

Practicum  
Weefselkweek II

11. In-vitro vermeerdeing van Rhododendron .....	19
12. Vegetatieve vermeerdering van de Hyacinth.....	21
13. Embryocultuur van boon .....	23
14. Antherencultuur van Kaaps viooltje.....	25
15. Somatische embryogenese van peen .....	27
16. Infectieproeven .....	31
17. Eigen proef .....	39
Bijlage 1: Invulformulier infectieproeven.....	34
Bijlage 2: Opdracht waarnemen kolonies.....	35
Bijlage 3: Het maken van preparaten.....	36
Bijlage 4: Vormen van kolonies van micro-organismen.....	38

## **11: IN VITRO VERMEERDERING VAN RHODODENDRON**

### **Inleiding**

Houtige gewassen zijn over het algemeen lastiger in vitro te vermeerderen dan kruidachtige gewassen. Eén van de redenen hiervoor is dat het regeneratievermogen van houtige gewassen relatief zwak is ontwikkeld ten opzichte van kruidachtige gewassen. Bovendien is de kans op infectie nogal wat groter.

In deze proef zullen we proberen wortels te krijgen aan stukjes stengel van Rhododendron. De stengels kunnen het best apolair (op zijn kop) op het medium geënt worden. Door apolair te enten wordt de regeneratie bevorderd, door polair te enten wordt de regeneratie verminderd. De reden hiervoor is waarschijnlijk, dat er boven het medium een betere zuurstofvoorziening is; ook kan het te maken hebben met ophopingsverschijnselen. Ter vergelijking zullen in dit experiment ook stukjes Rhododendron polair geënt worden. In deze proef wordt tenslotte gebruik gemaakt van Rhododendrons die binnen zijn opgegroeid. Gewassen die buiten worden opgekweekt, geven in het algemeen nog veel grotere problemen bij de sterilisatie omdat veelal inwendige infecties aanwezig zijn.

### **Benodigdheden**

- \* Rhododendron
- \* Sterilisatiemateriaal (zie bladzij 5)
- \* Bekerglas 100 ml
- \* Snijplaat
- \* 2 pincetten 14 cm
- \* 2 pincetten 30 cm
- \* 2 scalpelmeshouders met mesjes
- \* Buizen met voedingsmedium

Samenstelling voedingsmedium per liter:

Macronutriënten: \* ( 125 mg  $\text{KNO}_3$   
( 500 mg  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$   
( 125 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$   
( 125 mg  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   
( 25,0 mg NaFeEDTA

Micronutriënten: \* ( 1,0 mg  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$   
( 0,05 mg  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$   
( 0,5 mg  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   
( 0,5 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$   
( 0,005 mg KI  
( 0,015 mg  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$   
( 0,015 mg  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$   
( 0,015 mg  $\text{AlCl}_3$

20,0 g glucose

7,0 g agar

+ 20,0 mg IAA- (kaliumzout)

1000 ml demiwater

pH = 5,8

Steriliseren 15 min. op 120 °C

\* Macro- en micronutriënten zijn als stockoplossingen aanwezig

+ IAA is als oplossing aanwezig

### Werkwijze

#Bereid het voedingsmedium volgens bladzij 2 en pipetteer 10 ml per buis

#Steriliseer de stengels uitwendig volgens bladzij 5

**Opm.** verbijftijd in de chlooroplossing is 20 min. i.p.v. 15 min.

#Snij m.b.v. de pincet (14 cm) en het scalpelmes de stengels in stukjes van ± 2 cm lengte  
(snij hierbij, om verwarring te voorkomen, de onderkant van de stengel schuin en de bovenkant vlak af)

#Breng de stukjes stengel over in de buis

#Ent 5 buizen polair en 5 buizen apolair

#Zet ze ongeveer voor de helft vast in het medium

#Incubeer bij 25 °C in het donker

#Na 2 tot 8 weken zal wortelvorming optreden.

Ga wekelijks na: infectie, aantal wortels, lengte van de wortels.

