

Vegetatieve vermeerdering van asparagus setaceus (plumosus) in vitro.

Door:

W. van Ravestijn.



Vegetatieve vermeerdering van asparagus setaceus (plumosus) in vitro.

Proef II

Project: C -4

Tijd : juli 1973 - september 1974

Uitvoering: Francisca Wubben.

Proefneemster: Wil van Ravestijn.

INLEIDING

In deze proef wordt naar een methode gezocht om snijgroen (*Asparagus setaceus*) in vitro vegetatief te vermeerderen. Oriënterend is een scala van mogelijkheden afgetast. Er is steeds uitgegaan van:

- a. Stengelstukjes met doornen. Dit zijn in feite knoppen.
- b. Uitgeprepareerde groeipunten uit deze knoppen.

PROEFOPZET

In deze proef zijn onderzocht:

- a. Bij de stengelstukjes met doornen de samenstelling van de bodem en het gebruik van parafilm
- b. Bij de groeipunten uit deze droonknoppen de invloed van licht, temperatuur, samenstelling van het medium en parafilm.

In totaal zijn de volgende 44 behandelingen vergeleken. 1' t/m 30 groeipunten, 31 t/m 44 knoppen al dan niet met doorn en stengel).

TEMPERATUUR

1. Bodem I, laagste temperatuur serie-thermostaat ($\pm 15^{\circ}\text{C}$).
2. Bodem I, 2e afdeling seriethermostaat.
3. Bodem I, 3e afdeling seriethermostaat.
4. Bodem I, 4e afdeling seriethermostaat.
5. Bodem I, 5e afdeling seriethermostaat.
6. Bodem I, 6e afdeling seriethermostaat. ($\pm 30^{\circ}\text{C}$).

LICHT

7. Bodem I, kapje 4 planteziektenkas, zonder gaas
8. Bodem I, kapje 4 planteziektenkas, 1 laag gaas
9. Bodem I, kapje 4 planteziektenkas, 2 lagen gaas
10. Bodem I, kapje 4 planteziektenkas, 3 lagen gaas

MEDIUM

11. Bodem I
12. Bodem II
13. Bodem I, inplaats van 0,3 slechts 0,03 mg/l NAA
14. Bodem I, inplaats van 0,3 echter 3 mg/l NAA
15. Bodem I, inplaats van 0,1 slechts 0,01 mg/l kinetine
16. Bodem I, inplaats van 0,1 echter 1 mg/l kinetine
17. Bodem II, inplaats van 0,3 slechts 0,03 mg/l NAA
18. Bodem II, inplaats van 0,3 echter 3 mg/l NAA
19. Bodem II, inplaats van 0,1 slechts 0,01 mg/l kinetine
20. Bodem II, inplssta van 0,1 echter 1 mg/l kinetine

VLOEIBARE MEDIA

21. Bodem I, zonder agar
22. Bodem van behandeling 13 zonder agar
23. Bodem van behandeling 14 zonder agar
24. Bodem van behandeling 15 zonder agar
25. Bodem van behandeling 16 zonder agar
26. Bodem II zonder agra
27. Bodem van behandeling 17 zonder agar
28. Bodem van behandeling 18 zonder agar
29. Bodem van behandeling 19 zonder agar
30. Bodem van behandeling 20 zonder agar

STENGELSTUKJES MET DOORN

31. Bodem I
32. Bodem I, in plaats van 0,3 echter 0,6 mg/l NAA
33. Bodem I, in plaats van 0,3 echter 0,9 mg/l NAA
34. Bodem I, in plaats van 0,3 echter 1,2 mg/l NAA
35. Bodem I, in plaats van 0,3 echter 1,5 mg/l NAA
36. Bodem II
37. Bodem II, in plaats van 0,3 echter 0,6 mg/l NAA
38. Bodem II, in plaats van 0,3 echter 0,9 mg/l NAA
39. Bodem II, in plaats van 0,3 echter 1,2 mg/l NAA
40. Bodem II, in plaats van 0,3 echter 1,5 mg/l NAA

KNOPPEN ZONDER SCHUB EN STENGEL

41. Bodem I

42. Bodem II

43. Bodem I, knop 1 t/m 10 (1 is bovenste, 10 is onderste doorn)

44. Bodem II, knop 1 t/m 10 (1 is bovenste, 10 is onderste doorn)

De samenstelling van bodem I en II is in bijlage 1 opgenomen.

