

A  
1  
R  
22

122:53  
Stamboek no.  
4492

**PROEFSTATION VOOR DE GROENTEN- EN FRUITTEELT ONDER GLAS  
TE NAALDWIJK**

**Het ontmetten van tomaten-hypocotylen in verband met  
het opzetten van waafercultures. 1969.**

**W. van Ravenswaay**

**Handduijk, 18 februari 1971.**

2231993

### Inleiding

In deze proef werden enkele ontmettingen vergeleken in verband met het opzetten van weefselcultures uit tomaten-stengeldelen. Het volgende werd hierbij overwogen.

Voor orgaancultures van tomaat, waarbij van bloemen of zeer jonge vruchtbeginsels wordt uitgegaan, is het tot nu toe nog niet gelukt een goede ontmetting te vinden. Daarom werd er aan gedacht of het mogelijk zou zijn via een weefselkweek tot bloemvorming te komen. Het verkrijgen van jonge steriele plantjes uit ontmette zaden, is goed uit te voeren, omdat de zaden gemakkelijk te ontmetten zijn zonder deze zichtbaar te beschadigen. De uit dergelijke zaden verkregen plantjes kunnen in kleinere delen worden gesneden, waarbij steriel weefsel wordt gevormd (callus, wortels, plantjes). Deze weefsels (callus, wortels, plantjes) zijn dus ontstaan uit een vegetatief plantje.

In deze proef werd nu nagegaan of een geschikte methode van ontmetting van oudere reeds generatieve planten kon worden gevonden, omdat mogelijkerwijs uit reeds generatief plantmateriaal wellicht gemakkelijker bloemen kunnen worden gevormd.

Wel mag men niet uit het oog verliezen, dat dit een zeer lange weg is, om tot orgaancultuur te komen. Aangezien dit toch geprobeerd dient te worden, omdat dit met de middelen die ons ter beschikking staan nog niet goed te verwezenlijken valt, is deze proef opgezet. Bovendien werd op deze wijze vaardigheid met dergelijk werk opgedaan.

Proefopzet

De volgende ontamettingen werden vergeleken.

1. Ontametten met 5% chloorkalk gedurende 15 minuten.
2. Ontametten met 5% chloorbleekloog gedurende 2 minuten.
3. Ontametten met 5% chloorbleekloog gedurende 5 minuten.
4. Ontametten met 5% chloorbleekloog gedurende 10 minuten.
5. Ontametten met 7½% chloorbleekloog gedurende 2 minuten.
6. Ontametten met 10% chloorbleekloog gedurende 2 minuten.
7. Eerst dopen in alcohol 70, daarna ontametten met 5% chloorbleekloog gedurende 2 minuten.
8. Ontametten met 5% chloorbleekloog + 0,1% Shell uitvloeier gedurende 2 minuten.

Behandeling 1 t/m 7 werden twee maal ingezet.

De eerste maal met tamelijk vers chloorbleekloog en de tweede maal met ouder spul, waarbij de concentratie werd aangepast aan de concentratie van de eerst gebruikte chloorbleekloog. Per behandeling werden 20 stukjes uitgeplant. Bij het verzamelen werden de snijvlakken met paraffine-olie afgesloten. Het ontametten vond plaats in erlemeyers van 150 ml met ingeslepen stop, waarin de stukjes weefsel gedurende de ontamettingstijd regelmatig werden geschud. Na het ontametten werd het materiaal 3 x in steriel aqua dest gespoeld, de geparaffineerde uiteinden werden afgesneden en het overige deel in stukjes van 1 cm gesneden. Deze stukjes hypocotyle-stengedelen werden liggend op de voedingsbodem geplaatst, omdat verondersteld werd, dat bij een beter contact van materiaal en bodem de kans op verontreinigingen groter zou zijn, indien het materiaal onvoldoende was ontamet.

Alle weefselstukjes werden op een bodem van gelijke samenstelling uitgelegd (zie bijlage 1). Per ontametting werden 20 buizen gebruikt, waarvan 10 alleen met een wattenprop en 10 met een wattenprop plus parafilm werden afgesloten. De laboratoriumwerkzaamheden werden door Brenda van Beek uitgevoerd.

### Resultaten

In deze proef ging het voornamelijk om twee punten, te weten :  
 een goede ontsmetting en  
 het zo goed mogelijk levend houden van het materiaal.

De ontsmetting was in de eerste serie ontsmettingen beter geëaald dan in de tweede serie. De oorzaak kan zijn, dat het verse loog een betere ontsmetting gaf dan het oudere loog, hoewel het werkzame chloor werd omgerekend.