## **12: VEGETATIEVE VERMEERDERING VAN DE HYACINT**

### **Inleiding**

De hyacint kan vegetatief vermeerderd worden door stukjes bolrok te enten op een medium. Afhankelijk van de auxineconcentratie zullen er op de rok adventieve bolletjes, wortels of zal er callus gevormd worden. Uitgaande van de gevormde kleine bolletjes (bolrok, blaadjes), kan verder worden vermeerderd. Uit callus kunnen nieuwe hyacintplantjes worden geregenereerd door overenten op een ander medium. In deze proef zal getracht worden bolletjes, wortels en callus te verkrijgen op stukjes bolrok geënt op medium. De rol van auxine daarbij, zal worden onderzocht.

Literatuur: Pierik, R.L.M. e.a., Vakblad voor de Bloemisterij 30(3):14-17 (1975).

### **Benodigdheden**

- \* Sterilisatiemateriaal (zie bladzij 5)
  - \* Hyacintbol
  - \* Bekerglas 100 ml
  - \* 2 pincetten 30 cm
  - \* 2 scalpelmeshouders met scalpelmessjes
  - \* Snijplaat
  - \* Buizen met voedingsmedium
- Samenstelling voedingsmedium per liter:
- 4,6 g MS-zouten
  - 30,0 g suiker
  - 7,0 g agar
  - 1000 ml demiwater
  - pH = 5,8

Steriliseren 15 min. bij 120 °C

- + Voeg resp. 0,0 en 10,0 mg IBA per liter toe
- MS-zouten = Zoutenmengsel vlgs. Murashige en Skoog
- + IBA is als oplossing aanwezig

### **Werkwijze**

!! De bollen bevatten oxaalzuur, wat bij vrijwel iedereen jeuk en lichte irritaties oplevert.

Kriebel dus niet met je vingers op je hoofd, want je blijft dat dan doen!!

#Spoel de hyacintbol met leidingwater goed schoon en verwijder de losse bladen en de  
rokken met bruine plekken

#Verwijder het hart uit de bol

#Snij de bol doormidden

#Snij de overgebleven bolrokken in explantaten van 1 cm breed en 2 à 3 cm lengte

#Steriliseer ze volgens bladzij 5

#Flambeer de pincetten e.d.

#Snij de door het chloor aangataste delen weg

#Breng op steriele wijze de bolrokken over in de buis

#Incubeer bij 25 °C

Controleer wekelijks of en hoeveel callus, wortels en/of adventieve bolletjes er gevormd  
zijn.

Is er verschil in vorming van de diverse plantdelen tussen de twee voedingsmedia?

### **13: EMBRYOCULTUUR VAN BOON**

#### **Inleiding**

De embryocultuur wordt in o.a. de plantenveredeling gebruikt om te voorkomen dat bij kruisingen (vaak over de soort heen) het embryo niet levensvatbaar is (zgn. embryo-abortie). Daarnaast biedt het de mogelijkheid om zaadkieming te versnellen. Bij dit experiment zullen we leren hoe we embryo's uit moeten prepareren. Tevens zullen we de invloed van de suikerconcentratie op de ontwikkeling van embryo's onderzoeken.

#### **Benodigdheden**

- \* Sterilisatiemateriaal (zie bladzij 5)
- \* Peulen van slabonen
- \* Bekerglas 100 à 200 ml
- \* 2 pincetten (14 cm) met kromme bek
- \* 2 scalpelmeshouders met mesjes
- \* Snijplaat
- \* Buizen met voedingsmedium
  - Samenstelling voedingsmedium per liter:
    - \* 100 ml Heller macro-zouten
    - \* 1 ml Heller micro-zouten
    - + glucose
    - 7,0 g agar
    - 900 ml demiwater
    - pH = 6,0
  - Steriliseren 15 minuten op 120 °C
- \* Heller macro-zouten en Heller micro-zouten zijn als oplossing aanwezig
- \* Bij dit experiment wordt per groep van drie personen verschillende hoeveelheden (variatie van 1, 3 en 5 %) glucose toegevoegd.