Gebruikt zijn Pyrex buizen (15,5 x 1,5 cm) voor behandeling 1 t/m 20.

Per behandeling 20 buizen, waarvan 10 met en 10 zonder parafilm afdekking.

Voor behandeling 21 t/m 30 zijn Pyrex erlemeyer van 100 ml gebruikt.

Per erlemeyer 50 ml oplossing en 5 groeipunten. De kweken zijn continu geschud met een snelheid van 100 r.p. min.

Voor behandeling 31 t/m 44 zijn Pyrex buizen van 15,5 x 2,5 cm gebruikt.

Per behandeling 20 (31 t/m 40) of 10 (41 t/m 44) buizen. Worden 20 buizen gebruikt, dan de helft met parafilm afdekken, zo niet dan alles met parafilm afsluiten. Bij behandeling 31 t/m 40 is zowel "liggend" als "staand" geplant. In het laatste geval met de doorn naar beneden.

UITVOERING

Er is ontsmet met 0,5% werkzaam chloor uit handelsbleekwater met 0,1% Tee-pol. Per ontsmetting zijn knoppen van 3 ranken gebruikt. Dit zijn ± 36 explantaten. Deze 36 explantaten zijn in 200 ml ontsmettingsvloeistof gedurende 10 minuten geschud. Na het ontsmetten is 3 x met steriel demi-water uitgespoeld. De stukjes bleven in het laatste spoelwater tot het uitplanten.

RESULTATEN

Temperatuursinvloed (behandeling 1 t/m 6)

De temperaturen gemiddeld per decade zijn in bijlage 2 opgenomen. Globaal was de temperatuurreeks als volgt: 14-17-18-21-23 en 26°C.

Er is nauwelijks enige groei opgetreden. In afdeling 4 (21°C) is enige scheutgroei waargenomen.

Bij geen van de behandelingen is wortelvorming geconstateerd.

Lichtinvloed (behandeling 7 t/m 10)

Alle bodems zonder parafilm waren na één maand verdroogd. Er zijn geen verontreinigingen opgetreden. Scheut- en wortelvorming zijn niet waargenomen.

Invloed bodem (11 t/m 20)

Verontreinigingen zijn weinig opgetreden. Op bodem I (behandeling 13 t/m 16) in het geheel niet, op bodem II (behandelingen 12 en 17 t/m 20) maximaal 15%. Wortelvorming is nergens opgetreden, wel scheutgroei. In onderstaande tabel

is de scheutvorming in procenten weergegeven.

Tabel 1. Percentagers explantaten met spruitvorming op bodem I en II.
Invloed kinetine, NAA en parafilm.

Conc. kin	mg. l-1 NNA	Bodem I			Bodem II		+- P	Totaal
		+ P	-P	P	+ P	- P		
0,10	0,30 x	0	0	0	20	20	20	10
0,10	0,03	60	40	50	0	0	0	25
0,10	3,00	10	50	30	0	0	0	15
0,01	0,30x	0	10	5	0	0	0	2,5
1,00	0,30x	55.6	100	78,9	20	50	35	56.5
Gem.		24,5	40	32,3	8	14	11	

Bodem I voldoet beter dan bodem II. Globaal genomen geeft een hoge verhouding kinetine ten opzichte van auxine (respectievelijk 1 mg en 0,30 mg/l) meer scheuten, vooral bij bodem I. Parafilm is nadelig. Het reduceerde in dit geval het percentage uitgroei met de helft. Voor de volledige gegevens, zie bijlage 3.

Vloeibare media (behandeling 21 t/m 30)

Deze kweken moesten geschud worden. Aangezien het schudapparaat consequent weigerde lange tijd achtereen te werken, moet dit onderdeel van de proef als mislukt worden beschouwd. Enige groei leek op te treden bij alle media. Een invloed van de media en de conc van de regulatoren kan echter niet getrokken worden.