Een andere mogelijke oorzaak kan zijn dat de drempel bij de tweede serie hoger lag, zodat een sterke ontsmetting was vereist. De diverse ontsmettingen geven bij de eerste serie meer verschillen te zien dan bij de tweede serie. De ontsmettingen waren het beste bij behandeling 2, 3 en 4 (= 5% chloorbleekloog gedurende respectievelijk 2, 5 en 10 minuten). Een langere ontsmettingsduur gaf geen betere ontsmetting. Verhoging van de concentratie (behandeling 2 ten opzichte van behandeling 5 en 6) verbeterde de ontsmetting niet, evenmin als de voorbehandeling met alcohol 70 of het toevoegen van 0,1% Shell uitvloeier aan de ontsmettingsvloeistof.

Bij de tweede serie proeven waken de uitkomsten sterk af ten opzichte van de eerste serie. Geen van de behandelingen gaf een voldoende ontsmetting. Ontsmetten met 5% chloorbleekloog was onvoldoende. De hogere concentraties (7½ en 10%) gaven iets betere resultaten evenals het van te voren in alcohol 70 dopen van de stukjes. De langere ontsmettingstijd leek niet beter dan de korte ontsmettingsduur.

Callus-groei kan na iedere hier gebruikte ontsmetting optreden. De meeste callusgroei trad op na ontsmetting met 5% chloorbleekloog gedurende korte tijd (= 2 minuten). Na een langere ontsmettingstijd werd minder callusgroei waargenomen en mogelijk gaf ook een hogere concentratie chloorbleekloog minder callusgroei evenals de voorbehandeling met alcohol 70.

Het afsluiten van de buizen met parafilm leek minder verontreinigingen te geven. Dit werd voornamelijk veroorzaakt door de betere afsluiting van de buis, waardoor minder „late“ verontreinigingen optreden. Dit komt ook tot uiting in het gemiddelde aantal dagen tussen uitplanten en verontreinigen. Voor de niet parafilm buizen was dit gemiddeld 20 en voor de parafilm buizen 17 dagen. Wel was de spreiding bij beide

groepen gelijk (bij beide werden na 76 dagen verontreinigingen waargenomen), zodat parafilm geen volledige preventie tegen late verontreinigingen geeft.

Voor de callusgroei was in deze proef het gebruik van parafilm duidelijk nadelig. Met parafilm kreeg men slechts  $\frac{1}{7}$  van het aantal stukjes dat callus vormde;  $\frac{1}{35}$  dat wortel vormde, maar 14 x zoveel verblekingen. Bij dit verbleken zag men het weefsel soms eerst lichtgroen, soms direkt wit worden.

Dergelijke stukjes gaven geen groei te zien en men kreeg de indruk met „geschloreerd“ weefsel te maken te hebben. De oorzaak kan mogelijk het volgende zijn.

- Wellicht was na het ontmetten en uitwassen nog iets chloor op het weefsel achtergebleven.

Bij de niet met parafilm afgesloten buizen, zou na verloop van tijd deze chloorepoortjes uit de buizen door de wattenprop kunnen verdampen. Mogelijk zou de parafilm deze chloordamp tegenhouden, zodat de inwerkingstijd bij deze groepen langer was. Dit kan dan eventueel de ontsmetting verbeteren, maar tevens ging de chloor door de langere inwerkingstijd nu fytotoxisch op het weefsel werken met het hier gerangiateerde nare gevolg van verbleking. Dit nadelige effect van de parafilm is misschien te ondervangen door de parafilm op een later tijdstip na het uitplanten aan te brengen als men vermoedt, dat de chloor volledig „vertrokken“ is.

In bijlage 2 zijn de verwerkte gegevens opgenomen.

In bijlage 3 zijn 3 foto's opgenomen. Eén geeft een beeld van zo een uitgebleekt weefsel-stukje na parafilm afsluiting.

De overige 2 foto's geven een beeld van de callus-wortel en spruitvorming, die men soms zag optreden. Hierbij is duidelijk te zien, dat de stukjes met „groei“ donkerder van kleur waren. Deze waren niet alleen donkergroen, maar vertoonden soms een bruin- of paarskleuring. Deze verkleuringen leken niet nadelig te zijn.

Samenvatting en conclusie

Uit deze proef is geen geschikte ontzetting naar voren gekomen.  
Er zal dus met andere concentraties, tijden en middelen moeten  
worden geëxperimenteerd.

Parafilm-afsluiting werkte verblekend en dodend op het weefsel.  
Hierbij trad weinig callus en wortelgroei op.

Parafilm bij dergelijke proeven óf achterwege laten óf pas in  
een later stadium aanbrengen.

De proefneemster,

Wil van Ravestijn.