#### **Het inzetten gaat per groep als volgt:**

	<u>student 1</u>	<u>student 2</u>	<u>student 3</u>
<u>1 % glucose</u>	embryo	embryo + cotyl	gehele zaad
<u>3 % glucose</u>	embryo + cotyl	gehele zaad	embryo
<u>5 % glucose</u>	gehele zaad	embryo	embryo + cotyl

#### **Werkwijze**

- #Bereid het medium volgens bladzij 2 (laat het medium na sterilisatie schuin stollen)
- #Steriliseer de peulen volgens bladzij 5 (i.p.v. 3 maal spoelen is 2 maal spoelen voldoende)
- #Neem met een pincet of met goed ontsmette handen een peul uit het bekersglas en leg deze op de snijplaat
- #Snij langs de bovennaad de peul open (snij niet te diep om beschadiging van het zaad te voorkomen)
- #Neem met de pincet de zaden uit de peul en leg deze op de snijplaat
- #Snij met het scalpelmes de zaadhuid open en verwijder deze
- #Haal het embryo tussen de cotylen weg en breng deze over in de buis, nadat met het scalpelmes een kuiltje halverwege het schuine vlak is gemaakt, (vijf buizen)
- #Prepareer op dezelfde manier embryo's uit maar laat de helft van de cotylen aan het embryo zitten (vijf buizen)
- #Breng ook hele bonen over in de buis (vijf buizen)
- #Incubeer de buizen bij 25 °C in continu licht

Ga wekelijks na hoe de plantjes zich ontwikkelen, is er verschil in de drie explantaten en de drie media (gebruik hiervoor ook resultaten van de groep).

## **14: ANTHERENCULTUUR VAN KAAPS VIOOLTJE**

### **Inleiding**

De productie van haploïde planten (dit zijn planten met cellen die de helft van het normale aantal chromosomen bevatten) is voor de veredelaar van groot belang i.v.m. het verkrijgen van homozygoot materiaal. Homozygote planten uit haploïde planten kunnen o.a. verkregen worden door behandeling met colchicine, waardoor het aantal chromosomen weer verdubbeld kan worden.

Bij deze proef worden de bloemknoppen van het Kaaps viooltje uitwendig gesteriliseerd waarna de antheren worden uitgeardeerd en op petrischalen overgebracht.

### Literatuur:

Pierik, Plantenteelt in kweekbuizen, H. 23.

Hughes e.a., Anther-derived haploïds of the African violet. Can. J. Bot. Vol 53 (1975) 1442-1444.

Weatherhead e.a., Increased haploïd production in Saintpaulia by anther culture. Scientia Hort.,17 (1982) 137-142.

### **Benodigheden**

- \* Sterilisatiemateriaal (zie bladzij 5)
- \* Bloemknoppen van Kaaps viooltje
- \* Bekerglas 100 ml
- \* 2 pincetten (14 cm) met kromme bek
- \* 2 scalpelmeshouders met mesjes
- \* Snijplaat
- \* Petrischalen ( $\varnothing$  6 cm) met voedingsmedium

Samenstelling voedingsmedium per liter:

4,6 g MS-zouten

30,0 g suiker

7,0 g agar

\* 1,0 mg NAA

\* 0,5 mg BAP

1000 ml demiwater

pH = 5,8

Steriliseren 15 minuten op 120 °C

MS-zouten = Zoutenmengsel vlg. Murashige en Skoog

\* NAA en BAP zijn als stockoplossing aanwezig

### **Werkwijze**



#Bereid het medium volgens bladzij 2

#Steriliseer de bloemknoppen volgens bladzij 5

#Neem met een pincet een bloemknop uit het bekersglas en leg deze op de snijplaat

#Verwijder met pincet en scalpelmes de bloembladen en prepareer de antheren uit

#Breng de antheren over op de petrischaal (max. 4 per schaal)

#Incubeer bij 25 °C bij minimaal 16 uur licht per dag

Ga wekelijks de ontwikkeling van het explantaat na (bijv. callusvorming en aantal scheuten).

## **15: SOMATISCHE EMBRYOGENESE VAN PEEN**

### **Inleiding**

In de snelle vermeerdering is het van belang om zoveel mogelijk bruikbaar materiaal te krijgen met zo min mogelijk inspanning. Een vorm van zeer snelle vermeerdering is de celsuspensiecultuur. Vooral als de cellen zich ontwikkelen tot embryo's en deze 'verzaaibaar' worden is deze weg interessant. Er wordt dan gesproken van "kunstzaad". Omdat hierbij een callusfase optreedt is de mogelijkheid van mutatie (somaclonale variatie) helaas aanwezig.

De celsuspensiecultuur als tussenstap kan op zich ook van belang zijn, bijvoorbeeld bij de productie van secundaire metabolieten. Een voorbeeld hiervan is de vorming van thiofenen in celsuspensieculturen van *Tagetes*.