Stengelstukjes (behandeling 31 t/m 40)

In dit deel van de proef zijn veel verontreinigingen opgetreden, zodat dit gedeelte van de proef opnieuw in begin 1974 is uitgeplant. De resultaten van beide inzetten tezamen is als volgt:

Bij de eerste inzet is slechts bij 6,1% van de niet verontreinigde explantaten enige spruitgroei opgetreden, bij de tweede inzet is geen spruitgroei waargenomen.

De spruitgroei trad op bij behandeling 31 en 34 (respectievelijk 15,4 en 16,7 % spruiten). Bij behandeling 31 evenveel bij de "liggende" als bij de "staande" explantaten en evenveel bij zonder als met parafilm. Bij behandeling 34 betrof deze 16,7% slechts één explantaat. Deze was "staande" en met parafilm afgedekt. Bij de eerste inzet is geen callusvorming opgetreden, bij de tweede inzet wel (33.2% over de gehele proef berekend). Zonder parafilm gaf 38.7 % callusvorming, met parafilm 29.3%. Liggend geplant gaf 30.0% callusgroei, staand 36.3%.

De invloed van de NAA concentratie op het percentage explantaten met callusgroei op de beide media was als volgt:

Tabel II. Percentage explantaten met callusgroei. Invloed NAA concentratie, berekend over "liggend" en "staand" planten en wel en niet afdekken met parafilm.

NAA mg/l	Bodem I	Bodem II
0,3	0	29.4
0,6	0	70.6
0,9	0	50.0
1,2	20.0	50.0
1,5	78.9	23.8

Bij bodem II dus gemiddeld meer callusvorming dan op bodem I. Bij bodem I alleen callusvorming bij 1,2 of 1,5 mg/l NAA. De hoogste concentratie geeft het hoogste percentage explantaten met callusvorming.

Bij bodem II een optimale callusvorming bij 0,6 mg/l. Door hogere concentraties (0,9 en 1,2 mg/l) is de callusvorming ongeveer 1/3 minder, bij de laagste en de hoogste concentratie ongeveer 2/3 minder. De optimale NAA conc is dus sterk afhankelijk van het gebruikte medium.

Alleen de knop uitplanten (behandeling 41 t/m 44)

De knoppen zonder steeltje en zonder puntvormige schub zijn uitgeplant op bodem I (behandeling 41) of bodem II (behandeling 42). Tevens is de invloed onderzocht van de plaats aan de stengel van de knop. ("hoog" of "laag") in behandeling 43 en 44. Aangezien beide behandelingen veel verontreinigingen vertoonden (respectievelijk 85 en 65%) en de niet verontreinigde explantaten geen uitgroei vertoonden, vervalt dit laatste onderdeel.

Het uitplanten van alleen de knop gaf op bodem I 38,1% scheutgroei, op bodem II 10,5%. Ten opzichte van de volledige stengelstukjes (respectievelijk behandeling 31 en 36 was respectievelijk 15,4 en 0% scheut groei), een duidelijke verbetering. De invloed van het al dan niet afdekken met parafilm was niet groot (respectievelijk 30,0 en 10,0% voor geen en 50,0 en 11,1% voor wel parafilm), maar men krijgt toch de indruk, dat zonder parafilm afdekking wat gemakkelijker scheutgroei optreedt, wellicht door een betere zuurstof voorziening.

SAMENVATTING EN CONCLUSIE

Om plantjes uit groeipunten, knoppen of stengelstukjes met knop te krijgen is een scala aan mogelijkheden onderzocht. Helaas is in geen enkel geval een volledige plant ontstaan. Wel is scheut- en callusgroei waargenomen. Voor de groeipunten geldt:

1. Van de onderzochte temperatuurreeks 14-17-18-21-23 en 27°C voldoet de temperatuur omstreeks 21°C het beste.
2. De lichtinvloed (intensiteit) heeft geen informatie gegeven.
3. Over alle concentraties groeiregulatoren gemiddeld voldoet bodem I beter dan bodem II. Niet afdekken met parafilm is iets beter dan wel afdekken met parafilm. De invloed van de NAA concentratie tussen 0,03 en 3,0 mg/l is niet duidelijk. Kinetine verbetert de spruitgroei bij toenemende conc (van 0,01 tot 1 mg/l).
4. Vloebare media kunnen door ons niet onderzocht worden door het ontbreken van geschikte apparatuur.