Naaldwijk, 19 februari 1971

No. 403/1971.

Bijlage 1

Samenstelling voedingsbodem

I	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	500 mg/l
	$\text{KNO}_3$	125 mg/l
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	125 mg/l
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	125 mg/l
	Fedta (5 mg $\text{Fe}^{+++}$ /ml)	0,6 ml/l
	Thianine (aneurine-hydrochloride of vit. B <sub>1</sub> )	1 mg/l
	L.cysteïne hydrochloride	10 mg/l
	Saccharose	30.000 mg/l

Per liter van bovengenoemde oplossing

1 ml van de volgende sporenelementen-oplossing

$\text{MnSO}_4 \cdot 1 \text{H}_2\text{O}$	2.540 mg/l
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	500 mg/l
$\text{H}_3\text{BO}_3$	500 mg/l
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	25 mg/l
$\text{Na}_2 \text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	25 mg/l
$\text{H}_2\text{SO}_4$ s.g. 1,83	0,5 ml/l

pH serie I : 4,14

pH serie II : 4,10

Stollen met 1% Bacto-agar

Stereliseren op 1 atm. gedurende 15 minuten.

Preppen afsluiten met Aluminiumfolie.

Verontrainingen			Cal- lus	wortel	licht- groen wit	bruin- peers	Plantjes	
aan- atalsidagen	gem. minu- mum	maxi- mum					buie	aantal

t.o.v. 10 buizen

1<sup>e</sup> Serie

1	7	22	5	54	0	0	8	8	0	0
+P	4	19	5	40	0	0	9	0	0	0
2	2	22	9	34	8	2	0	1	1	+
+P	2	20	13	27	0	0	10	0	0	0
3	2	31	27	34	10	2	0	1	0	0
+P	1	20	20	20	0	0	10	0	0	0
4	5	23	6	48	3	1	0	7	0	0
+P	0				0	0	10	0	0	0
5	4	7	5	12	5	3	0	3	0	0
+P	3	21	8	47	0	0	9	0	0	0
6	6	20	5	40	4	4	0	5	0	0
+P	3	24	5	40	0	0	9	0	0	0
7	3	24	19	26	6	1	0	7	0	0
+P	4	27	8	47	0	0	7	2	0	0
8	7	20	5	40	4	2	1	5	0	0
+P	2	7	5	8	0	0	9	0	0	0

2<sup>e</sup> Serie

t.o.v. 10 buizen

1	6	19	6	55	10	3	0	0	1	2
+P	6	16	6	27	0	0	8	0	0	0
2	7	14	6	42	7	2	0	0	0	0
+P	9	16	6	55	10	0	8	0	0	0
3	8	13	5	27	7	2	0	0	0	0
+P	8	11	6	20	2	0	6	0	0	0
4	6	19	6	76	6	2	0	0	0	0
+P	9	23	6	76	1	0	5	0	0	0
5	7	13	5	35	9	4	0	0	0	0
+P	3	14	12	19	1	0	10	0	0	0
6	2	23	19	26	10	3	0	0	0	0
+P	6	16	5	26	0	0	8	0	0	0
7	5	33	5	75	8	4	0	0	0	0
+P	3	14	12	19	0	1	8	0	0	0

1<sup>e</sup> Serie - en + P tezamen

t.o.v. 20 buizen

1	11	21	5	54	0	0	17	8	0	0
2	4	21	9	34	8	2	10	1	1	+
3	3	27	20	34	10	2	10	1	0	0
4	5	23	6	48	3	1	10	7	0	0
5	7	13	5	47	5	3	9	3	0	0
6	9	21	5	40	4	4	9	5	0	0
7	7	25	8	47	6	1	7	9	0	0
8	9	17	5	40	4	2	10	5	0	0

2<sup>e</sup> Serie - en + P tezamen

t.o.v. 20 buizen

1	12	16	6	55	10	3	8	0	1	2
2	16	15	6	55	17	2	8	0	0	0
3	16	12	5	27	9	2	6	0	0	0
4	15	21	6	76	7	2	5	0	0	0
5	10	14	5	35	10	4	10	0	0	0
6	8	18	5	26	10	3	8	0	0	0
7	8	26	5	75	8	5	8	0	0	0



Verontreinigingen					Cal- lus	Wor- tel	licht- groen/ wit	bruin- pears	Plantjes	
Aan- tal	Gem. dagen	Mini- mum	Maxi- mum	Buis					aan- tal	
<u>1<sup>e</sup> en 2<sup>e</sup> Serie in - en + P tezamen</u>					<u>ten opzichte van 40 buizen</u>					
1	23	19	5	55	10	3	25	8	1	2
2	20	18	6	55	25	4	18	1	1	± 1
3	19	20	5	34	19	4	16	1	0	0
4	20	22	6	76	10	3	15	7	0	0
5	17	14	5	47	15	7	19	3	0	0
6	17	20	5	40	14	7	17	5	0	0
7	15	26	5	75	14	6	15	9	0	0