### **Benodigheden**

- \* Petrischalen/erlenmeyers met voedingsmedium
- \* Samenstelling voedingsmedium per liter:
  - 3,18 g Gamborg B5
  - 112 mg Gamborg B5 vitamines \*
  - 100 mg Myo-inositol
  - 10 mg thiamine HCL
  - 1 mg nicotinezuur
  - 1 mg pyridoxine HCl
- 7,0 g agar (bij vast medium)
- 1000 ml demiwater
- pH = 5,9
- Steriliseren 15 min bij 120 °C

\* vitamines en 2,4-D zijn (filtergesteriliseerd) als stockoplossing aanwezig.  
Afhankelijk van het kweekstadium wordt suiker en of 2,4-D toegevoegd (zie werkwijze)

- \* Wortelzaad
- \* Alcohol 70 % (80 ml alcohol 96 % + 43 ml demiwater)
- \* Steriel demiwater
- \* Tween 20
- \* Steriele polystyreen (PS) centrifugebuizen
- \* Vacuumexsiccator
- \* Vacuumpomp
- \* Schudmachine
- \* Pincet
- \* Scalpelmeshouder met mesje

- \* Snijplank
- \* Steriele pipetten (1 en 10 ml)
- \* Petrischalen ( $\varnothing$  6 cm)
- \* Parafilm
- \* Steriele erlenmeyers
- \* Nylongaas (40 en 150  $\mu$ M)
- \* Bekerglazen (100 ml)
- \* Telkamer
- \* Microscoop

## Werkwijze

Dit totale experiment is is een aantal (4) onderdelen te onderscheiden:

1. Het zaaien van het zaad
2. Het snijden van de hypocotylen, calluskweek en schudcultuur
3. Het maken van de somatische embryo's
4. Het uitzetten van de embryo's en uitplanten

### 1. Het zaaien van het zaad

- #Breng  $\pm$  25 wortelzaadjes in een steriele PS centrifugebuis
- #Voeg 8 ml alcohol (70 %) toe en schud 10 sec
- #Zet de bus in een vacuumexsiccator
- #Houd de inhoud gedurende 2 min onder vacuum (m.b.v. een vacuumpomp)
- #Giet de alcohol af
- #Spoel drie maal met steriel demiwater
- #Voeg toe 8 ml bleekwater (4 % actief chloor) met Tween 20 (2 druppels per liter)
- #Zet de bus in een vacuumexsiccator
- #Houd de inhoud gedurende 2 min onder vacuum (pas op, kan schuimen)
- #Laat de bus met inhoud 15 min schudden op een schudmachine
- #Giet het bleekwater af (in de entkast)
- #Was 10 maal met steriel demiwater
- #Leg de zaadjes met een pincet op petrischalen ( $\varnothing$  6 cm) met Gamborg B5 medium met 2 % suiker ( $\pm$  6 zaadjes per schaal)
- #Dicht de schalen af met Parafilm
- #Incubeer de schalen bij 25 °C in het donker

#Controleer na drie dagen op infectie

#Zet de niet geïnfecteerde zaadjes over op schalen met Gamborg B5 medium met 0,44 ppm 2,4-D ( $2 \mu\text{M}$  2,4-D), maar zonder suiker

## 2. Het snijden van de hypocotylen, calluskweek en schudcultuur

#Controleer na 1 week op infectie

#Snij met een scalpelmes van de niet geïnfecteerde plantjes de hypocotylen in stukjes van 2 à 3 mm

#Zet deze stukjes in 'hoopjes' van 3 à 4 over op schalen met Gamborg B5 medium met 0,44 ppm 2,4-D en 2 % suiker

#Incubeer 3 à 4 weken bij 25 °C; er zal zich nu callus ontwikkelen

#Ent de vercalluste stukjes hypocotyl in erlenmeyers (ca. 1 g hypocotyl per 20 ml medium) met  $\pm$  30 ml vloeibaar Gamborg B5 medium met 0,44 ppm 2,4-D en 2 % suiker

#Incubeer de erlenmeyers bij 24 °C in het donker

Om de celcultuur in stand te houden moet elke 2 weken het medium 1 : 1 verdund worden. Ongeveer 6 tot 8 weken na het inzetten zal een suspensie ontstaan zijn die in hoge mate embryogeen is. Na de derde subcultuur (6 weken) moeten de grootste brokken verwijderd worden en het p.c.v. (packed cell volume) bepaald worden. Als dit 0,2 is kan 1 : 4 tot 1 : 5 verdund worden.