Voor de stengelstukjes en de knoppen geldt:

1. In deze proef meer scheutgroei bij knoppen dan bij stengelstukjes.
2. Callusgroei is regelmatig bij de stengelstukjes opgetreden. De NAA invloed wordt mede bepaald door het medium. Op bodem I geeft de hoogste NAA conc (= 1,5 mg/l) het grootste percentage callusgroei, bij bodem II 0,6 mg/l NAA.

Bodem I
(voor 10 l gebruiksopl.afw. in mg)

NH ₄ NO ₃	4000	} 500 ml	} 2 l
K Cl	650		
KNO ₃	800		
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	1440		
Mg SO ₄ ·7H ₂ O	720		
K H ₂ PO ₄	125		
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	1700		
H ₃ BO ₃	16		
MnSO ₄ ·4H ₂ O	65		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	27	} 500 ml	
K J	7,5		

Bodem II
(voor 10 l gebruiksopl. afw. in mg)

NH ₄ NO ₃	16500	} 500 ml	} 2 l
KNO ₃	19000		
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	4400		
Mg SO ₄ ·7H ₂ O	3700	→ 500 ml	
K H ₂ PO ₄	1700	→ 500 ml	
H ₃ BO ₃	62	} 500 ml	
MnSO ₄ ·4H ₂ O	223		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	110		
K J	8,3		
Na ₂ Mo O ₄ ·2H ₂ O	2,5	} 500 ml	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,25		
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,25		

Adenine sulfaat dihydr.	100	} 50 ml
Nicotinezuur	125	
Thiamine HCl	25	
Pyridoxine HCl	125	

Glycine	50	} 50 ml
Nicotinezuur	12,5	
Thiamine	2,5	
Pyridozine HCl	12,5	

* Verdelen in proties van 2,5 ml in kleine afsluitbare buisjes. Deze bewaren in de diepvries.

Bereiding gebruiksopl. (1l)

Bodem I

Anorganische zouten	200 ml
Vitaminen enz. oplos.	2 ml
Meso-inositol	100 mg
Mout extract (Difco)	500 mg
Fe Na EDTA	5 ml
Saccharose	25000 mg
NAA(bodem I 0,3 mg/l + zie schema)	
Kinetine (6-furfurylamino purine)	
(bodem I 0,1 mg/l + zie schema)	
pH	5.7
Agar (alleen voor bodems)	
(Difco Bacto)) 6000 mg

Bereiding gebruiksopl. (1l)

Bodem II

Anorganische zouten	200 ml
Vitaminen enz. oplos.	2 ml
Meso-inositol	100 mg
Caseïne-hydrolysaat	1000 mg
Fe Na EDTA	5 ml
Saccharose	25000 mg
NAA(bodem II 0,3 mg/l + zie schema)	
Kinetine (6 furfurylamino purine)	
(bodem II 0,1 mg/l + zie schema)	
pH	5.7
Agar (alleen voor bodems)	
(Difco Bacto)) 8000 mg

Steriliseren 15 min. bij 120°C

Bodem I en II

Kinetine	0,1 mg/l
N.A.A.	0,3 mg/l

Bijlage 2.

Temperatuur in °C per decade in de kleine seriethermostaat.

