

cb

ibliotheek
oefstation
Naaldwijk

A
1
R
22

Proefstation voor de Groenten- en Fruitteelt onder Glas te Naaldwijk

BIBLIOTHEEK
PROEFSTATION voor de GROENTEN- en
FRUITTEELT onder GLAS te NAALDWIJK

Ontsmetten van *Asparagus plumosis*-stengel-
stukjes in verband met het opzetten van
in vitro-culturen.

door :

ing. W. van Ravestijn

A
-
R
22

120 : 84
Stamboek no.
9091.

Proefstation voor de Groenten- en Fruitteelt onder Glas, Naaldwijk

Ontsmetten van *Asparagus plumosus*-stengelstukjes
in verband met het opzetten van in vitro-culturen.

door :

ing. W^a. van Ravestijn

Naaldwijk, september 1975.

No. 702/9/1975.

2234998

Plaats : Orchideeën-thermostaat
Tijd : 25 oktober 1973 - 18 januari 1975.
Project : C-4.

Inleiding

Gezocht wordt naar een snelle en goede vegetatieve vermeerdering van *Asparagus plumosus*. Een van de mogelijkheden hiertoe is het opzetten van in vitro-culturen. Daarbij kan men denken aan :

1. Meristeen-culturen
2. Plantvorming via callus
3. Plantvorming direkt uit explantaten met vegetatieve knoppen.

Voor al deze werkwijzen, in het bijzonder voor de onder punt 2 en 3 genoemde, is een goede ontsmetting noodzakelijk. In de hieronder beschreven proefjes is de ontsmetting van stengelstukjes onderzocht.

Proefopzet

Ontsmet werden stengelstukjes van veren met "doornknoppen". Ontsmet werd met chloorbleekloog (NaClO_3).

In Proefje I werden de volgende ontsmettingen vergeleken.

1. 0,3% werkzaam NaClO_3 (circa 0,15% Cl_2) + 0,1% Teepol
2. 0,6% werkzaam NaClO_3 + 0,1% Teepol
3. 1,2% werkzaam NaClO_3 + 0,1% Teepol
4. 2,5% werkzaam NaClO_3 + 0,1% Teepol
5. 5% werkzaam NaClO_3 + 0,1% Teepol
6. 10% werkzaam NaClO_3 + 0,1% Teepol

De stengelstukjes werden steeds 10 minuten in de ontsmettingsvloeistof geschud. Daarna werd 3 x met steriel demi-water gespoeld. Voor het planten werden explantaten tussen filtreerpapier gedroogd. Er werd

steeds "staand" geplant met de "doorn" naar beneden.

Per behandeling werden circa 16 buizen gebruikt. De buizen werden met watten en parafilm afgesloten. De samenstelling van de bodem geeft bijlage 1.

De proef liep van 25/26 oktober 1973 tot 25 april 1974.

Alle explantaten stonden in de orchideeën-thermostaat (zie bijlage 2 voor temperatuur gegevens).

Resultaten

Proefje I.

Concentratie NaClO	Percentage verontreinigd	Percentage		Gemiddeld aantal dagen na planten verontreinigd	Percentage uitgroei *	Gemiddeld aantal dagen na planten uitgroei
		Schimmel	Bacterie			
0,3%	100	93,8	6,3	4	0	-
0,6%	100	93,8	6,3	4	0	-
1,2	100	100	10	4	0	-
2,5	62,5	90	10	3	100	17(10-31)
5	66,7	66,7	33,3	6	66,7	10(10-10)
10	61,1	63,6	36,4	6	80	12(10-17)

* de verontreinigde niet meegeteld.

De uitgroei bestond uitsluitend uit scheutvorming. Soms konden uit één doornknop meer dan één scheutje ontstaan, vooral als de eerst gevormde scheut (hoofdscheut) werd verwijderd. Er werden echter tot op heden nooit meer dan drie scheuten totaal per "doorn" gevormd (dus behalve de hoofdscheut, 2 zijscheuten). Geen der scheuten groeide verder uit. Op 22 april 1974 waren alle gevormde scheuten bruin, ondanks het overplanten op een verse bodem.

Conclusie

Proefje I.