Het p.c.v. wordt als volgt bepaald:

#Breng 5 ml van een 14 dagen oude cultuur in een geïnduceerde centrifugebuis

#Centrifugeer 5 min bij 1100 t.p.m.

#Bepaal het aantal ml bezinksel

#Deel het aantal ml bezinksel door het totaal volume (bijv. 1 ml bezinksel en 5 ml totaal volume:  $1/5 = 0,2$  p.c.v.)

#Na ongeveer 6 maanden zal de groeisnelheid groter worden (p.c.v. van 0,3 tot 0,5 en >). Kort daarna zal de cultuur zijn embryogeen vermogen verliezen en zal moeten worden vervangen.

## 3. Het maken van de somatische embryo's

#Bevestig nylondoek, maaswijdte van 150  $\mu\text{M}$ , op een bekersglas van 100 ml

#Maak ook een bekersglas klaar met doek van 40  $\mu\text{M}$  maaswijdte

#Steriliseer het geheel in een zak

#Verdund een 7 dagen oude cultuur in een erlenmeyer met 40 ml Gamborg B5 medium met 2 % suiker

- #Meng het geheel en filtreer het op steriel wijze af
- #Voeg medium toe tot de rand van het bekglas
- #Spoel met een pipet alle kleine deeltjes door het doek ( $\pm 20$  maal de pipet volzuigen en leeg laten lopen op het doek)
- #Verwijder het nylon doek
- #Filtreer als boven
- #Breng de cellen die op het nylondoek liggen over in een (PS) centrifugebuis
- #Tel m.b.v. een telkamer de cellen, inclusief de pro-embryogene kluitjes ( $\pm 10$  tot 12 ronde cellen per kluitje)
- #Verdun met Gamborg B5 medium tot  $\pm 20.000$  cellen per ml
- #Verdeel 0,5 ml suspensie in een petrischaal ( $\varphi 6$  cm) met Gamborg B5 medium met 2 % suiker
- #Incubeer bij 25 °C in licht.

#### 4. Het uitzetten van de embryo's en uitplanten

Na 14 dagen hebben zich uit de losse cellen wortelplantjes ontwikkeld

- #Breng met een steriele pincet een plantje over in een buis met vast Gamborg B5 medium met 2 % suiker
- #Incubeer bij 20 °C in licht
- Na enige tijd is het plantje zover gegroeid dat deze opgepot kan worden
- #Vul een potje losjes met een mengsel van potgrond en zand
- #Zet het potje in een bak met water en laat de grond verzadigen met water
- #Maak een gaatje in de grond en zet hier het plantje in
- #Vul het gaatje voorzichtig met grond
- #Dek het plantje af met een plastic zak (deze kan na  $\pm 1$  week verwijderd worden)
- #Zet het potje op de kiemtafel.

## **16: INFECTIEPROEVEN**

### **Inleiding**

Eén van de grootste problemen waarmee een (beginnend) weefselkweker geconfronteerd wordt, is de grote hoeveelheid infecties die op de meest ongewenste momenten zich voordoet. Het zijn vooral bacteriën en schimmels die ons parten spelen. Er zijn twee wegen waarlangs de infecties opduiken:

- via de lucht (de zgn. luchtinfectie)
- via aan of in het plantmateriaal aanwezige "micro"-organismen (uitwendige resp. inwendige besmettingen).
- via gereedschap en voedingsmedia

Een methode om zo weinig mogelijk last te hebben van infecties, is rustig en zorgvuldig werken. We proberen in het practicum daar de nodige aandacht aan te schenken.

Daarnaast kan een stukje bewustzijn van belang zijn.

We proberen dan ook de "onzichtbare" micro-organismen in dit onderdeel van het practicum zichtbaar te maken.

Daartoe zullen we tijdens onze weefselkweek-verrichtingen enkele proefjes mee laten lopen. Aan het eind evalueren we die proefjes, waarbij we tevens nader kennismaken met de soorten micro-organismen die ons parten spelen.