-----

Invloed parafilm

Zonder parafilm t.o.v. 80 buizen

Serie 1 56 21 5 54 40 15 9 37 1 1

Zonder parafilm t.o.v. 70 buizen

Serie 2 41 19 5 76 57 20 0 0 1 2

Zonder parafilm t.o.v. 150 buizen

Totaal 77 20 5 76 97 35 9 37 2 3

Met parafilm ten opzichte van 80 buizen

Serie 1 19 17 5 47 0 0 73 2 0 0

Met parafilm ten opzichte van 70 buizen

Serie 2 44 16 5 76 14 1 53 0 0 0

Met parafilm ten opzichte van 150 buizen

Totaal 63 17 5 76 114 1 126 2 0 0

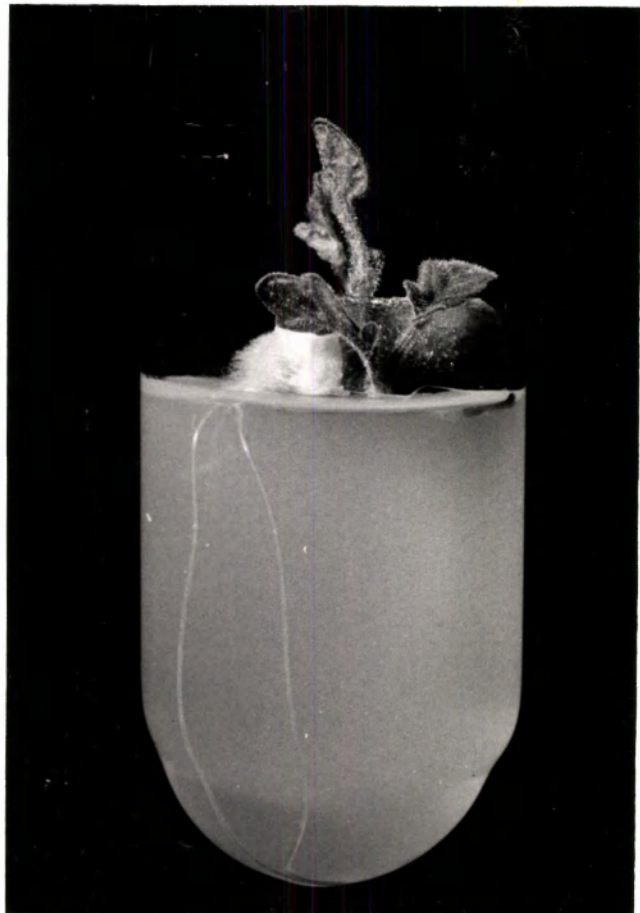
Bijlage 3



Behandeling 1 met  
parafilm.  
Uitgeplant op 4 maart,  
gefotografeerd op  
19 mei



Behandeling 7 zonder para-  
film.  
Uitgeplant op 5 maart, gefoto-  
grafeerd op 19 mei •  
Callus + wortels.



Behandeling 1 zonder parafilm.  
Uitgeplant op 4 maart  
Gefotografeerd op 19 mei ,  
Callus, wortel + spruitgroei (2 stuks)

## Bijlage 4

## Temperatuurgegevens in °C

	9 uur		2 uur	
	Maximum	Minimum	Vloeistof	Vloeistof
	Index			
1 <sup>e</sup> dec. februari 1969	21,5	18,0	18,0	20,8
2 <sup>e</sup> dec. februari 1969	20,1	14,9	16,4	20,1
3 <sup>e</sup> dec. februari 1969	20,8	14,3	14,5	20,9
1 <sup>e</sup> dec. maart 1969	21,4	14,5	15,6	21,0
2 <sup>e</sup> dec. maart 1969	21,3	15,9	16,6	21,4
3 <sup>e</sup> dec. maart 1969	22,2	15,9	16,5	21,7
1 <sup>e</sup> dec. april 1969	24,8	18,1	18,8	22,6
2 <sup>e</sup> dec. april 1969	24,3	18,3	18,2	23,0
3 <sup>e</sup> dec. april 1969	24,7	18,7	19,1	24,5
1 <sup>e</sup> dec. mei 1969	27,3	20,3	20,6	26,6
2 <sup>e</sup> dec. mei 1969	29,6	21,1	21,8	28,5