Vak no	1	2	3	4	5	6
Themo No	4	27	30	23	35	39
1e dec. juli 73	14.0	18.2	20.2	22.6	24.7	27.4
2e dec. juli 73	13.8	18.0	19.8	22.4	24.3	27.1
3e dec. juli 73	14.0	17.9	19.6	22.0	24.0	26.7
1e dec. aug. 73	13.7	18.1	19.8	22.4	24.3	27.0
2e dec. aug. 73	14.1	18.3	20.3	22.9	24.7	27.2
3e dec. aug. 73	14.0	17.8	19.5	22.1	24.1	26.9
1e dec. sept. 73	14.1	18.1	20.0	22.4	24.5	27.1
2e dec. sept. 73	13.8	17.5	19.2	21.8	23.8	26.8
3e dec. sept. 73	13.5	16.7	18.2	20.8	22.9	26.2
1e dec. okt. 73	13.7	16.6	18.1	20.6	22.9	26.4
2e dec. okt. 73	13.5	16.0	17.3	19.6	22.0	25.8
3e dec. okt. 73	13.4	16.0	17.4	19.8	22.3	26.1
1e dec. nov. 73	13.6	15.9	17.2	19.6	22.0	25.9
2e dec. nov. 73	13.5	15.7	16.5	18.8	21.0	24.5
3e dec. nov. 73	13.4	14.8	15.7	17.6	20.0	23.9
1e dec. dec. 73	13.2	14.7	15.6	17.3	18.9	22.0
2e dec. dec. 73	13.4	15.0	16.1	18.0	19.5	22.5
3e dec. dec. 73	13.5	15.2	16.1	18.2	19.7	22.8
Totaal gem.	13.7	16.7	18.1	20.5	22.5	25.7

Bijlage 3

	Conc. in d.p.m. kinetine N.A.A.		Verontreiniging bereke- ning %		Scheutv. bereke- ning %		Bruinkl. bereke- ning %	
11. Bodem I + p	0,1	0,3	0/10	0	0/10	0	0/10	0
- P	0,1	0,3	0/10	0	0/10	0	0/10	0
Tot. gem.	0,1	0,3	0/20	0	0/20	0	0/20	0
12. Bodem II + P	0,1	0,3	1/10	10	2/10	20	4/10	40
- P	0,1	0,3	2/10	20	2/10	20	7/10	70
Tot. gem.	0,1	0,3	3/20	15	4/20	20	11/10	55
13. Bodem I + P	0,1	0,03	0/10	0	6/10	60	6/10	60
- P	0,1	0,03	0/10	0	4/10	40	5/10	50
Tot. gem.	0,1	0,03	0/20	0	10/20	50	11/10	55
14. Bodem I + P	0,1	3,0	0/10	0	1/10	10	3/10	30
- P	0,1	3,0	0/10	0	5/10	50	6/10	60
Tot. gem.	0,1	3,0	0/20	0	6/20	30	9/20	45
15. Bodem I + P	0,01	0,3	0/10	0	0/10	0	0/10	0
- P	0,01	0,3	0/10	0	1/10	10	3/10	30
tot. gem.	0,01	0,3	0/20	0	1/20	5	3/20	15
16. Bodem I + P	1,0	0,3	0/10	0	5/9	55,6	4/9	44,4
- P	1,0	0,3	0/10	0	10/10	100	9/10	90,0
Tot. gem.	1,0	0,3	0/20	0	15/19	78,9	13/19	68,4
17. Bodem II + P	0,1	0,03	0/10	0	0/10	0	1/10	10,0
- P	0,1	0,03	0/10	0	0/10	0	0/10	0
tot. gem.	0,1	0,03	0/20	0	0/20	0	1/20	5
18. Bodem II + P	0,1	3,0	0/10	0	0/10	0	0/10	0
- P	0,1	3,0	0/10	0	0/10	0	0/10	0
tot.gem.	0,1	3,0	0/20	0	0/20	0	0/20	0
19. Bodem II + P	0,01	0,3	0/10	0	0/10	0	2/10	20
- P	0,01	0,3	0/10	0	0/10	0	1/10	10
tot. gem.	0,01	0,3	0/20	0	0/20	0	3/20	15
20. Bodem II + P	1,0	0,3	1/10	10	2/10	20	8/10	80
- P	1,0	0,3	1/10	10	5/10	50	7/10	70
Tot.gem.	1,0	0,3	2/20	10	7/20	35	15/20	75