### **Benodigheden**

- \* Petrischalen met moutagar en plate countagar
- \* Binoculair of telapparaat
- \* Eventueel microscoop, objectglazen, dekglasjes en kleurstoffen
- \* Entnaalden
- \* Incubator

### **Werkwijze**

#### **Enten suikerbiet**

#Voorzie al de te gebruiken platen van codes op de bodem (deksels kunnen gemakkelijk verwisseld worden)

#Open op verschillende plaatsen in de entkast enkele petrischalen met mout- en plate countagar

#Laat ze openstaan gedurende het enten van de explantaten

#Zet gedurende de zelfde tijd ter vergelijking ook twee petrischalen (één met mout- en één met plate countagar) buiten de entkast open

#Sluit na het enten de petrischalen en zet ze omgekeerd (met de schaal naar boven) in de

incubator

### **We onderzoeken hier dus de luchtinfectie.**

#### Enten aardappel

Het plantmateriaal dat we hier gebruiken is niet steriel. Daarom wordt uitwendig gesteriliseerd. We controleren of de uitwendige ontsmetting geslaagd is, door met het plantmateriaal in de entkast enkele malen over het oppervlak van mout- en plate countagar te strijken. Daarna de petrischaal weer sluiten. Tevens gaan we kijken of ons gereedschap wel steriel is.

#Prik na een handeling met scalpelmesje, pincet of prepareernaald het medium in de petrischaal aan.

### **We onderzoeken hier infectie door plantmateriaal en gereedschap**

#### Enten rhododendron

Het materiaal dat we hier gebruiken komt van buiten (of eventueel uit de kas). De kans op inwendige besmettingen is dan vrij groot. Vandaar dat we proberen te kijken hoe groot de inwendige besmetting is.

#Snij met een steriel scalpelmesje een stengelstukje in de lengte doormidden.

#Strijk met de opengesneden zijde van het stengelstukje over een petrischaal met mout- en plate countagar.

#Strijk ter vergelijking met uitwendige infectie, met de buitenkant van een ander stengelstukje over twee andere petrischalen met mout- en plate countagar.

### **We onderzoeken hier de inwendige besmetting**

#### Evaluatie

#Vergelijk de uitkomsten van de verschillende proeven.

#Probeer na te gaan met welke micro-organismen we te maken hebben en hoeveel van elke soort (bacterie, gist en schimmel) tot ontwikkeling is gekomen in de vorm van een kolonie.

#Maak eventueel preparaten en kleur ze indien nodig.

Gebruik voor dit alles de bijlagen.

Trek (schriftelijk) je conclusies.

### **Opmerkingen**

- Zet steeds de datum en de aard van de behandeling op de bodem van je petrischalen en dicht ze af met Parafilm
- Incubeer de petrischalen met de schaal naar boven ca. 3 dagen bij 25 °C
- Bewaar ze daarna met de schaal naar boven en afgesloten met Parafilm, in de koelkast.



Bijlage 1.

Invulformulier infectieproeven

Tabel 1. Aantal kolonies op plate countagar

	Suikerbiet		Aardappel		Rhododendron	
	luchtinfectie		ontsmetting		in/uitwendige	
			materiaal/		besmetting	
			gereedschap			
	kast	tafel	plant	gereed-	in-	uit-
kolom	1.	2.	3.	4.	5.	6.
o bacteriën	3	3	3	3	3	3
o gisten	3	3	3	3	3	3
o schimmels	3	3	3	3	3	3

Tabel 2. Aantal kolonies op moutagar

	Suikerbiet		Aardappel		Rhododendron	
	luchtinfectie		ontsmetting		in/uitwendige	
			materiaal/		besmetting	
			gereedschap			
	kast	tafel	plant	gereed-	in-	uit-
kolom	1.	2.	3.	4.	5.	6.
o bacteriën	3	3	3	3	3	3
o gisten	3	3	3	3	3	3
o schimmels	3	3	3	3	3	3

Bijlage 2.

