.

Ook de onderzoeken van Grafl (1939) en D'Amato (1952) wijzen in de richting van het gedrag van diplochrosomen als twee afzonderlijke chromosomen. Grafl (1939) vond bij Sauromatum guttatum diplochrosomen tot en met de prometafase, niet meer in de metafase. D'Amato (1952) vond ditzelfde voor sommige plantesoorten, bij anderen vond hij in de metafase sommige chromosomen nog gepaard, en weer anderen gaven nagenoeg hetzelfde beeld te zien als de aardappel in dit onderzoek, met een paring tot en met de anafase (min of meer). Gezien in dit licht, met in het achterhoofd de evolutionaire stabiliteit van het optreden van diplochrosomen (immers optredend bij zowel dierlijk als plantaardig materiaal) lijkt het waarschijnlijk dat diplochrosomen in de mitose uiteenvallen in twee chromosomen, die zich daarna elk als een normaal mitotisch chromosoom gedragen. Het zou dan afhankelijk zijn van het uitgangsmateriaal (of: de plantesoort) hoe lang de twee chromosomen aan elkaar vast blijven zitten. Het is mogelijk dat de snelheid waarmee de deling zich voltrekt met deze effecten te maken heeft. Ook het gebruikte medium en de daarin gebruikte hormonen zou van invloed kunnen zijn.

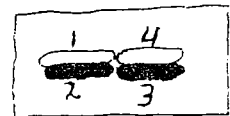
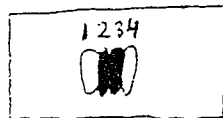
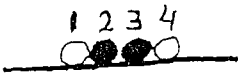
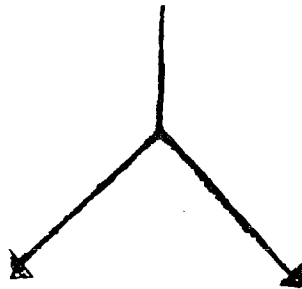
Verder onderzoek zou deze theorie kunnen onderbouwen of weerleggen, terwijl er tevens een antwoord gevonden zou moeten worden op de vraag of er inderdaad een "sturende kracht" bestaat, die voor een oriëntatie in het equatoriaal vlak zorgt, waardoor selectief een "oud" (donker) chromatide met een "nieuw" (licht) chromatide gezamenlijk naar een pool gaan. Eventueel valt er aan te denken om naast de aardappel materiaal van andere planten (met mogelijk andere eigenschappen) te gebruiken. Daarnaast zou het wenselijk kunnen zijn om gebruik te maken van technieken, waarbij de ligging van de (diplo)chromosomen in de spoelfiguur (waar nu eigenlijk naar gespeculeerd wordt) duidelijker wordt.



a: diplochromosoom als "blokje"

b: "plat"
neerleggen

c: "rechtstandig"
neerleggen



diplo als rijtje van
vier chromatiden

chromosomen in
elkaars verlengde

Figuur 1 : Mogelijke afhankelijkheid van de manier van preparaten maken van het uiterlijk van een diplochromosoom in de metafase van de mitose.

Literatuur.

- D'Amato F (1952) New evidence on endopolyploidy in differentiated plant tissues. *Caryologia* 4: 121-147
- Goto KT, Akematsu H, Shimazu H, Sujiyama T (1975) Simple differential staining of sister chromatids after treatment with photosensitive dyes and exposure to light and the mechanism of staining. *Chromosoma* 53: 223-230
- Goyanes VJ, Schvartzman JB (1981) Insights on diplochromosome structure and behaviour. *Cromosoma* 83: 93-102
- Grafl L (1939) Kernwachstum durch Chromosomenvermehrung als regelmässiger Vorgang bei Gewebedifferenzierung. *Chromosoma* 1: 265-275
- Jacobsen E (1981) Polyploidisation in leaf callus and in regenerated plants of dihaploid potato. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 1: 77-84
- Latt SA (1981) Sister chromatid exchange formation. *Ann Rev Genet* 15: 11-55
- Levan A (1939) Cytological phenomena connected with the root swelling caused by growthsubstances. *Hereditas* XXV: 87-96
- Levan A, Hauschka TS (1953) Endomitotic reduplication mechanism in ascites tumors of the mouse. *Journal of the national cancer institute* 14: 1-43
- Nagl W (1978) Endopolyploidy and polyteny in differentiation and evolution. North-Holland, Amsterdam New York Oxford
- Perry P, Wolff S (1974) New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 251: 156-158
- Pijnacker LP, Walch K, Ferwerda MA (1986) Behaviour of chromosomes in potato leaf tissue cultured in vitro as studied by BrdC-Giemsa labelling. *Theor Appl Genet* 72: 833-839
- Schenkel-Helder LT (1986) Het gedrag van diplochromosomen in callus van Solanum tuberosum tijdens de anafase. Stageverslag Vakgroep Genetica RUG

- Takanari H, Izutsu K (1981) Studies on endoreduplication II. Spontaneous occurrence and cellular kinetics of endoreduplication in PHA-stimulated lymphocytes. *Cytogenet Cell Genet* 29: 77-83
- White MJD (1935) Eine neue Form von Tetraploidie nach Röntgenbestrahlung. *Naturwiss* 23: 390-391
- Wolff S (1977) Sister chromatid exchange. *Annu Rev Genet* 11: 183-201