De ontsmetting was volkomen ontoereikend. Scheutvorming is mogelijk. Na verloop van tijd sterven de scheuten echter af, wellicht o.a. veroorzaakt door het achterwege blijven van wortelvorming.

Proefopzet

Proefje II.

In dit proefje werden drie behandelingen van Proef I herhaald. Boven- dien werden oriënterend drie bodems vergeleken.

De concentraties chloorbleekloog waren 0,3 - 2,5 en 10% (respec- tievleijk behandelingen 1, 4 en 6 van Proef I. De drie bodems waren als volgt :

- I. Voedingsbodem volgens recept in bijlage 3 met 1 mg/liter B.A. en 1 mg/liter N.A.A.
- II. Voedingsbodem volgens recept in bijlage 4 met 1 mg/liter B.A. en 1 mg/liter N.A.A.
- III. Als bodem I., maar met een 10-voudige hoeveelheid mout-extract dus(5 gram/liter), zonder B.A. en N.A.A.

Resultaten

Ontsmetting	Bodem	Verontreinigd			Aantal dagen		
		%	waarvan :		gemid- deld	maximum	minimum
			schimmel	bacterie			
0,3%	I	50	75	25	6,8	12	5
	II	38	100	0	5,0	5	5
	III	25	50	50	10,0	10	10
Gemiddeld 0,3%		37	78	22	6,9	12	5
2,5%	I	38	100	0	28,3	75	5
	II	38	67	33	7,3	12	5
	III	25	50	50	27,5	45	10
Gemiddeld 2,5%		34	75	25	20,3	75	5
10%	I	13	100	0	5,0	5	5
	II	50	75	25	38,3	75	5
	III	13	100	0	10,0	10	10
Gemiddeld 10%		25	83	17	28,0	75	5
Gemiddeld	I	34	88	12	14,6	75	5
Gemiddeld	II	42	80	20	19,0	75	5
Gemiddeld	III	21	60	40	17,0	45	10

De ontsmetting was volkomen ontoereikend. De invloed van de concentratie van het chloorbleekloog was gering. Bodem I en II leken meer verontreinigingen te geven dan bodem III.

Ontsmetting	Bodem	Scheutvorming				Callusvorming			
		%	aantal dagen			%	aantal dagen		
			gem.	min.	max.		gem.	min.	max.
0,3%	I	12,5	19	19	19	37,5	75	75	75
	II	0	0	-	-	37,5	80	75	89
	III	0	0	-	-	0	-	-	-
Gemiddeld 0,3%		4,2	19	19	19	25,0	77	75	89
2,5%	I	0	0	-	-	0	-	-	-
	II	0	0	-	-	0	-	-	-
	III	25,0	66	45	87	0	-	-	-
Gemiddeld 2,5%		8,3	66	45	87	0	-	-	-
10%	I	0	0	-	-	12,5	47	47	47
	II	12,5	159	159	159	0	-	-	-
	III	0	0	-	-	0	-	-	-
Gemiddeld 10%		4,2	159	159	159	4,2	47	47	47
Gemiddeld I		4,2	19	19	19	16,7	68	47	75
Gemiddeld II		4,2	159	159	159	12,5	80	75	87
Gemiddeld III		8,3	66	45	87	0	-	-	-

In deze proef trad nauwelijks scheutvorming op. Dat een hogere concentratie chloorbleekloog minder scheutvorming kon geven, kwam bij de gebruikte concentratie niet tot uiting. Mogelijk gaven de hogere concentraties chloorbleekloog wel aanleiding tot minder callusvorming.

De invloed van de bodems was ten aanzien van de schutvorming in deze proef van weinig belang. Callusvorming werd uitsluitend bij bodem I en II gevonden. Dit was vermoedelijk de invloed van de toegevoegde groei-regulators. Ongeveer 159 dagen na het inzetten van de proef werden alle explantaten weggegooid. De meeste waren toen bruin tot zwart verkleurd.

Conclusie

De hier gebruikte ontsmettingen waren volkomen ontoereikend. Hoewel de bodems weinig tot zeer weinig uitgroei van de explantaten te zien gaven, kan vermoedelijk door het toevoegen van o.a. diverse regulatoren hierin nog wel verbetering worden gebracht. De sterke verontreiniging en de slechte uitgroei kunnen wellicht ook samenhangen met de tijd van het jaar.