1. Beschrijf de meest voorkomende kolonies van bacteriën en schimmels op de verschillende petrischalen, waarbij aan de orde komt:
  - 1.1 vorm van de kolonie
  - 1.2 dwarsdoorsnede van de kolonie
  - 1.3 kleur van de kolonie
  - 1.4 uiterlijk van de kolonie (dof, glanzend, e.d.)
  - 1.5 vorm van de kolonierand  
(gebruik hierbij bijlage 4, blz 38)
  
2. Geef een verklaring voor mogelijke verschillen tussen kolom 1 en 2 in tabel 1 en tussen kolom 1 en 2 in tabel 2.
  
3. Geef een verklaring voor mogelijke verschillen tussen de corresponderende kolommen uit tabel 1 en tabel 2.
  
4. Vergelijk de besmetting op platen behandeld met plantenmateriaal (kolom 3, 5 en 6 in tabel 1 en 2 ) met de besmetting in de in-vitro buizen. Tracht voor mogelijke verschillen een verklaring te geven!
  
5. Trek je conclusies uit de gevonden resultaten.

Bijlage 3.

**HET MAKEN VAN EEN NAT PREPARAAT**

**Benodigdheden**

- \* Voorwerpglas met dekglasje
- \* Doekje of zacht papier
- \* Brander
- \* Spuitfles met water
- \* Entnaald met oog
- \* Buis of petrischaal met cultuur
- \* Microscoop

**Werkwijze**

- #Neem een voorwerpglas en wrijf het met een doekje of zacht papiertje schoon
- #Haal het een paar maal door de vlam
- #Breng een druppel water op het voorwerpglas
- #Neem met het oog van de entnaald een beetje cultuur
- #Meng dit met het water
- #Neem een dekglasje en wrijf het schoon
- #Leg het dekglasje met een pincet op het voorwerpglas
- #Bekijk met de microscoop met een 40 \* of 100 \* objectief het preparaat.

**HET MAKEN VAN EEN PLAKBANDPREPARAAT**

(Voor het maken van schimmelpreparaten)

**Benodigdheden**

- \* Voorwerpglas
- \* Doekje of zacht papier
- \* Brander
- \* Spuitfles met water
- \* Petrischaal met schimmelcultuur
- \* Microscoop

**Werkwijze**

- #Neem een voorwerpglas en wrijf het met een doekje of zacht papiertje schoon
- #Haal het een paar maal door de vlam
- #Breng een druppel water op het voorwerpglas
- #Trek een stuk plakband om de duim met de niet plakkende kant tegen de duim
- #Druk het plakband tegen de schimmelcultuur op de petrischaal

- #Leg het plakband met de schimmelcultuur naar de glaskant gericht op het voorwerglas
- #Scheur de uiteinden van het plakband langs de rand van het voorwerglas af
- #Bekijk met de microscoop met een 10 \* of 40 \* objectief het preparaat.
- #Maak een tekening van de schimmel.



## **17: EIGEN PROEF**

Bij deze laatste proef is het de bedoeling dat je echt helemaal zelf aan het werk gaat.

De opdracht is dan ook:

### **Bedenk zelf een weefselkweek en test een tweetal variabelen**

Je zou bijvoorbeeld een kamerplant kunnen vermeerderen en de variabele temperatuur en suikerconcentratie kunnen nemen.

Dat betekent dat je geheel zelfstandig op zoek gaat naar een plantesoort waar je wel wat mee zou willen stoeien. Je gaat dan uitzoeken:

#Welk plantendeel daarvan je gaat gebruiken

#Of er literatuur is die daar wat ervaringen van vermeld

#Welke samenstelling het medium moet hebben

#Welke variabelen je zou willen testen

#Welke gevolgen je denkt dat dat zal hebben

#en eventueel andere zaken.

Dat voorbereidende werk mondt uit in een **proefopzet**. Deze biedt je ter beoordeling aan aan BOJ en/of DRM, en wel in de eerste week van **maart**. Na eventuele bijstelling wordt dat definitief en dan ga je de benodigdheden bij elkaar zoeken.

De datum van inzetten van de proef staat op het practicum-rooster. Gedurende de erop volgende weken/maanden worden er geregeld waarnemingen verricht en eventueel nog wat bijgestuurd.

Op de laatste donderdag van de lesweken (eerste en tweede uur) houd je een presentatie over je proef. Je bespreekt dan de doelstelling, de proefopzet, de verwachtingen van de resultaten, de werkelijke resultaten en een evaluatie. Het geheel moet daarna ook schriftelijk (als proefverslag) worden afgerond.

N.B. De beoordeling van deze proef vormt de helft van het cijfer van het practicum weefselkweek, de verslagen van de andere proeven de andere helft.