Proefje III.

Dit proefje werd voortijdig afgebroken in verband met de opzet van een wat grotere proef en door het gebruik van handelsbleekloog, dat van betere kwaliteit bleek te zijn, dan het chloorwater van de chemicaliën-firma's. Voor de ontsmetting werden de te ontsmette plantedelen eerst in alcohol 70 of alcohol 96 gedoopt. Daarna werd gedurende 10 minuten met slechts 0,3% chloorbleekloog ontsmet. Bij deze twee werkwijzen trad 10% verontreiniging op. In dit geval uitsluitend schimmelverontreiniging.

Bijlage 1

$\text{NH}_4 \text{NO}_3$	400 mg/liter
KCl	65 mg/liter
KNO_3	80 mg/liter
$\text{KH}_2 \text{PO}_4$	12,5 mg/liter
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	144 mg/liter
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	72 mg/liter
$\text{H}_3 \text{BO}_3$	1,6 mg/liter
$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	6,5 mg/liter
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	4,8 mg/liter
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	2,7 mg/liter
K J	0,75 mg/liter
$\text{Na H}_2 \text{PO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	170 mg /liter
N.A.A.	0,3 mg/liter
Kinetine	0,1 mg/liter
Thianine HCl	1 mg/liter
Pyridoxine	5 mg/liter
Nicotine 2	5 mg/liter
Myo-inositol	100 mg/liter
Adenine-sulfaat	40 mg/liter
Na Fe-Edta	5 ml/liter
Moutextract	500 mg/liter
Saccharosa	25.000 mg/liter
Agar	6.000 mg/liter
pH = 5,7	

Autoclaveren 15 minuten op 108°C

TEMPERATUURGEGEVENS

			Index :		Vloeistof
			<u>Maximum</u>	<u>Minimum</u>	<u>9 uur</u>
2 ^e	decade	oktober 1973	20,4	16,0	16,5
3 ^e	"	oktober	20,7	16,1	16,5
1 ^e	"	november 1973	21,1	16,5	16,8
2 ^e	"	november	21,4	16,2	16,9
3 ^e	"	november	21,6	18,6	19,9
1 ^e	"	december 1973	21,4	18,4	19,5
2 ^e	"	december	21,9	18,4	19,4
3 ^e	"	december	22,3	18,5	19,1
1 ^e	"	januari 1974	22,2	18,2	19,1
2 ^e	"	januari	21,3	18,3	19,3
3 ^e	"	januari	21,6	18,8	20,1
1 ^e	"	februari 1974	20,8	18,3	18,9
2 ^e	"	februari	22,1	18,8	19,8
3 ^e	"	februari	22,2	18,9	20,8
1 ^e	"	maart 1974	22,3	19,4	20,4
2 ^e	"	maart	22,6	18,8	20,2
3 ^e	"	maart	23,4	18,9	20,3
1 ^e	"	april 1974	25,1	19,4	20,5
2 ^e	"	april	24,7	19,6	20,4
3 ^e	"	april	23,7	19,2	19,6

Samenstelling	Bodem in mg/liter		
	I	II	III
NH ₄ NO ₃	400	1650	400
KCl	65	-	65
KNO ₃	80	1900	80
Ca(NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O	144	440	144
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	72	370	72
KH ₂ PO ₄	12,5	170	12,5
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	170	--	170
H ₃ BO ₃	1,6	6,2	1,6
MnSO ₄ · 4 H ₂ O	6,5	22,3	6,5
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	2,7	11	2,7
K J	7,5	0,83	7,5
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	--	0,25	--
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	--	0,025	--
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	--	0,025	--
Adeninesulfaat	40	--	40
Nicotine zuur	5	0,5	5
Glycerine	--	2	--
Thianine HCl	1	0,1	1
Pyridoxine HCl	1	0,5	1
Meso-inositol	100	100	100
Mout-extract	500	--	5000
Ceseïne-hydrolysaat	--	1000	--
Fe Na Edta	5 ml	5 ml	5 ml
Saccharosa	25000	25000	25000
Agar	6000	8000	6000
Benzyladeine	1	1	--
N.A.A.	1	1	

Autoclaveren gedurende 15 minuten bij 108°C ($\frac{1}{4}$ atmosfeer).